



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**HELENA CRISTINA RIBEIRO KOHARATA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS NA PRÉ E  
PERIPUBERDADE DE BORREGAS SOBRE A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE  
RNAm DE IGF1/IGFBP3 ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E RECEPTOR DE  
LEPTINA EM CORPO LÚTEO**

**HELENA CRISTINA RIBEIRO KOHARATA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS NA PRÉ E  
PERIPUBERDADE DE BORREGAS SOBRE A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE  
RNAm DE IGF1/IGFBP3 ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E RECEPTOR DE  
LEPTINA EM CORPO LÚTEO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Orientadora:  
Prof. Dr.<sup>a</sup> Caliê Castilho Silvestre

636.39  
S231i

Santos, Helena Cristina Ribeiro Koharata.

Influência de diferentes sistemas nutricionais na pré e peripuberdade de borregas sobre a abundância relativa de RNAm DE IGF1/IGFBP3 enzimas esteroidogênicas e receptor de leptina em corpo lúteo / Helena Cristina Ribeiro Koharata. – Presidente Prudente, 2022.

74f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente  
Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientador: Caliê Castilho Silvestre

1. Ovinos. 2. Leptina. I. Título.

**HELENA CRISTINA RIBEIRO KOHARATA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS NA PRÉ E PERIPUBERDADE DE BORREGAS SOBRE A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE RNAm DE IGF1/IGFBP3 ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E RECEPTOR DE LEPTINA EM CORPO LÚTEO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Ciência Animal.

Presidente Prudente, junho de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Caliê Castilho Silvestre  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa Dra Fabíola Cristine de Almeida Rego Grecco  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR  
Londrina - PR

---

Prof Dr Felipe Rydygier de Ruediger  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação à minha família, em especial, meu esposo, Renato Lemes dos Santos e às minhas filhas Maria Beatriz e Maria Luiza, que sempre estiveram e estão ao meu lado me apoiando, encorajando e são incentivadores das realizações dos meus sonhos.*

*Dedico também aos meus pais, Rosa Maria Ribeiro Koharata e Valter Yoshio Koharata (falecido), meus maiores e melhores orientadores na vida. E ao meu irmão Valter Gustavo Koharata por sempre me apoiar e dar suporte ao longo da minha carreira.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente agradeço a Deus que, ao longo deste processo, me fez ver o caminho e sempre abençoou meus planos.*

*Agradeço imensamente à minha família, em especial, meu esposo, Renato Lemes dos Santos e minhas filhas Maria Beatriz e Maria Luiza que sempre estiveram e estão ao meu lado me apoiando.*

*Aos meus pais, Rosa Maria Ribeiro Koharata e Valter Yoshio Koharata (falecido) e meu irmão, Valter Gustavo Koharata, agradeço pelo encorajamento e todas as oportunidades que tive e espero um dia poder lhes retribuir com muita gratidão.*

*Deixo também um agradecimento especial a minha orientadora, que me acompanha desde a graduação, no qual tive a sorte de reencontrar no mestrado, sempre muito atenciosa sem ela esta dissertação não teria sido possível.*

*Agradeço a esta universidade por ser um espaço que privilegia o conhecimento e onde as pesquisas são bem recebidas.*

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana” (Carl Jung)

## RESUMO

### Influência de diferentes sistemas nutricionais na pré e peripuberdade de borregas sobre a abundância relativa de RNAm DE IGF1/IGFBP3 enzimas esteroidogênicas e receptor de leptina em corpo lúteo

O objetivo do presente projeto foi investigar a influência de 3 diferentes sistemas nutricionais na pré e peripuberdade de borregas sobre a expressão gênica do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), da proteína ligadora de IGF3 (IGFBP3), da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR), da 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B) e do receptor de leptina (LEPR) em corpos lúteos (CLs) de diestro. O status nutricional é o principal fator que influencia a habilidade do animal para se reproduzir. O início da puberdade e a manutenção da função reprodutiva estão fisiologicamente ligados à nutrição e a condição corporal. Variações nutricionais influenciam o metabolismo, com conseqüente reflexo nas concentrações de hormônios e seus receptores. Para a obtenção dos CLs, foram utilizadas 24 borregas (7/8 Dorper), com idades entre 6 e 7 meses. As borregas foram aleatoriamente distribuídas em 1 de 3 grupos alimentares. G-Sub (70%-80% da exigência do National Research Council [NRC]); G-Control (100-110% [NRC] e G-Super (140% [NRC]). As borregas do G-Sub (n=8) e G-Control (n=8) foram mantidas em pastagem de *Panicum maximum cv. Tanzânia* com acesso a água e sal mineral *ad libitum* e apenas as do grupo G-Super receberam 1,5% do peso vivo de ração comercial duas vezes ao dia. As borregas do G-Super (n=8) ficaram confinadas durante todo o período experimental, recebendo dieta total, na proporção volumoso concentrado de 20:80, contendo 16% de PB e 72% de NDT, visando ganho de peso diário de 200g/dia conforme NRC, sendo o acesso à água e sal mineral *ad libitum*. Inicialmente as ovelhas receberam 3,5% do peso vivo da dieta total (feno+ração), sendo esta porcentagem aumentada até atingir em média de 4,5 a 5% do peso vivo. Quando atingiram o peso corporal de 35kg as borregas sincronizadas pela inserção de um dispositivo vaginal de liberação lenta de progesterona (CIDR<sup>®</sup>) por 12 dias. No dia da retirada do implante (D12) administrou-se, por via intramuscular, 0,075mg de cloprostenol e 300UI de gonadotrofina coriônica equina e oito dias após as ovelhas foram abatidas e o aparelho reprodutor removido para pesagem e processamento das amostras de CLs para posterior análise da expressão gênica. Fragmentos dos CLs que foram depositados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em freezer de -80°C foram utilizados para realização da RT-qPCR. Esses fragmentos (aproximadamente 40mg) submetidos ao protocolo de extração do Trizol<sup>®</sup> (ThermoFisherScientific<sup>®</sup>) de extração total. A transcrição reversa foi realizada utilizando o protocolo da Superscript<sup>®</sup> III (Invitrogen<sup>™</sup>, Termo Fisher Scientific, Brasil), seguindo protocolo do fabricante. A qPCR foi realizada para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. A partir da análise estatística, notou-se que houve efeito do manejo nutricional na abundância relativa do receptor de leptina, o qual foi maior nas borregas do grupo G-Super. Já as enzimas HSD3B1 (p= 0,1085), STAR (p= 0,6516), IGF (p= 0,3277) e IGBP3 (p= 0,12) não diferiram de acordo com o plano nutricional. Concluiu-se que os diferentes planos nutricionais ofertados para as borregas na pré e peripuberdade impactaram no peso corporal e conseqüentemente na abundância relativa dos receptores de Leptina de forma significativa.

**Palavras-chave:** ovinos; HSD3b; leptina; IGF; IGFBP3; STAR.

## ABSTRACT

### **Molecular investigation of the corpus luteum from 'sheep sheep submitted to different nutritional plans in the peripuberty**

The main objective of this study was to investigate the influence of 3 nutritional systems in pre and peripuberty of ewe lambs on the gene of insulin growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), the acute insulin regulatory protein steroidogenesis (STAR), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B) and leptin receptor (LEPR) in diestrus corpus luteum (CLs). Nutritional status is the main factor influencing an animal's ability to protect itself. The onset of puberty and the maintenance of reproductive function are physiologically linked to nutrition and body condition. Modified variations of metabolism, with consequent reflection on consequences and their receptors. To survive the CLs, 24 ewe lambs (7/8 Dorper), aged between 6 and 7 months, were used. As lambs, groups were randomly assigned to 1 of 3 foods. G-Sub (70%-80% of the National Research Council [NRC] requirement); G-Control (100-110% [NRC] and G-Super (140% [NRC]). G-Sub (n=8) and G-Control (n=8) ewes were kept on Panicum maximum cv. Tanzania pasture with access to water and mineral salt and only as from the G-Super group 1.5% twice the weight of commercial live feed (8) were confined throughout the experimental period, receiving the total diet, in the proportion of rough weight concentration of 20:80, containing 16 % of CP and 72% of TDN, aiming at a daily weight gain of 200g/day according to NRC, with access to water and mineral salt ad libitum. average 5% of live weight. When they reached a body weight of 35 kg, the ewes were synchronized by the insertion of a vaginal device for slow release of progesterone (CIDR®) for 12 days. On the day of implant removal (D12), 0.075mg of cloprostenol and 300IU of equine chorionic gonadotropin were administered intramuscularly and eight days later the sheep were slaughtered and the reproductive system removed for weighing and processing of CL samples for later gene expression analysis. Fragments of LCs that were deposited in liquid nitrogen (-196oC) and stored in a freezer at -80oC were used to perform RT-qPCR. These fragments (approximately 40mg) were submitted to the total extraction protocol of Trizol® (ThermoFisherScientific®). Reverse transcription was performed using the Superscript® III protocol (Invitrogen TM, Termo Fisher Scientific, Brazil), following the manufacturer's protocol. qPCR was performed for the quantitative analysis of relative gene expression. From the statistical analysis, it was noted that there was an effect of nutritional management on the relative abundance of the leptin receptor, which was higher in ewes of the G-Super group. The enzymes HSD3B1 (p=0.1085), STAR (p=0.6516), IGF (p=0.3277) and IGFBP3 (p=0.12) did not differ according to the nutritional plan. It was concluded that the different nutritional plans offered to ewes in pre and peripuberty had a significant impact on body weight and consequently on the relative abundance of Leptin receptors.

**Keywords:** sheep; HSD3B; LEPTIN; IGF; IGFBP3; STAR.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Associações entre balanço energético e reprodução em animais.....	23
Quadro 2. ‘Primers’ (oligonucleotídeos iniciadores) que serão utilizados na qPCR.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e Desvio padrão da média dos pesos dos ovários e corpo lúteo das borregas dos grupos G-Sub (n=7) G-Control (n=8) e G-Super (n=8).....	62
---	----

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1. Efeito da nutrição (Média  $\pm$  EPM) sobre a abundância relativa de receptor de leptina (LEPR), fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1), gene da proteína ligadora de IGF 3 (IGFBP3), gene regulatória da esteroidogênese aguda (STAR), 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B) e Progesterona (P4) em corpos lúteos de borregas submetidas a diferentes planos alimentares na pré e peripuberdade, nos grupos G-Sub (n=7), G-Control (n=8) e G-Super (n=8) alimentadas..... 35

## LISTA DE SIGLAS

ARC – Núcleo Arqueado

CIDR - dispositivo vaginal de liberação de progesterona

CL (CLs) – Corpo Lúteo

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

HHG – Eixo Hipotálamo – hipófise – gônadas.

HSD3B – 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

IGF-1 – Fator de crescimento similar à insulina 1

IGF3 (IGFBP3) – Proteína ligadora

LEPR – Leptina

LH – Hormônio Luteinizante

mRNA – RNA mensageiro

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina 2 $\alpha$

POA – Área pré-óptica

STAR – Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Ciclo estral em borregas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Puberdade.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Fatores que influenciam na puberdade.....</b>	<b>20</b>
3.3.1	Genética.....	20
3.3.2	Estação de nascimento.....	21
3.3.3	Nutrição e peso corporal.....	21
3.3.4	Interações sociais.....	24
<b>3.4</b>	<b>Relação entre IGF1, IGFBP-3, HSD3B, STAR, leptina e reprodução.....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Local.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Manejo nutricional.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Sincronização do ciclo estral.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Método de abate dos animais.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Coleta de amostras.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6</b>	<b>Expressão gênica.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS NA PRÉ E PERIPUBERDADE DE BORREGAS SOBRE A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE RNAm DE IGF1/IGFBP3 ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E RECEPTOR DE LEPTINA EM CORPO LÚTEO.....</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ZYGOTE....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Considerando que elevadas taxas reprodutivas são fundamentais para eficiência dos sistemas de produção animal, a subfertilidade em borregas é uma das principais causas que contribuem para reduzir a produtividade em um rebanho. Assim, um dos fatores determinantes para o sucesso da pecuária é a precocidade sexual (QUADROS; LOBATO, 2004).

A eficiência reprodutiva do rebanho pode ser avaliada pela idade/peso a puberdade, período de serviço, taxa de gestação, prolificidade e principalmente capacidade de fêmea em gerar um produto saudável (QUADROS; LOBATO, 2004).

O início da puberdade e a manutenção da função reprodutiva estão fisiologicamente ligados à nutrição e à condição corporal, sendo esta definida como o despertar do eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal (HHG) (SMITH; CLARKE, 2010).

Como já citado anteriormente, a produtividade de um rebanho depende do sucesso de alguns aspectos reprodutivos, como a idade à puberdade (LOBATO *et al.*, 2013). Sendo assim, dietas balanceadas fornecem ao animal rápido ganho de peso e uma puberdade precoce, viabilizando a produção. Dentre vários fatores que podem causar resultados negativos em um rebanho, a nutrição é um dos fatores mais acessíveis para ser modificado para assegurar resultados satisfatórios e desejáveis (SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Em torno dos oito meses de vida ou com a ovelha apresentando entre 30 a 50 kg, o primeiro estro pode ocorrer (FRAGA *et al.*, 2015). Porém, a puberdade zootécnica corresponde a idade em que a fêmea pós-púbere apresenta desenvolvimento corporal que a torne capaz de sustentar de forma eficiente uma gestação a termo de forma eficiente. O peso a idade e à puberdade variam consideravelmente, pois são determinados pelo genótipo do animal e pelos fatores ambientais.

O genótipo de um animal é responsável pela expressão de fatores intrínsecos como a interação entre os hormônios e órgãos alvos que serão influenciados por fatores ambientais, como a nutrição, a luminosidade, a temperatura, a umidade e a precipitação pluviométrica (DUPONT *et al.*, 2014). Segundo Chelikani *et al.* (2003), o ganho de peso médio diário é responsável por 96% da idade de desencadeamento da puberdade em ruminantes.

A homeostase fisiológica gera condições ótimas para o sucesso reprodutivo, enquanto que o oposto, como a perturbação desse equilíbrio como por exemplo, as neurológicas, podem afetar a função dos neurônios do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (MEZA-HERRERA *et al.*, 2009). Por estas razões, mudanças em outros sistemas neuroendócrinos podem influenciar diretamente no sistema hipotálamo-hipófise-gonadal, através da regulação direta do GnRH (MAFFUCCI; GORE, 2009), sendo que mudanças nos níveis sanguíneos de hormônios metabólicos são sinais importantes que informam o estado nutricional dos mamíferos (GAMEZ-VASQUEZ *et al.*, 2008).

Variações nutricionais influenciam o metabolismo através do fornecimento de substrato exógeno para processos celulares e pela estimulação ou inibição de fatores neuroendócrinos de regulação metabólica (SCARAMUZZI *et al.*, 2006; SMOCHIT *et al.*, 2011), com conseqüente reflexo nas concentrações de hormônios e nutrientes circulantes no plasma sanguíneo (SGORLON *et al.*, 2008).

Fêmeas que estão com dietas insuficientes ou desbalanceadas terão menor estimulação do HHG, redução da liberação de GnRH e por conseqüência, menor quantidade de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) em sua circulação sanguínea que regulam as atividades dos ovários (MEZA-HERREIRA *et al.*, 2009), resultando no retardo para o início da puberdade (SENOSY *et al.*, 2013).

Entende-se que a puberdade é, portanto, a demarcação do processo reprodutivo e produtivo, com interferências marcantes positivas na economia e na genética, uma vez que, quando antecipada, haverá um retorno mais rápido do investimento, lucros, aumento da vida útil animal além de reduzir o intervalo entre gerações, resultando assim em vantagens para o ganho genético (EMERICK *et al.*, 2009).

A hipótese do presente estudo é que as ovelhas criadas a pasto estão expostas as alterações nutricionais induzidas pela sazonalidade da pastagem e portanto terão diminuição na expressão de receptores hormonais e/ou das enzimas responsáveis pela produção de progesterona no corpo lúteo.

## 2 OBJETIVOS

Investigar a influência de três diferentes sistemas nutricionais de borregas na peripuberdade sobre a funcionalidade do corpo lúteo observada pela concentração plasmática de progesterona, e abundância relativa do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), da proteína ligadora de IGF3 (IGFBP3), da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR), da 3B-hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B) e do receptor de leptina (LEPR) em tecido luteal.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Ciclo estral em borregas

O ciclo estral compreende as modificações cíclicas na morfologia e fisiologia dos órgãos genitais além do perfil dos hormônios relacionados às fêmeas. (ANTONIOLLI, 2002).

As borregas lanadas são animais poliéstricas sazonais que expressam seu padrão reprodutivo em resposta a fatores sociais, genéticos e ambientais. Os ciclos estrais ocorrem entre dois estros consecutivos com sazonalidade reprodutiva de maior incidência no outono e inverno, seguida de ovulação que ocorre de modo espontâneo em até 27 horas após o início do estro (SASA *et al.*, 2001; LINDSAY, 1991).

Um dos fatores que influenciam nos fenômenos reprodutivos das borregas é o fotoperíodo, que nesse caso, é caracterizado pelo decréscimo no número de horas de luz por dia (CHAMINEAU *et al.*, 1993).

Em borregas, o ciclo estral tem uma duração em média de 17 dias, com fase luteínica de 13 dias e uma fase folicular de 4 dias. O responsável pelo desencadeamento do primeiro estro, ovulação e ciclo completo da reprodução é a secreção rítmica de hormônios comandada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (FOSTER; HILEMAN, 2015).

No ciclo, a hipófise anterior (adenohipófise) faz a liberação dos hormônios gonadotróficos FSH e LH que tem a função de controlar o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese e posteriormente, provocam a secreção de estrógenos levando ao estro, momento em que a fêmea se encontra receptiva sexualmente ao animal de sexo oposto (BARTLEWICK; BABY; GIFFIN, 2011).

Ondas foliculares surgem sob estímulo do FSH até atingir uma dominância na qual gera um folículo ovulatório na última onda com receptores de LH na célula granulosa que alcança maturação final e ovulação com predomínio de atividade estrogênica, suprimindo a secreção de FSH (GINTHER; KOT, 1994; DESHPANDE *et al.*, 1999). A fase terminal de desenvolvimento folicular finaliza em ovulação (SEEKALLU *et al.*, 2009).

A ovulação em ovelhas pode ocorrer de forma única ou múltipla, sempre após o estro. Posteriormente a esse evento, formam-se os corpos lúteos (CLs). O

CL é uma glândula transitória responsável pela síntese de progesterona (P4) responsável pela preparação do útero em um ambiente adequado para o desenvolvimento do concepto (PATE; KEYES, 2001; BERTAN, 2004).

Nessa fase luteínica, a ausência da fertilização ou na incapacidade de sinalização do embrião dentro do útero, faz com que o endométrio libere prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ), causando luteólise, determinando o término do ciclo estral, gerando novo estro (SALLES; ARAÚJO, 2010).

### 3.2 Puberdade

A puberdade em fêmeas é definida como a idade em que há presença do estro acompanhado de uma função luteal (FREITAS, 2004).

Para Smith e Clark (2010), a puberdade fisiológica é definida como o despertar do eixo Hipotálamo-hipófise-Gonadal, resultando no início da vida reprodutiva das fêmeas, ocorrendo quando há a primeira ovulação, seguido pelo desenvolvimento do corpo lúteo e por uma fase luteínica de duração normal, porém é necessário que a fêmea atinja um determinado peso para ser capaz de sustentar uma gestação a termo.

A completa maturação sexual ocorre devido a mudanças endócrinas e metabólicas que conduzem essa transição para puberdade (WANKOWSKA, 2012). Assim, denomina-se um animal púbere aquele em que se apresenta apto a liberar gametas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em contrapartida, fêmeas pré-púberes, que estão em fase de transição, são fisiologicamente imaturas sexualmente, e essa transição da peripuberdade para puberdade pode ser explicada por diversas teorias, sendo as principais, denominadas de teoria gonadostática e teoria neuronal (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007).

A primeira teoria da transição a puberdade animal (teoria gonadostática) explica que o hormônio estradiol atua no hipotálamo impedindo a síntese e a secreção de gonadotrofinas (GnRH), desencadeando um efeito retrógrado ao início da puberdade (RAWLINGS *et al.*, 2003). Assim, ocorre uma diminuição de receptores de estradiol no hipotálamo resultando em aumento da produção e liberação de GnRH o qual age sobre a hipófise anterior estimulando o aumento dos níveis circulantes dos hormônios hipofisários LH e FSH. Conseqüentemente, estes hormônios irão agir na regulação do crescimento e diferenciação gonadal,

esteroidogênese e gametogênese, ajustando posteriormente o ciclo estral em fêmeas mamíferas (KUMAR; MATZUK, 2000).

Já a segunda teoria (teoria neuronal) explica que alguns neurotransmissores agem na peripuberdade inibindo a liberação de GnRH pelo HIPOTÁLAMO (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). Quando chega próximo a puberdade, ocorre a diminuição da ação desses moduladores inibitórios da atividade reprodutiva e aumento da atividade dos neurotransmissores estimulatórios, impulsionando a liberação de GnRH pelo hipotálamo e, conseqüentemente, dos demais hormônios hipofisários LH e FSH do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HERRERA *et al.*, 2009).

Pesquisas também explicam que os neurônios que sintetizam GnRH são regulados por muitos circuitos neuronais, mas um fator determinante para esta regulação é uma família de peptídeos, conhecidos como Kisspeptinas, que são sintetizados sob o controle transcricional do gene *Kiss1* (OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009).

As células secretoras de kisspeptina, no hipotálamo, respondem a sinais metabólicos e enviam informações importantes às células produtoras de GnRH. Assim, a kisspeptina é fundamental tanto no início da puberdade animal quanto na regulação da secreção de gonadotrofinas LH e FSH pela hipófise (GUTIÉRREZ-PASCUAL, 2007).

A regulação da liberação do GnRH pela ação de kisspeptinas é influenciada por muitos fatores endógenos, como os hormônios gonadais, metabólicos e outros neuropeptídeos (CARATHY *et al.*, 2007; GOODMAN *et al.*, 2010; TENA-SEMPERE, 2010).

Os autores Smith e Clark (2010) afirmam que próximo ao início da puberdade, em borregas, há uma diminuição na resposta ao *feedback* negativo do estradiol, resultando em uma frequência aumentada de pulsos de GnRH e, subseqüentemente, de LH. Este aumento na frequência de pulso de LH leva ao aumento da produção de estradiol que, por sua vez, induz o aumento subseqüente de GnRH/LH e a primeira ovulação (NESTOR *et al.*, 2012).

Durante a primeira ovulação, a falta de progesterona desencadeia a ocorrência de ovulação silenciosa no início da estação reprodutiva em ovelhas adultas e no início da puberdade (SASA *et al.*, 2002). A progesterona é necessária para a expressão do comportamento estral e é produzida pelo corpo lúteo formado na primeira ovulação silenciosa. Embora o estímulo hormonal para o estro seja o

estradiol, um período de exposição à progesterona de 5 a 9 dias é essencial para que a fêmea seja sensível ao estradiol (DIXON *et al.*, 2006).

Além disso, o peso corporal do animal é um fator importante que está intimamente ligado à idade a puberdade, o sistema nervoso central (SNC) reconhece que o corpo chegou ao peso adequado para a reprodução a partir da sinalização pela leptina que estimula a secreção de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) além de aumentar a disponibilidade de glicose para o SNC (FOSTER; NEGATANI, 1999).

É importante salientar que a puberdade, bem como outros eventos reprodutivos que ocorrem na fêmea adulta, dependem de um sistema complexo, controlado por interações entre sinais regulatórios que são altamente influenciados pelo nível nutricional do animal, hormônios e substâncias do metabolismo energético (SORIANO, 2021).

### **3.3 Fatores que influenciam na puberdade**

Segundo estudos, fatores como a nutrição, peso corporal, genética, interações sociais e estação de nascimento são um dos fatores que influenciam no desencadeamento da puberdade nos animais.

#### **3.3.1 Genética**

A genética é um dos fatores de importância na manifestação na idade à puberdade. Entretanto, os fatores ambientais e o manejo nutricional em regiões tropicais podem inibir a expressão de genes que desencadeiam a puberdade (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Deve ser levado em consideração que a idade e peso corporal ao primeiro estro é diferente nas raças ovinas, as raças precoces, como as de origem inglesa, por exemplo, atingem a puberdade com idade inferior às demais borregas (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Além disso, borregas jovens resultantes de cruzamentos planejados podem apresentar um melhor desempenho reprodutivo do que borregas de raças puras e sem planejamento.

De acordo com Nogueira *et al.* (2011), um bom plano nutricional associado a uma seleção de borregas que apresentam melhor desempenho reprodutivo pode melhorar os índices reprodutivos no rebanho.

### 3.3.2 Estação de nascimento

As borregas apresentam sua reprodução sazonal com ocorrência de ciclos estrais concentrados durante o outono e inverno (MONTEIRO, 2010).

A estacionalidade e a época de nascimento podem interferir na chegada da puberdade do animal (GATES *et al.*, 1998).

Os ovinos são animais poliéstricos sazonais de dias curtos (vários estros concentrados em um determinado período do ano com baixa luminosidade), assim, o aumento da luminosidade contribui para a diminuição da eficiência reprodutiva. Nos machos por exemplo, há uma diminuição espermatogênica, produção total de espermatozoides ou espermatozóides mortos e anormais e redução na atividade sexual. Em contrapartida, a diminuição da luminosidade é um fator que estimula fenômenos reprodutivos. Em fêmeas, tal fator contribui para os primeiros estros. (GATES *et al.*, 1998).

No Brasil, apesar da extensa área territorial e diferenças climáticas, principalmente no norte e no sul, os animais se adaptam às condições e apresentam estro o ano todo, apenas limitando em casos de carências nutricionais e sanitárias (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

### 3.3.3 Nutrição e peso corporal

A nutrição é considerada o principal fator que influencia no estabelecimento da puberdade no animal. A complexa interação dos diversos nutrientes, especialmente o nível de energia da dieta interfere na modulação hormonal relacionado aos processos reprodutivos (PIRES, 2011).

Um plano de manejo nutricional elevado, além de proporcionar alta taxa de ganho de peso corporal e super-condicionamento, pode também diminuir na idade a puberdade do animal (EL-SAIDY *et al.*, 2008).

A dieta influencia nos mecanismos responsáveis pela manutenção do início da puberdade por meio da liberação de diversos hormônios, tais como leptina,

glucagon, insulina, hormônio do crescimento, fator semelhante a insulina tipo I e outros. Por sua vez, esses hormônios atuam sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal interferindo na síntese e liberação de gonadotrofinas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O precursor dos hormônios esteroides (estradiol, progesterona e testosterona) é o colesterol. Os níveis sanguíneos de colesterol podem aumentar quando são utilizadas dietas ricas em carboidratos ou gorduras, enquanto que, níveis baixos de colesterol ocorrem quando há deficiência de alimentos energéticos, sendo assim, para a síntese dos hormônios esteróides não ser afetada, é necessário uma dieta balanceada (GONZALEZ; SILVA, 2017).

A partir disso, entende-se que fêmeas submetidas à rigorosas restrições alimentares, exibirão menor estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, e consequentemente, haverá uma redução da liberação de GnRH e menor pulsatilidade de LH e de FSH afetando o ciclo estral da fêmea (HERREIRA *et al.*, 2009).

As restrições alimentares provocam um balanço energético negativo levando a uma hipoglicemia que inibe a pulsatilidade de LH, hormônio responsável pela luteinização do folículo pré-ovulatório e formação do corpo lúteo (SCARAMUZZI *et al.*, 2011). Assim, a diminuição de LH e FSH em fêmeas afeta diretamente na foliculogênese e a qualidade dos oócitos, além de retardar a puberdade e diminuir a fertilidade do animal (SENOSY *et al.*, 2013).

Estudos apontam que a restrição alimentar e o impacto na função reprodutiva do animal são diretamente proporcionais, ou seja, quanto maior a restrição maior será o impacto na reprodução do animal, principalmente na fase jovem, que é a fase mais sensível para os ovinos (Quadro 1) (ZIEBA *et al.*, 2008).

Em borregas, as restrições alimentares podem reduzir o número de folículos ovulatório, enquanto que o aumento na ingestão nutricional pode aumentar a ovulação (SARTORI; MOLLO, 2007).

A nutrição também pode afetar os componentes da expressão do mRNA do sistema IGF ovariano para regular a resposta dos folículos às gonadotrofinas (LENZ SOUZA *et al.*, 2014). O IGF1 aumenta durante a puberdade em ruminantes (ADAM *et al.*, 1995) e atua estimulando o crescimento de folículos pré-antrais (DEMEESTERE *et al.*, 2004) e antrais (MONTE *et al.*, 2019). Animais com boas condições nutricionais apresentam elevadas concentrações plasmáticas de IGF-1

(LUCY *et al.*, 1992), sendo assim, durante a restrição alimentar as concentrações circulantes de IGF-1 diminuem consideravelmente (AMSTALDEN *et al.*, 2000). Estudos apontam que a baixa concentração circulante de IGF-1 acarreta a diminuição do RNAm *Kiss1* (HINEY *et al.*, 2009; PRALONG, 2010), e que o IGF-1 estimula a expressão do gene *Kiss1* no AVPV (HINEY *et al.*, 2009).

Além de uma nutrição balanceada, para que a primeira ovulação ocorra, é necessário que as borregas atinjam um determinado peso corporal. A média do peso das fêmeas deve ser em torno de 60% do peso adulto das ovelhas do rebanho, assim, faz-se necessário o investimento em uma boa nutrição (KOYUNCU; CANBOLAT, 2009).

Quadro 1. Associações entre balanço energético e reprodução em animais.

<b>Estado metabólico</b>	<b>Consequências no metabolismo</b>	<b>Efeitos na reprodução</b>
<b>Balanço energético negativo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perda de peso;</li> <li>- Estoque de gordura esgotado;</li> <li>- Perda de massa muscular</li> <li>- Hipoinsulinemia</li> <li>- Butiratos elevados <math>\beta</math>OH e NEFA;</li> <li>- GH elevado</li> <li>- Leptina baixa</li> <li>- Calor metabólico reduzido;</li> <li>- Sistema IGF suprimido;</li> <li>- Ureia elevada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibição da secreção de GnRH pelo hipotálamo;</li> <li>- Ausência de pulsos de LH;</li> <li>- Baixas concentrações de FSH;</li> <li>- Inibição da foliculogênese;</li> <li>- Baixo estradiol;</li> <li>- Alta sensibilidade de feedback negativo;</li> <li>- Anovulação;</li> <li>- Anestro;</li> <li>- Retardo na puberdade.</li> </ul>
<b>Balanço energético em equilíbrio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peso mantido;</li> <li>- Reservas de gordura mantidas;</li> <li>- Insulina normal;</li> <li>- Normoglicemia;</li> <li>- Baixo NEFA e butirato <math>\beta</math>OH;</li> <li>- GH normal;</li> <li>- Leptina normal;</li> <li>- Sistema IGF normal;</li> <li>- Ureia normal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Secreção normal de GnRH pelo hipotálamo;</li> <li>- Pulsatilidade normal do LH;</li> <li>- Concentrações normais de FSH;</li> <li>- Foliculogênese normal;</li> <li>- Estradiol e inibina normais;</li> <li>- Feedback negativo normal;</li> <li>- Ovulação;</li> <li>- Estro;</li> <li>- Taxa de ovulação abaixo do natural máximo.</li> </ul>

<p style="text-align: center;"><b>Balço energético positivo</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ganho de peso a longo prazo;</li> <li>- Aumento das reservas de gordura;</li> <li>- Hiperinsulinemia;</li> <li>- Hiperglicemia;</li> <li>- Baixo NEFA e butirato <math>\beta</math>OH;</li> <li>- Baixo GH;</li> <li>- Leptina elevada;</li> <li>- Aumento do calor metabólico;</li> <li>- Sistema IGF estimulado;</li> <li>- Uréia normal, nitrogênio alto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Secreção normal de GnRH pelo hipotálamo;</li> <li>- Pulsatilidade normal do LH;</li> <li>- Concentrações aumentadas de FSH;</li> <li>- Foliculogênese aprimorada;</li> <li>- Redução de estradiol;</li> <li>- Reduzido feedback negativo;</li> <li>- Ovulação;</li> <li>- Estro;</li> <li>- Taxa máxima de ovulação natural;</li> <li>- Puberdade precoce.</li> </ul>
---	--	--

Fonte: Adaptado de Scaramuzzi *et al.* (2006).

### 3.3.4 Interações sociais

De acordo com Mobini *et al.* (2002), os ovinos sofrem grande influência da interação social. Em outras palavras, um animal jovem pode chegar à sua maturidade sexual precocemente mediante convivência com demais animais em atividade reprodutiva.

Dessa forma, Otto Sá e Sá (2007), afirmam que a introdução de ovinos machos em rebanhos de fêmeas jovens durante a transição do período não reprodutivo para o reprodutivo pode resultar em uma significativa sincronização dos estros. Além disso, fêmeas que são expostas à animais ciclando tadem a atingir a puberdade precocemente (MOBINI *et al.*, 2002).

Os animais jovem demonstram mais interesse por animais mais velhos e com isso, desenvolvem precocemente instinto e libido e conseqüentemente atingem a puberdade (MOBINI *et al.*, 2002).

### 3.4 Relação entre IGF-1, IGFBP-3, HSD3B, STAR, leptina e reprodução

Os fatores de crescimento são proteínas que possuem ações autócrinas (interação direta com o mesmo tipo celular no qual foi produzido) ou parácrinas (modulando a resposta celular às gonadotrofinas) (ARMSTRONG; WEBB, 1997).

Essas proteínas estão relacionadas com a estimulação das células foliculares e também na maturação do oócito (LORENZO *et al.*, 2002). O IGF e as proteínas de ligação (IGFBP) exercem o papel de controle no desenvolvimento folicular e atresia. (MONGET *et al.*, 2002).

O sistema de fatores de crescimento (IGF) é composto por IGF-1 e IGF-2, dois tipos de receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e seis proteínas ligadoras (IGFBP-1, IGFBP -2, IGFBP -3, IGFBP-4, IGFBP -5 e IGFBP -6). Os receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (LEITÃO *et al.*, 2009).

Um dos principais responsáveis pela produção do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) é o hormônio do crescimento (GH). Além disso, os hormônios tireoideanos, esteróides sexuais, insulina e estado nutricional também influenciam na síntese de IGF-1 (JONES; CLEMMONS, 1995).

O IGF-1 fazem parte de uma família de peptídeos com similaridades estruturais à pró-insulina, conhecidos como somatomedinas, esses peptídeos tem participação na maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese (YOSHIMURA, 2003).

Segundo Jennische *et al.* (1992) os fatores de crescimento fazem a regulação e modulação das funções ovariana e uterina promovendo efeitos tróficos no endométrio e no concepto além de regeneração de tecidos. Ademais, o sistema IGF pode estar envolvido na manutenção e na regressão do corpo lúteo após a ovulação em animais (HASTIE; HARESIGN, 2006).

De acordo com Diskin *et al.* (2003), o IGF-1 estimula as ações das gonadotrofinas no ovário, principalmente do FSH, além disso, ele auxilia na proliferação e diferenciação das células da granulosa, especialmente durante o processo de seleção do folículo dominante, durante o crescimento folicular. Baixas concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1 estão relacionadas à redução na taxa de crescimento folicular, da capacidade ovulatória e de estrógenos.

Em uma pesquisa envolvendo ruminantes, foi constatado que uma dieta balanceada está diretamente relacionada com elevadas concentrações intra-foliculares de IGF-1 e progesterona, fatores que instigam a produção de oócitos de boa qualidade. Em contrapartida, a dificuldade de maturação e ausência de padrão adequado de LH e conseqüente atresia, estão relacionados com balanço energético insuficiente (YAVAS; WALTON, 2000).

A proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs), também conhecida como IGFBP-3 é um modulador de bioatividade e inibidor do crescimento do tecido extravascular (VALENTINIS *et al.*, 1995).

Segundo Bossis *et al.* (1999), IGF-1 e IGFBP-3 sintetizam proteínas que formam um complexo, onde o gene IGFBP-3 codifica a proteína 3 de ligação que é responsável por carregar cerca de 90% da proteína sintetizada pelo gene IGF-1. A proteína sintetizada pelo gene IGF-1 atua nas células da granulosa promovendo o aumento no número de receptores de FSH e LH, retardando o processo de atresia folicular, promovendo assim a foliculogênese, ovulação, fertilização, implantação e posteriormente o desenvolvimento do embrião.

Também envolvido com a cascata esteroidogênica, as enzimas STAR e HSD3D determinam os primeiros passos na esteroidogênese e são controlados por fatores de transcrição no córtex, adrenal, gônadas e a placenta (JIANG *et al.*, 2011).

As beta-hidroxiesteroides desidrogenases (HSD3D) pertencem a um grupo de enzimas esteroidogênicas que estão envolvidas tanto na biossíntese quanto no metabolismo de esteroides. Além disso, as enzimas possuem um papel importante na fisiologia e desenvolvimento de mamíferos, incluindo a determinação e diferenciação do sexo (JIANG *et al.*, 2011).

De acordo com Kowalewski *et al.* (2006), o lento declínio de progesterona a partir do 15º dia após ovulação está associado com a progressiva redução da expressão da enzima HSD3B.

Já a enzima STAR tem o papel de transportar o colesterol para dentro da mitocôndria, de modo que esse será convertido em pregnenolona iniciando assim a biossíntese dos hormônios esteroidais. A enzima 3 $\alpha$ -hidroxiesteróide dehidrogenase (HSD3A) tem o papel de converter a pregnenolona em progesterona, esta última passa a exercer suas funções biológicas no organismo (GIOMETTI *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que a regulação da expressão da enzima HSD3B também possa ocorrer no corpo lúteo gestacional do animal e determina o aumento e/ou diminuição da secreção de progesterona. Enquanto que no corpo lúteo (CL) em desenvolvimento há um aumento da expressão de HSD3B, a fase de regressão do CL é marcada pela redução do número de células que expressam a enzima (CONLEY *et al.*, 1995; BAO; GARVERICK, 1998).

Um outro hormônio peptídico ligado à reprodução animal é a leptina, ela é secretada pelo tecido adiposo, placenta, ovários, músculo esquelético, estômago,

células epiteliais da glândula mamária, medula óssea, hipófise e fígado e tem o papel principal de promover a adaptação em períodos de subnutrição (BERNE *et al.*, 2004).

Nas fêmeas pré-púberes as concentrações de leptina aumentam lentamente com a idade e as reservas de gordura corporal (MEZA-HERRERA *et al.*, 2009). Assim, a leptina é responsável pela sinalização da chegada a puberdade cuja concentração circulante aumenta com a aproximação da puberdade (ROSALES NIETO *et al.*, 2014).

Em animais que estejam em restrição alimentar, a rápida diminuição na concentração do hormônio peptídico leptina pode indicar um sinal para estimular a alimentação, a diminuição da atividade tireoidiana, o gasto de energia, a sensibilidade à insulina além de bloquear as funções reprodutivas (AHIMA *et al.*, 1996).

Na reprodução, a ação da leptina pode ocorrer de forma direta, quando ela age nas gônadas, e assim, promove o aumento dos esteroides sexuais, ou de forma indireta, por meio da ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, em que a função é permitir o processo reprodutivo por meio de um bom estado nutricional e reservas energéticas suficientes para reprodução. Portanto, os efeitos da leptina são consequências da disponibilidade das reservas energéticas (BARASH, 1996).

Nos mamíferos, a produção de leptina nos adipócitos é regulada pela alimentação e insulina (GUZMAN *et al.*, 2019). Vários estudos demonstraram que a insulina aumenta a produção de leptina pelas células adiposas tanto *in vivo* como *in vitro* e que a expressão de leptina aumenta após um pico na secreção de insulina durante a alimentação (MOHTAR *et al.*, 2019). Os níveis de insulina variam ao longo do dia, no entanto, a quantidade de insulina circulante é diretamente proporcional à quantidade de tecido adiposo (CROWN *et al.*, 2007; MOHTAR *et al.*, 2019). Ovelhas com aumento da ingestão alimentar há uma correlação positiva (0,73) entre as concentrações de LH e insulina, porém essa relação é perdida em ovelhas com restrição alimentar (MILLER *et al.*, 2007).

O balanço energético positivo leva ao aumento das concentrações de leptina e insulina no sangue e elevação da glicose. Essas alterações parecem afetar diretamente o ovário e estão associadas ao estímulo da foliculogênese e ao aumento da taxa de ovulação em ovinos (SCARAMUZZI *et al.*, 2006).

A expressão hipotalâmica de *Kiss1* está sob controle positivo direto da leptina, permitindo a adequada maturação e função dos neurônios GnRH e, conseqüentemente, do eixo HHG (PINILLA *et al.*, 2012). Assim, o papel da leptina na reprodução é como modulador positivo da expressão do *Kiss 1* no hipotálamo (CASTELLANO *et al.*, 2006).

Ainda existem muitos outros elementos do metabolismo animal podem regular o sistema *Kiss1* e a reprodução, como a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). A resposta a uma suplementação alimentar altera a glicose, a insulina, a leptina ou o IGF-1 e outros hormônios metabólicos (MEZA-HERRERA *et al.*, 2009; GUERRA-GARCIA *et al.*, 2009).

Os efeitos do balanço energético negativo na reprodução ocorrem principalmente no nível hipotalâmico-hipofisário do controle reprodutivo (WADE e JONES, 2005) e são caracterizados por hipoglicemia, hipoinsulinemia, IGF-1 plasmático suprimido e GH plasmático elevado, mudanças que estão associadas à inibição da pulsatilidade do GnRH, anovulação e anestro na fêmea (SCARAUMUZZI *et al.*, 2006).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi devidamente cadastrado e aprovado pela CPDI e pelo Comitê de ética no utilização de animais (CEUA), da Unoeste, sob protocolo número 4393.

### 4.1 Local

O experimento foi realizado no Centro Zootécnico da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, localizado no Campus II, na cidade de Presidente Prudente, Oeste do Estado de São Paulo (latitude de 22°07 norte e longitude 51°23').

### 4.2 Manejo nutricional

Foram utilizadas 24 borregas (7/8 Dorper), com idades entre 6 a 7 meses provenientes do mesmo rebanho de matrizes e nascidas de partos sincronizados após IATF com sêmen do mesmo reprodutor.

Ao início do experimento todas as fêmeas foram pesadas e as fezes coletadas para realização de OPG, cujo exame foi repetido mensalmente.

As fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em 3 grupos: G-Sub (70-80% da exigência do National Research Council [NRC]), G-Control (100-110% [NRC]) e G-Super (140% [NRC]). Desta forma o nível de exigência nutricional dos grupos experimentais acima citados foi elaborado de acordo com a realidade do ovinocultor brasileiro e os diferentes tipos de planos nutricionais adotados.

Sobretudo, se levarmos em consideração a falta de trabalhos relativos ao desempenho de borregas mantidas em pastagem nos meses secos, particularmente no Oeste Paulista, o qual merece destaque e por ser a região do Estado de São Paulo que possui o 3º maior rebanho do estado (IBGE, 2016).

Os animais do G-Sub (n=8) foram mantidos a pasto (*Panicum maximum* cv. *Tanzânia*), com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. O grupo G-Control (n=8) também permaneceu a pasto, porém recebendo 1,5% do peso vivo de ração comercial<sup>®</sup> (FORT OVINOS 16, FORTSAL<sup>®</sup>) para ovinos contendo: proteína bruta mínima (160 g/kg); NDT estimado (720 g/kg); extrato etéreo mínimo (33g/kg); fibra bruta máxima (62 g/kg); FDA máximo (70 g/kg); material mineral máximo (50g/kg); cálcio máximo (18g/kg); cálcio mínimo (17g/kg) e fósforo mínimo (8000mg/kg). As

borregas G-Sub e G-Control foram mantidas a pasto em módulo rotacionado (HEGARTY *et al.*, 2006), totalizando área de 0,8 hectares, subdivididos em 4 piquetes de aproximadamente 2.000m<sup>2</sup>, onde permaneceram por 9 dias em cada piquete com período de descanso do capim de 27 dias e área de pastagem de 22m<sup>2</sup> por animal.

Foi realizada análise bromatológica da pastagem a cada 15 dias para avaliação do valor nutricional (determinação dos teores da matéria seca, matéria mineral e proteína bruta), segundo as metodologias descritas pela AOAC (Association of Agricultural Chemists). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com metodologia obtida pelo método de Van Soest, descrito por Souza *et al.* (1999).

As borregas do G-Super (n=8) ficaram confinadas durante todo o período experimental, recebendo dieta total, na proporção volumoso/concentrado de 20:80, em cocho individual, com acesso a água e sal mineral (quelatado) *ad libitum*. O volumoso utilizado foi feno de *Tifton* e o concentrado a ração comercial citada acima, contendo 16% de PB e 72% de NDT, visando ganho de peso diária de 200g/dia conforme NRC (2007). Inicialmente as ovelhas receberam 3,5% do peso vivo da dieta total (feno+ração), sendo esta porcentagem aumentada até atingir em média de 4,5 a 5% do peso vivo (ROGÉRIO *et al.*, 2007; PARENTE *et al.*, 2009).

As ovelhas dos grupos G-Control e G-Super foram alimentadas, duas vezes ao dia, às oito horas da manhã e 4 horas da tarde, durante o experimento, sendo pesadas a cada 15 dias para ajuste da dieta em função do peso vivo.

### **4.3 Sincronização do ciclo estral**

Ao atingir o peso corporal de 35kg as ovelhas foram sincronizadas pela inserção de um dispositivo vaginal de liberação de progesterona (Easy-Breed CIDR<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) por 12 dias. No dia da retirada do implante (D12) foram administrados, por via intramuscular, 0,075mg de cloprostenol (cloprostenol, Veteglan<sup>®</sup>, HertapeCalier, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Brasil).

#### **4.4 Método de abate dos animais**

Cinco dias após a provável ovulação (SPENCER; BAZER, 1995) todas as ovelhas foram abatidas, para tanto permanecerem 18 horas em jejum alimentar com dieta hídrica. Antes do abate, as ovelhas foram insensibilizadas por meio de uma descarga elétrica de 0,50 A por 8 segundos, conforme metodologia proposta por Gomide (2006), sendo um método efetivo, induzindo a insensibilidade instantânea. A seguir foi realizada a sangria, pela secção das veias jugulares e as artérias carótidas.

#### **4.5 Coleta de amostras**

Imediatamente após o abate o aparelho reprodutor foi localizado e seccionado, mantido em gelo e enviado para o laboratório para processamento das amostras. Os CLs foram mantidos e pesados individualmente.

Cada CL foi seccionado em pelo menos 3 fragmentos, os quais foram imediatamente depositados, individualmente, em criotubos e congelados em nitrogênio líquido (-196°C), posteriormente ficaram armazenados em freezer -80°C até a realização da RT-qPCR.

#### **4.6 Expressão gênica**

Fragmentos dos CLs foram imediatamente depositados em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenados em -80 °C até a realização da RT-qPCR. Esses fragmentos (aproximadamente de 40mg) foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de extração do Trizol<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>) de extração total. A concentração de RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria. Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase abres de serem submetidos ao RT-qPCR, conforme as instruções do protocolo DNaseI – Amplification Grade (Invitrogen<sup>®</sup>).

A transcrição reversa foi realizada utilizando o protocolo High Capacity (Termo FisherScientific, Brasil), seguindo protocolo fabricante.

A qPCR foi realizada para análise quantitativa da expressão gênica relativa. Como controle interno das reações PCR em tempo real foi utilizado o gene endógeno glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD).

Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes-alvos no CL foram: fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1), gene de proteína ligadora de IGF3 (IGFBP3), gene da regulatória esteroidogênica aguda (STAR), 3B-hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B) e receptor de leptina (LEPR). Todos os oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas sondas para os genes alvos e endógeno serão obtidos a partir de ensaios TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster, USA), já padronizados (Quadro 2).

Quadro 2. “Primers” (oligonucleotídeos iniciadores) que serão utilizados na qPCR.

“Primers	Gene	GeneBank	Produto
IGF1	Alvo	NM_001009774.3	62 PB
IGFBP3	Alvo	NM_001159276.1	66 PB
STAR	Alvo	NM_001009243.1	69 PB
HSD3B	Alvo	NM_001135932.1	85 PB
LEPR	Alvo	NM_001009763.1	69 PB
G6PD	Endógeno	NM_001093780.1	73 PB

Fonte: Do autor.

As PCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação em relação ao gene controle. Para quantificação relativa das amplificações foi empregado o método Pfaffl (2001).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística da abundância relativa de IGF1, IGFBP3, STAR, HSD3B e LEPR de acordo dos três grupos de borregas em função do plano nutricional, inicialmente, os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de *Shapiro-wilk*. A seguir foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de *Tuckey* quando houve diferença, levando em consideração 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três tipos de manejos nutricionais usados neste estudo durante a pré e peripuberdade das borregas, não influenciou significativamente no peso dos órgãos como os ovários direito e esquerdo (Tabela 1). Entretanto, houve uma influência no peso dos animais G-Super ( $p=0,0002$ ).

Tabela 1. Efeito do plano nutricional sobre a média e desvio padrão dos pesos dos ovários (direito e esquerdo) e peso vivo das n=borregas no dia do abate nos grupos G-Sub (n=7), G-Control (n=8) e G-Super (n=8).

	<b>Peso ovário esquerdo (g)</b>	<b>Peso ovário direito (g)</b>	<b>Peso vivo (kg) no dia do abate</b>
<b>G-Sub</b>	1.314±0.523	0.960±0.401	35.214±1.983
<b>G-Control</b>	0.881±0.441	2.390±3.070	36.050±2.522
<b>G-Super</b>	0.960±0.401	1.259±0.405	40.911±2.547

Fonte: Do autor.

Houve efeito ( $p=0,0125$ ) do manejo nutricional na abundância relativa do receptor de leptina (LEPR), o qual foi maior nas borregas do grupo G-Super e não diferiu entre os grupos G-Sub e G-Control (Figura 1).

Já as enzimas HSD3B1 ( $p= 0,1085$ ), STAR ( $p = 0,6516$ ), IGF ( $p= 0,3277$ ) e IGBP3 ( $p= 0,12$ ) não diferiu de acordo com o plano nutricional (Figura 1).

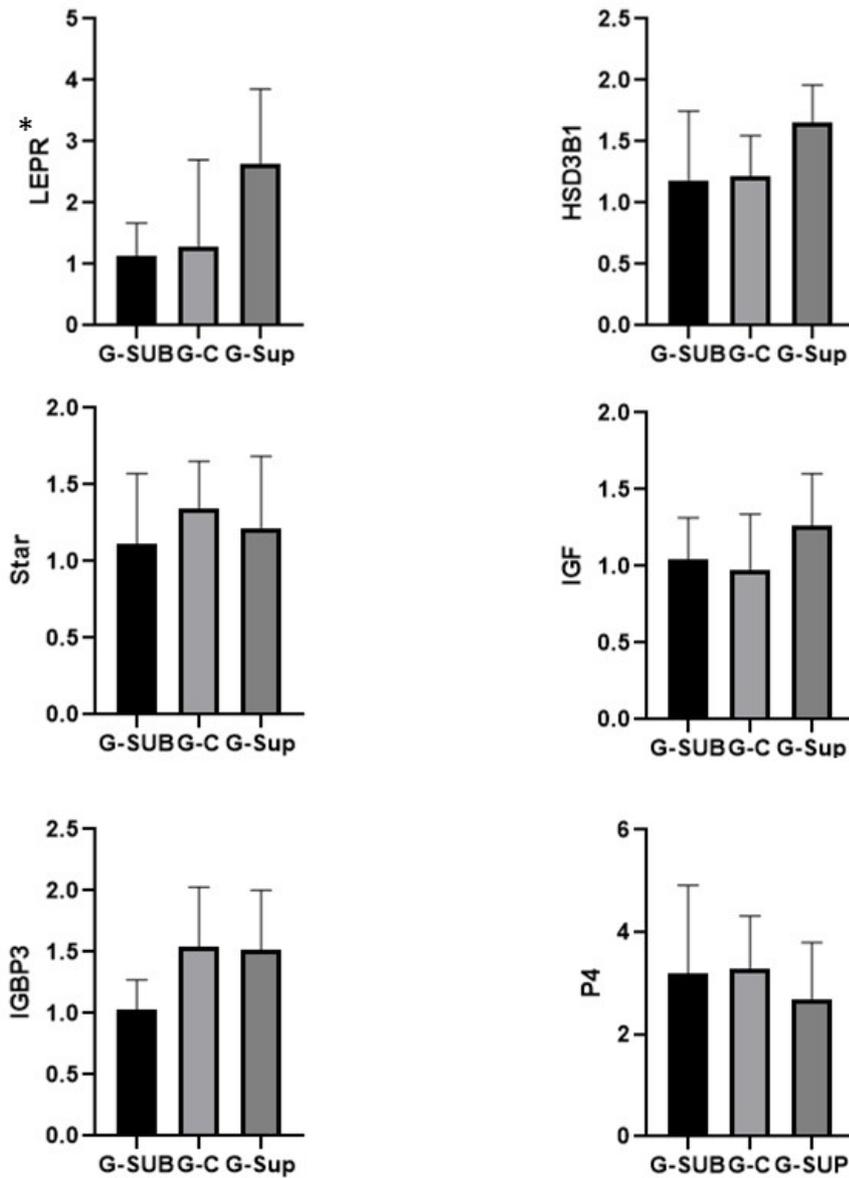


Figura 1. Efeito da nutrição (Média  $\pm$  EPM) sobre a abundância relativa de receptor de leptina (LEPR), fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), gene da proteína ligadora de IGF 3 (IGFBP3), gene regulatória da esteroidogênese aguda (STAR),  $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B) e Progesterona (P4) em corpos lúteos de borregas submetidas a diferentes planos alimentares na pré e peripuberdade, nos grupos G-Sub(n=7),G-Control(n=8),G-Super(n=8),alimentadas.

Estudos explicam que o balanço energético positivo, ou seja, o manejo realizado para o grupo G-Super leva ao aumento das concentrações de receptores de leptina e insulina no sangue além do aumento da captação de glicose, e conseqüentemente essas alterações afetam diretamente o ovário e estão associadas ao aumento da foliculogênese e aumento da taxa de ovulação em borregas.

Outro estudo também mostrou que ovelhas com maior peso corporal possuíram um nível maior de leptina quando comparado com ovelhas magras em restrição alimentar (CHILLIARD *et al.*, 2001).

A alteração da leptina pode ser explicada pelo fato de que ela responde à mudanças agudas na dieta e também mede as reservas de energia corporal a longo prazo, ou seja, quanto maiores essas reservas, maior será a concentração sanguínea de leptina no animal. Nesse sentido, nutrições baixas em nutrientes ou animais em jejum prolongado acarretarão na redução dos níveis de RNAm da leptina, como verificado na abundância relativa enzimática obtida no grupo de borregas G-Sub e G-Control, as quais tiveram um menor ganho de peso (BLACHE *et al.*, 2000).

Tanto a expressão gênica quanto as concentrações plasmáticas de leptina circulantes ficam reduzidas de forma significativa em ovelhas desnutridas (ADAM *et al.*, 2003 *apud* BOCQUIER *et al.*, 1998; BLACHE *et al.*, 2000; DELAUAUD *et al.*, 2000; MARIE *et al.*, 2001).

Na mesma linha de raciocínio, segundo Williams *et al.* (2002), a expressão de leptina é aumentada pela disponibilidade de glicose, insulina, hormônios esteróides, em contrapartida, sua expressão é diminuída devido ao jejum, baixa proporção de gordura em relação à massa corporal e hormônio do crescimento (GH) entre outros fatores relacionados. Dessa forma, entende-se que um sistema de manejo abundante e variado proporciona melhores condições nutricionais e até reprodutivas como é o caso observado em G-Super.

Quando o animal se encontra em uma situação metabólica positiva, como é o caso do G-Super, o maior consumo de energia aumenta os níveis de glicose, insulina e conseqüentemente, aumenta o fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-1) (SANTOS,1998) que, de acordo com os resultados obtidos, mostrou-se satisfatório e condizente com o presente estudo. Por outro lado, em balanço energético insatisfatório observa-se o efeito reverso, com ocorrência de

hipoglicemia, hipoinsulinemia, supressão de IGF e aumento de GH plasmático, este por sua vez, foi relatado por Friedman e Halaas (1988) com níveis elevados em humanos e ovelhas em pobre status nutricional.

O IGF1 e IGFBP3 não sofreram influência do plano alimentar. Em estudos realizados por Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002) foi constatado que a suplementação nutricional de curto prazo não demonstrou efeito sobre a concentração plasmática de IGF-1.

Em uma outra pesquisa comparando a infusão intravenosa de glicose em ovelhas e a ingestão oral de suplementação duas vezes ao dia, a insulina e a leptina plasmáticas aumentaram de forma aguda na infusão intravenosa. Em contrapartida, com ingestão oral em até 5 dias, o aumento foi lento e gradual. Já o IGF-1 não sofreu alteração em sua abundância relativa enzimática levando à suposição de que os efeitos nutricionais de curto prazo sobre o sistema IGF no folículo envolvam mecanismos ligados aos sistemas insulina-glicose e leptina (SCARAMUZZI RJ, 2011).

Outros estudos relatados por Lozano *et al.* (2003), sugerem que a desnutrição reduz as concentrações de IGF-1 em ovelhas e gado leiteiro. Para Luna-Pinto e Cronjé (2000), em uma pesquisa utilizando novilhas pré-puberes em manejo nutricional negativo foi encontrada diferenças em concentrações de leptina, IGF-1 e IGFBP3.

Os níveis elevados de IGF-I em todos os grupos de ovelhas (G-Sub, G-Control e G-Super) neste estudo podem ser explicados, hipoteticamente, pela subalimentação (períodos críticos) que desencadeia em alguns órgãos, como o cérebro e o coração, a ação de preservação da síntese de IGF-1 na circulação (BREIER *et al.*, 2000).

A enzima STAR está relacionada com a esteroidogênese ovariana, ela tem o papel de auxiliar na captura do colesterol para síntese de progesterona feita pela enzima HSD3B (GERVÁSIO *et al.*, 2014). Assim, entende-se que o fato de existir um balanço nutricional positivo contribui significativamente para a atuação da atividade enzimática e por isso há uma maior abundância relativa de STAR no grupo de ovelhas G-Super. Por outro lado, as médias encontradas nos grupos G-Sub e G-Control também estão altas, e isso, pode ser devido ao motivo de que as borregas em estado nutricional negativo apresentam significativa concentração sérica de colesterol, portanto, supõe-se que haveria uma maior atividade da

enzima para esse estado também, como observado em G-Sub. Nesse mesmo sentido, a abundância relativa da enzima HSD3B também apresenta médias elevadas devido a sua atuação conjunta com a STAR na cascata de esteroidogênese na conversão de pregnenolona em progesterona (P4).

A enzima HSD3B encontra-se em níveis elevados quando o corpo lúteo (CL) está em desenvolvimento, enquanto que a fase de regressão do CL é marcada pela redução do número de células que expressam a enzima (CONLEY *et al.* 1995; BAO; GARVERICK, 1998). Além disso, a abundância relativa do RNAm da enzima é diretamente proporcional ao hormônio progesterona, assim, como as médias da enzima HSD3B foram relativamente altas para os três manejos, a progesterona também não diferiu significativamente entre os grupos.

Ainda com relação a P4, é possível notar que, apesar de estar relativamente elevada nos três grupos de ovelhas, ela se encontra discretamente inferior no G-Super quando comparado com G-Control e G-Sub, respectivamente, pelo raciocínio, levando em consideração que a atividade da progesterona estaria mais elevada em ovelhas com maior massa corporal devido abundância de colesterol, como já citado anteriormente, tal fato pode ser explicado, de acordo com Macedo (2010), que planos nutricionais altos reduzem os teores plasmáticos de progesterona devido ao aumento do fluxo sanguíneo hepático e à degradação acelerada do hormônio, uma vez que o fígado é o principal órgão de metabolismo de esteróides, podendo metabolizar 95% da progesterona em uma única passagem e diminuir os níveis do hormônio (MACEDO, 2010). O mesmo achado foi relatado por O'Callaghan *et al.* (2000) em ovelhas com alimentação abundante onde as concentrações de progesterona foram reduzidas quando comparada às ovelhas sob uma alimentação restrita.

É sabido que os hormônios esteróides são seletivamente armazenados em gorduras, desse modo, planos alimentares que resultam na mobilização de gordura pode resultar na liberação de progesterona estocada. Isto explica os níveis elevados de P4 no G-Sub, onde houve aumento da progesterona mesmo em baixo plano nutricional (PAULA, 2004 *apud* MANN *et al.*, 1996).

Estudos anteriores comprovaram o aumento do IGFBP3 durante períodos de estado nutricional positivo em novilhas pré-puberes, sendo que no período de puberdade houve uma queda da abundância relativa do RNAm da enzima (LUNA-PINTO; CRONJÉ, 2000). É notável que o manejo nutricional exerce um papel de

grande influência na eficiência reprodutiva de forma direta, na oferta de nutrientes para as funções fisiológicas, e na forma indireta na síntese de hormônios e na quantidade de receptores nas células e suas interações metabólicas.

Os impactos nutricionais causados na reprodução continuarão sendo um assunto de intensa investigação, uma vez que, o manejo nutricional é fator de fácil acesso que pode ser manipulado pelos criadores de animais de produção visando precocidade e lucratividade.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos que os diferentes sistemas nutricionais ofertados para as borregas na pré e peripuberdade, impactaram no peso corporal e conseqüentemente na abundância relativa dos receptores de Leptina que se mostraram elevadas em manejo nutricional positivo no grupo G-super.

Assim, a Leptina foi considerada o principal indicador do status energético, pois aumentou no grupo de borregas que apresentaram maior ganho de peso.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Não há conflito de interesse a ser declarado pelos autores desse estudo.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, C.L; KYLE, C.E; YOUNG, P.; ATKINSON, T. Effect of nutritional growth restriction on the timing of reproductive development and plasma concentrations of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in male red deer (*Cervus elaphus*) reared in constant photoperiod. **Animal Science**, v.61, p.155-160, 1995.
- ADAM, C. L.; ARCHER Z.A.; MILLER, D.W. Leptin actions on the reproductive neuroendocrine axis in sheep. **Reproduction**, v.61, p.283-97, 2003.
- AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S. Papel da leptina na resposta neuroendócrina ao jejum. **Natureza**, p.382250–252, 1996.
- AMSTALDEN, M.; GARCIA, V.R.; WILLIAMS, S.W; 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. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 127-133, 2000.
- ANTONIOLLI, C.B. Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação. *In*: SEMINÁRIO CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, UFRGS. **Anais [...]**. 2002.
- ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intra-ovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.139-46, 1997.
- BACHELOR, K.; SMITH, J.; CLARKE, I.J. Melanocortins may stimulate reproduction by activating orexin neurons in the dorsomedial hypothalamus and kisspeptin neurons in the preoptic area of the ewe. **Endocrinology**, v.150, n.12, p. 5488-5497, 2009.
- BACKHOLER, K.; SMITH, J.T; RAO, A., PEREIRA, A.; IQBAL, 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, n.5, p.2233-2243, 2010.
- BARASH, I. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v.137, n.7, p.3144–3147, 1996.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal Animal Science**, v.76, p.1903-1921, 1998.
- BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, n.3-4, p.259-268, 2011.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 1082 p.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F2 $\alpha$  no endométrio de fêmeas bovinas.** 2004. 185f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BLACHE, D.; TELLAM, R.L.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E.; MARTIN, G.B. Level of nutrition affects leptin Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. **Journal Endocrinoly**, 2000.

BLING, F.J. The neuroendocrine timing of puberty. **Reproduction**, v.129, p.675-683,2005.

BREIER, B.H. *et al.* **Regulation of growth and metabolism during postnatal development.** Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth, and reproduction. London: CAB International, 2000.

BRONSON, F.H. Environmental regulation: Some general principles. *In*: BRONSON, F.H. (eds). **Mammalian reproductive biology**. Chicago: University of Chicago Press, 1989. p.7–27.

BOSSIS, R. P.; WETTEMANN, S. D.; WELTY, J. A.; VIZCARRA, L. J.; SPICER; M. G. DISKIN. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal Animal Science**, v.77, p.1536-1546, 1999.

CARAT, A.; SMITH, J.T.; LOMET, D.; BEN SAÏD, S.; MORRISSEY, A. COGNIE, J.; DOUGHTON, B.; BARIL, G.; BRIANT, C.; CLARKE, I.J. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes **Endocrinology**, v.148, n.11, p.5258-5267, 2007.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências, Veterinária e Zoologia da Unipar**, v.10, n.1, p.59-67, 2007.

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.

CHAMINEAU, P.; BERTHELOT, X.; MALPAUX, B. *et al.* La maîtrise de la reproduction par la photopériode et la mélatonine chez les mammifères d'élevage. **Cashiers Agriculture**, v.2, p.81-92, 1993.

CHELIKANI, P.K.; AMBROSE, J.D.; KENNELLY, J. J. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. **Theriogenology**, v.60, p.707-725, 2003.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.271-295, 2001.

CLARKE, I.J.; SARI, I.P.; QI, Y.; SMITH, J.T.; PARKINGTON, H.C.; UBUKA, T.; IQBAL, L.Q.; TILBROOK, A.; MORGAN, K.; PAWSON, A.J.; TSUTSUI, K.; MILLAR, R.P.; BENTLEY, G.E. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. **Endocrinology**, v.149. n.11, p.5811-5821, 2008.

CLARKE, H.; DHILLON, W.S; JAYASENA, C.N. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. **Endocrinology and Metabolism**, v.30, n.2, p.124-141 2015.

CONLEY, A.J.; KAMINSKI, M.A.; DUBOWSKY, S.A.; JABLONLA-SHARIFF, A.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Immunohistochemical localization of 3 dehydrogenases and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1081-1094, 1995.

CROWN, A.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. **Neuroendocrinology**, v.86, p.175-182, 2007.

DELAVAUD, C.; BOCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D. H.; GERTLER, A. KANN, G. Plasma leptin determination in ruminants: Effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentrations specifically by specified by RIA in sheep. **Journal Endocrinology**, v.165, p.519-526, 2000.

DEMEESTERE, G.; CENTNER, J.; DEVREKER, F.; ENGLERT, Y. EffectEffector insulin-like growth factor-i during preantral follicular culture on steroidogenesis metro, oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biology Reproduction**, v.70, p.1664-1669, 2004.

DESHPANDE, D.; RAVINDRA, J.P.; NARENDRANATH, R.; NARAYANA, K. Ovarian antral follicular dynamics, and serum pro- progesterone concentration during the estrousestrous cycle of Bannur ewes. **Indian Journal Animal Science**, v.69, p.932-934, 1999.

DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition status status status status status status status status staththeonthe Patheon circulation ovarian follicle ovarian follicleovarian follicle development in cattle **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-370, 2003.

DIVAL, S.A; RADO VICK, S. Endocrinology of female puberty. **Current Opinion Endocrinology, Diabetes and Obesety**, v.16, p.1-4, 2009.

DIXON, A.B.; KNIGHTS, M.; PATE, J.L; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K. Reproductive



FRESCURA, R.B.M.; PIRES, C.C.; ROCHA, M.G. et al. Sistemas de alimentação na produção de cordeiros para abate aos 28 kg. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1267-1277, 2005.

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

FOSTER, D.L.; HILEMAN, S.M. **Puberty in the sheep. In Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2015. p.1441-1486.

SORIANO, G.A.M. **Impacto de diferentes sistemas alimentares na peripuberdade sobre a anatomo-fisiologia reprodutiva de borregas**. 2021. Tese (Doutorado) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2021.

GAMEZ-VAZQUEZ, H.G.; ROSALES-NIETO, C.A.; BAÑUELOS-VALENZUELA, R.; URRUTIA-MORALES, J.; DIAZ-GOMEZ, M.O.; SILVA-RAMOS, J.M.; MEZA HERRERA, C.A. Body condition score positively influence plasma leptin concentrations in criollo goats. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.7, p.1237-1240, 2008.

GATES, P.J.; HEMNINGSSON, T.; TENGROTH, E.; FORSBERG, M. Effects melatonin, progestagens, whether the heh am ram nono n out-of- reprepro repro du conduction conduct induction action pconductionSwedish Landrasheep sheep sheep sheep sheep sheep she. **Acta Vetetinary Scandinavica**, v.3, p.499-510, 1998.

GAYTÁN, F.; GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J.M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO B.; GARRIDO, N.; SANCHEZ-CRIADO, J.E.; MILLAR, R.P.; PELLICER, A.; FRASER H.M; TENA-SEMPRE, M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **American Journal of phEndocrinologyrinology and Metabolism**, v.296, n.3, p.520-531, 2009.

GERVÁSIO, C.G.; BERNUCI, M.P.; SILVA-DE-SÁ, M.F.; ROSA-E-SILVA, A.C.J.S. The role of androgen hormones in early follicular development. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v.2014, p.1-11, 2014.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v.42, p.987-1001, 1994.

GIOMETTI, I.C.; CASTILHO, A.C.S.; SÁ-FILHO, O.G.; PAPA, P.C.; BURATINI, J.R.J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.34-52, 2009.

GOMIDE, L.A.M. **Tecnologia de abate e tipiricação de carcaças**. Viçosa: UFV, 2006.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017. 538p.

GOODMAN, R.L.; LEHMAN, M.N.; SMITH, J.T.; COOLEN, L.M.; OLIVEIRA, C.V.; JAFARZADESHIRAZI, M.R.; PEREIRA, A.; IQBAL, J.; CARY, A.; CIOFI, P.; CLARKE, I.J. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. **Endocrinology**, v.148, n.12, p.5752-5760, 2007.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2006.

GUERRA-GARCÍA, M.; MEZA-HERRERA, C.A.; SANCHEZ-TORRES-ESQUEDA, M.T.; GALLEGOS-SANCHEZ, J.; TORRES-HERNANDEZ, G.; PRO-MARTINEZ, A. IGF-1 and ovarian activity of goats in divergent body condition and supplemented with non-degradable ruminal protein. **Agrociencia**, v.4, p.241-247, 2009.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, E.. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinizing hormone and growth hormone secretion. **Journal of Neuroendocrinology**, v.19, n.7, p.521-530, 2007.

GUZMÁN, A.; HERNANDEZ-CORONADO, C.G; ROSALES-TORRES. A.A. HERNANDEZ-MEDRANO, J.H Leptin regulates neuropeptides associated with food intake and GnRH secretion. **Annales d'Endocrinologie**, v.80, n.1, p.38-46, 2019.

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

HASTIE, P.M.; HARESIGN, W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor factor factor factor factor (IGF) ligands, IGF receptors, and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.284-299, 2006.

HAUKOOS, J.S.; LEWIS, R.J. Advanced statistics: Bootstrapping confidence intervals for statistics with "difficult" distributions. **Academic Emergency Medicine**, 2005.

HEGARTY, R.S.; SHANDS, C.; MARCHANT, R.; HOPKINS, D.L; BALL, A.J.; HARDEN, S. Effects of available nutrition and sire breeding values for growth and muscling on the development of crossbred lambs 1: Growth and carcass characteristics. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, p.593-604, 2006.

HERREIRA, C.A.M.; GONZALEZ-BULNES, A.; KRIDLI, R.T.; MELLADO, M.; ARECHIGAFLORES, C.F.; SALINAS, H.; LUGINBUHL, J.M. Neuroendocrine, metabolic and genomic cues signalling the onset of puberty in females. **Reproduction in Domestic Animal**, v.45, n.6, p.439-531, 2009.

HILL, J.W.; ELMQUIST, J.K.; ELIAS, C.F. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. **American Journal of physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.294, n.5, p.827-332, 2008.

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, n.1, p.376-384, 2009.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal 2015**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016

JIANG, Y. F.; TSUI, K. H.; WANG, P. H.; LIN, C. W.; WANG, J. Y.; HSU, M. C.; CHEN, Y. C.; CHIU, C. H. Hypoxia regulates cell proliferation and steroidogenesis through protein kinase A signaling in bovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.129, n.3-4, p.152-161, 2011.

JONES J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrinology Reviews**, v.16, p.3-34, 1995.

KAUFFMAN, A.S. Coming of age in the Kisspeptin Era: Sex differences, development, and puberty. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.324, p.51-63, 2010.

KOWALEWSKI, M.; MASON, J.; HOWIE, A.; MORLEY, S.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Characterization of the canine 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus. **Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.101, n.4-5, p.254-262, 2006.

KOYUNCU, M.; CANBOLAT, O. Effect of different dietary energy levels on the reproductive performance of Kivircik sheep under a semi-intensive semi-intensive system in the South-Marmara region of Turkey. **Animal Feed Science and Technology**, v.50, n.6, p.243-248, 2009.

KUMAR T.R.; MATZUK M.M. Gene knockout models to study the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. *In*: SHUPNIK, M.A. (ed.). **Gene engineering engineering engineering and molecular models in Endocrinology**. Totowa, NJ: The Human Press, 2000.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.V.; FROTA, I.M.A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Science Veterinaria**, v.37, p.215-224, 2009.

LENHARD, W.; LENHARD, A. **Calculation of effect sizes**. Dettelbach, Germany: Psychometrica, 2016. Retrieved from: [https://www.psychometrica.de/effect\\_size.html](https://www.psychometrica.de/effect_size.html).

LENZ SOUZA, M.I; LEANDRO GRESSLER, M.A.; URIBE-VELASQUEZ, L.F. Interrelações entre nutrição, hormonas metabólicas reprodução em rêmças ovinas. **CES Medicina, Veterinaria y Zootecnia**, v.9, n.2, p.248-261, 2014.

LEÓN, S.; FERNANDOIS, D.; SULL, A.; SULL, J.; CALDER, M.; HAYASHI, K.; BHATTACHARYA, M.; POWER, S.; VILOS, G.A.; VILOS, A.G.; TENA-SEMPERE, M.; BABWAH, A.V. Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting endometrial gland development and function. **Scientific Reports**, v.6, n.29073, 2016.

- LINDSAY, D.R. Reproduction in the sheep and goat. In: CUPPS, P.T. (Ed.) Reproduction in domestic animals. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p.491-515.
- LOBATO, E.; FERRO, R.A.C.; SANTOS, K.J.G.; COSTA, M.A.; FERRO, D.A.C.; SANTOS, A.P.P. Fisiologia reprodutiva de ovinos. **Pubvet**, v.7, n.15, 2013.
- LORENZO, P.L.; LIU, I.K.M.; ILLERA, J.C. et al. Steroid response in mare oocytes matured in vitro with growth factors. *Theriogenology*. **Special Issue: Proceedings Annual IETS Conference**, v.57, n.1, p.363, 2002.
- LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of reproductive programs. **Reproduction**, v.125, p.543-553, 2003.
- LUNA-PINTO, G.; CRONJÉ, P.B. The roles of the insulin-like growth factor system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and compensatory growth in dairy heifers. **South African Journal of Animal Science**, v.30, n.2, p.155-163, 2000.
- LUQUE, R.M; KINGMAN, R. D; TENA-SEMPRE SEMPRE 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, n.10, p.4601-4611, 2007.
- MACEDO, F.G. **Desempenho reprodutivo de ovelhas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de energia no terço inicial da prenhez**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.
- MAFFUCCI, J.A; GORE, A.C. Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone? **International Review of Cell and Molecular Biology**, v.274, p.69-127, 2009.
- MARIE, M.; FINDLAY, P.A.; THOMAS L.; ADAM, C.L. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. **Journal Endocrinology**, v.170, p.277-286, 2001.
- MEHMET, O.A.; MEHMET, K.; MUSTAFA, H.; KAVA, M.S.; BOZKAYA, F. Expression patterns of Toll-like receptors in the ovine corpus luteum during the early pregnancy and prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteolysis. **Theriogenology**, v.111, p.25-33, 2018.
- MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E.E.; MA, D.; HENDRICK, A.G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R.R; MALIGNE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M.B; COLLEDGE, W.H.; CARATY, A.; APARICIO, S.À. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.7.5, p.1761-1766, 2005.

MEZA-HERRERA, C.A.; GONZALEZ-BULNES, A.; KRIDL, R.T.; MELLADO, M. ARECHIGA-FLORES, C.F.; SALINAS, H.; LUGINBUHL, J.M. Neuroendocrine Metabolic and Genomic Cues Signalling the Onset Puberty in Females.

**Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.6, p.943-1134, 2009.

MILLER, D.W.; HARRISON, J.L.; BENNETT, E.J.; FINDLAY, P.A.; ADAM, C.L. Nutritional influences on reproductive neuroendocrine output: insulin, leptin, And orexigenic neuropeptide signaling in the ovine hypothalamus. **Endocrinology**, v.148, p.5313-5322, 2007.

MOKHTAR, O.; OZDEMIR, C.; ROY, D.; SHANTARAM, D.; EMILI, A.; KANDROR, K.V. Egr1 Mediates the effect of insulin on leptin transcription in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 2019.

MONTEIRO, C.D.; BICUDO, S.D.; TOMA, H.S. Puberdade em fêmeas ovinas. **PUBVET**, v.4, n.21, ed. 126, art. 856, 2010.

MUNÖZ-GUTIÉRREZ, M.; FINDLAY, PA.; ADAM, C.L.; WAX, G.; CAMPBELL, B.K. KENDALL, N.R.; KHALID, M.; FORSBERG, M.; SCARAMUZZI, R.J. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IF- $\gamma$  receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5. leptin and leptin receptors in cycling ewes after three days of leptin infusion.

**Reproduction**, v.130, p.869-881, 2005.

MOBINI, S.; Heath, A.M.; PUGH, D.G. Theriogenology of sheep and goats. *In*: PUGH, D.G. (ed.). **Sheep and Goat Medicine**. Philadelphia: Elsevier, 2002.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J.M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.139-154, 2002.

MONTE, A.P.O.; BARROS, V.R.P.; SANTOS, J.M.; MENEZES, V.G.; CAVALCANTE, A.; COUVEIÀ, B.B.; BEZERRA, M.E.S.; MACEDO, T.J.S.; MATOS, M.I.F. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the sheep ovary and the synergistic effect of IGF-1 and FSH on follicular development in vitro and LH receptor immunostaining. **Theriogenology**, v.129, p.61-69, 2019.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B.; SCARAMUZZI, R.J. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. **Reproduction**, 2002.

NESTOR, C.C.; BRISCOE, A.M.S.; DAVIS, S.M.; VALENT, M.; GOODMAN, R.L.; HILEMAN, S.M. Evidence of a Role for Kisspeptin and Neurokinin B in Puberty of Female Sheep. **Endocrinology**, v.153, n.6, p.2756-2765, 2012.

NETO, J.C.; SANTOS, C.B.; MIRANDA, E.M.; ESTRELA, C. Boxplot: um recurso gráfico para a análise e interpretação de dados quantitativos. **Revista Odontologia Brasileira**, v.26, n.76, p.1-6, 2017.

NOGUEIRA, D.M.; ELOY, A.M.X.; SÁ, C.O.; JÚNIOR, E.S.L.; FIGUEIREDO, H.O.S.; SÁ, J.L.; SOUSA, P.H.F. **Manejo Reprodutivo Embrapa**. Embrapa Semiárido, 2011. cap.16. 36p.

NRC. **Nutrient requirements of small ruminants**: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington: National Academy Press, 2007. 384 p.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.18, p.303-313, 2000.

OAKLEY, A.E.; CLIFTON, D.K; STEINER, R.A. Kisspeptin signaling in the brain. **Endocrine Reviews**, v.30, n.6, p.713-743, 2009.

SÁ, C.; SÁ, J.L. **Ciclo estral de ovelhas**. 2007. Disponível em: [http://www.crisa.vet.br/exten\\_2007/cestral.htm](http://www.crisa.vet.br/exten_2007/cestral.htm). Acesso em: jan. 2022.

PARENTE, H.N.; MACHADO, T.M.M.; CARVALHO, F.C.; GARCIA, R.; ROGERICI, M.C.P.; BARROS, N.N.N.; ZANINE, A.M. Desempenho produtivo de ovinos. em confinamento, alimentados com diferentes dietas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61,n.2, p.460-466, 2009.

PAULA, N.R.O. Influência da nutrição sobre a função ovariana de caprinos explorados no nordeste do Brasil. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, 2004.

PATE, J.L; KEYES, P.L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v.122, p.665-676, 2001.

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

PINILLA, L.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; MILLAR, R.P.; TENA-SEMPRE, V. Kisspeptins, and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. **Physiology Reviews**, v.92, n.3, p.1235-1316, 2012.

PIRES, A.V. Aspectos nutricionais relacionados à reprodução. *In*: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (eds.) **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011.

PROLONG, F.P. Insulin, and Npy pathways and the control of GnRH function and puberty onset. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.324, n.1-2, p.82-86, 2010.

QUADROS, D.G. **Sistema de produção de ovinos e caprinos de corte**. Salvador: Núcleo de Estudos e Pesquisas Em Produção Animal, 2005.

QUADROS, S.A.F.; LOBATO, J.F.P. Bioestimulação e comportamento reprodutivo de novilhas de corte. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, p.679-683, 2004.

O'CALLAGHAN, D.; LOZANO, J.M.; FAHEY, J.; GATH, V.; SNIJDERS, S.E.M.; BOLAND, M.P. Recent developments in the effect of nutrition on fertility in dairy cows. **Atti della Societa Italiana di Buiatria**, XXXII, p.9-19, 2000.

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

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

ROGÉRIO, M.C.P.; BORGES, I.; NEIVA, J.N.M.; RODRIGUEZ, N.M.; PIMENTEL, J.C.M.; MARTINS, G.A.; RIBEIRO, T.P.; COSTA, J.B.; SANTOS, S.F.; CARVALHO, F.C. Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananascomosus* L.) em dietas para ovinos. 1. Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.773-781, 2007.

RAUSCH, M.I.; TRIPP, M.W.; GOVONI, K.E.; ZANG, W.; WEBER, W.J.; CROOKER, B.A.; HOAGLAND, T.A.; ZINN, S.A. The influence of level of feeding on growth and serum insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins in growing beef cattle supplied with somatotropin. **Journal of Animal Science**, v.80, p.94-100, 2002.

ROSALES NIETO, C.A.; THOMPSON, A.N.; MACLEAY, C.A.; BRUEGEL, J.R.; HEDGER, M.P.; FERGUSON, M.B.; MARTIN, G.B. Relationships among body composition, circulating concentrations of leptin and follistatin, and the onset of puberty and fertility in young female sheep **Animal Reproduction Science**, v.151, p.148-156, 2014.

SALLES, M.G.F.; ARAÚJO A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.185-194. 2010.

SÁNCHEZ, A.G.; ROSALES-TORRES, A.M.; AGUILAR, C.G.G. Neuroendocrine effects of insulin, IGF-I and leptin on the secretion of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH). **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.15, n.1, p.79-90, 2012.

SANTOS, J.E.P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, 1998.

SARTORI, R.; MOLLO, M.R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.197-204, 2007.

SASA, A.; TESTON, D.C.; RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1150-1156, 2002.

SASA, A.; TESTON, D.C.; SILVA, E.C.F. et al. Perfil plasmático de progesterona e incidência mensal de ovulações silenciosas em borregas lanadas e deslanadas criadas no Estado de São Paulo. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA - ZOOTEC*, 11., Goiânia, 2001. **Anais [...]**. Goiânia: ZOOTEC, 2001.

SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGER, P.; MONNIAUX, D.; VINOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.444-67, 2011.

SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; MUNOZ- GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplemental nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation late. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.46, n.6, p.339-354, 2006.

SENOSY, W.; ABDEL-RAHEEM, S.M.; ABD-ALLAH, M.; FAHMY, S.; HASSAN, E.H.; DEAR, R. I. Effect of transient high-energy diets just after ovulation on ovarian performance and metabolic status in cyclic ewes. **Small Ruminant Research**, v.109, n.2, p.152-155, 2013.

SEEKALLU, S.V.; TOOSI B.M.; RAWLINGS, N.C. LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.7, n.78, 2009.

SENSORY, W.; ABDEL-RAHEEM, S.M.; ABD-ALLAH, M.; FAHMY, S.; HASSAN, E.H.; DERAR, R.I. Effect of transient high-energy diets just after ovulation on ovarian performance and metabolic status in cyclic ewes. **Small Ruminant Research**, v.109, n.2, p.152-155, 2013.

GORDON, S.; STRADAIOLI, G.; GABAI, G.; STEFANO, B. Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. **Small Ruminant Research**, v.74, n.1-3, p.123-129, 2008.

SHOJI, N.; YANHUA, Z.; DUANE, H.K.; DOUGLAS, L.; FOSTER, C.A. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. **The Endocrine Society**, v.141, n.11, 2000.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viosa: UFV, 2002.

SMITH, J.T.; CLARKE, I.J. Seasonal breeding as neuroendocrine a neuroendocrine model for puberty in sheep. **Molecular and Cellular Cellular Endocrinology**, v.324, p.102-109, 2010.

SMITH, O.B.; AKINBAMIJO, O.O. Micronutrients, and reproduction in farm animals **Animal Reproduction Science**, v.60, p.549-560, 2000.

SOUGHT, A.; CAMPBELL, B.K.; KHALID, M.; KENDALL, N.R.; SCARAMUZZI, R.J. The effect of term short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grains (*Lupinus lutes*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. **Theriogenology**, v.68, n.7, p.1037-1046, 2007.

SOUZA, D.F.S.; MONTEIRO, A.L.G.; DITTRICH, R.L.; SCHMIDT, E.M.S.; FERNANDES, S.R.; BELTRAME, L. Dinâmica pré e pós-colostral de parâmetros bioquímicos em cordeiros. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.3, 2014.

SOUZA, G.B.; NOGUEIRA, A.R.A.; SUMI, L.M. BATISTA, L.A.R. **Método alternativo para determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. (**Boletim de Pesquisa; 4**).

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.53, p.1527-1543, 1995.

SPONCHIADO, M.; GOMES, N.S.; FONTES, P.K.; MARTINS, T.; COLLADO, M.; PASTORE, A.A.; PUGLIESI, G.; NOGUEIRA, M.F.G.; BINELLI, M. Pre-hatching embryo-dependent and independent programming of endometrial function in cattle. **PlusPlus One**, v.12, n.4, p.1-23, 2017.

TENA-SEMPRE, M. GPR54, and kisspeptin in reproduction. **Human Reproduction Update**, v.12, n.5, p.631-639, 2006.

VALENTINIS, B.A.; BHALA, T.; DEANGELIS, R.; BASERGA, P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. **Molecular Endocrinology**, v.9, n.3, p.361-367, 1995.

VARELA, L.; HORVATH, T.L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **European Molecular Biology Organization**, v.13, p.1079-1086, 2012.

WADE, G.N.; JONES, J.E. Neuroendocrinology of nutritional infertility. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.287, p.1277-1296, 2005.

WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENNGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v.54, p.433-446, 2000.

WANKOWSKA, M. Influence of testicular hormones on the somatostatin-GH system during the growth promoted transition to puberty in sheep. **Theriogenology**, v.77, p.615-627, 2012.

WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, 2002.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.1-23, 2000.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors, and their binding proteins – potential relevance to reproductive physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, v.2, n.1, p.1-24, jan. 2003.

YOUNIS, L.F.; AL-MUTAR, H.A.A; ABID, A.A. Effect of leptin gene polymorphism on reproductive efficiency in alvassi ewes. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v.7, n.1, p.17-23, 2019.

ZEYDABADI, N.S.; RAMEZANI, T.F.; ZADEH-VAKILI, A. The role of kisspeptin in female reproduction. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.15, n.7-15, 2017.

ZIEBA, D.A.; SZCZESNA, M.; KLOCEK-GORKA, B.; WILLIAMS, G.L. Leptin as a nutritional regulating regulating regulating regulating signal-regulating appetite and reproductive processes in seasonally-breeding ruminants. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.59, n.9, p.7-18, 2008.

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**

2

3 **Santos, Helena Cristina Ribeiro Koharata<sup>1</sup>; Castilho, Caliê<sup>2</sup>**

4

5 <sup>1</sup>Aluna Mestrado em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente-SP.

6

7 <sup>2</sup>Docente Doutora em Ciência Animal e Medicina Veterinária, UNOESTE, Presidente  
8 Prudente-SP.

9

10 \*Autor para correpondência: calie@unoeste.br

11 **INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS NA PRÉ E**  
12 **PERIPUBERDADE DE BORREGAS SOBRE A ABUNDÂNCIA RELATIVA DE**  
13 **RNA<sub>m</sub> DE IGF-1/IGFBP3 ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E RECEPTOR DE**  
14 **LEPTINA EM CORPO LÚTEO**

15  
16 **Resumo**

17  
18 Objetivou-se investigar a influência de três diferentes sistemas nutricionais na pré e  
19 peripuberdade em borregas por meio da expressão gênica de enzimas e proteínas em corpos  
20 lúteos (CLs) de diestro, tais como, fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), da  
21 proteína ligadora de IGF3 (IGFBP3), da proteína reguladora aguda da esteroidogênese  
22 (STAR), da 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B) e do receptor de leptina (LEPR).  
23 Para a obtenção dos CLs, foram utilizadas 24 borregas (7/8 Dorper), com idades entre 6 e 7  
24 meses as quais foram aleatoriamente distribuídas em 1 de 3 grupos alimentares, sendo eles G-  
25 Sub (n=7) (70%-80% da exigência do National Research Council [NRC]); G-Control (n=8)  
26 (100-110% [NRC] ambas mantidas em pastagem de *Panicum maximum cv. Tanzânia* com  
27 acesso a água e sal mineral *ad libitum* e o grupo G-Super (n=8) (140% [NRC]) recebendo  
28 1,5% do peso vivo de ração comercial duas vezes ao dia e que ficaram confinadas durante  
29 todo o período experimental, recebendo dieta total, na proporção volumoso concentrado de  
30 20:80, contendo 16% de Proteína Bruta (PB) e 72% de Nutrientes Digestíveis Totais (NDT),  
31 visando ganho de peso diário de 200g/dia conforme NRC. Com peso de 35kg as borregas  
32 foram sincronizadas pela inserção de um dispositivo vaginal de liberação lenta de  
33 progesterona (CIDR<sup>®</sup>) por 12 dias, posteriormente, foram abatidas e o aparelho reprodutor  
34 removido para pesagem e processamento das amostras de CLs para posterior análise da  
35 expressão gênica. Os fragmentos (40mg) foram submetidos ao protocolo de extração do  
36 Trizol<sup>®</sup> (ThermoFisherScientific<sup>®</sup>) de extração total. Foi realizado a transcrição reversa  
37 utilizando o protocolo da Superscript<sup>®</sup> III (Invitrogen<sup>™</sup>, Termo Fisher Scientific, Brasil) e a  
38 qPCR para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. A partir da análise estatística,  
39 notou-se que houve efeito do manejo nutricional na abundância relativa do receptor de leptina  
40 , o qual foi maior nas borregas do grupo G-Super. Já as enzimas HSD3B1 (p= 0,1085) ,  
41 STAR (p = 0,6516), IGF (p= 0,3277) e IGFBP3 (p= 0,12) não diferiram de acordo com o plano  
42 nutricional. Concluiu-se que os diferentes planos nutricionais ofertados para as borregas na  
43 pré e peripuberdade impactaram no peso corporal e consequentemente na abundância relativa  
44 dos receptores de Leptina de forma significativa.

45 **Palavras-chave:** ovinos. HSD3b. leptina. IGF. IGFBP3. STAR.

46  
47  
48 **Abstract**

49  
50 This study aimed to investigate the influence of different nutritional systems in pre and  
51 peripuberty in ewe lambs through the gene expression of enzymes and proteins in diestrus  
52 corpora lutea (CL), such as insulin-like growth factor 1 (IGF-1), binding protein IGF3  
53 (IGFBP3), Steroidogenic acute regulatory protein (STAR), the 3 $\beta$ -hydroxysteroid  
54 dehydrogenase (HSD3B) and the leptin receptor (LEPR). The CLs were obtained by first  
55 selecting the ewe lambs for feeding, 24 ewe lambs (7/8 Dorper), aged between 6 and 7  
56 months were used as they were randomly distributed into 1 of 3 food groups, being G-Sub  
57 (n=8) (70%-80% of the requirement from the National Research Council [NRC]); G-Control  
58 (=8) (100-110% [NRC] both in *Panic maximum cv. Tanzania* pasture with access to water  
59 and mineral salt *ad libitum* and group G-Super (n=8) (140% [NRC] receiving) 1 , 5 of the live  
60 weight of commercial ration twice a day and that was confined throughout the experimental

61 period, receiving diet during the total, in the roughage proportion 20:80, containing 16% of  
62 Gross Protein Concentrate (CP) and 72% of Digestible proportion Totals (NDT), aiming at  
63 daily weight gain of 200g/day according to NRC. Weighing 35kg, each lamb were  
64 synchronized by the insertion of a vaginal device for slow reading of progesterone (CIDR®)  
65 for 12 days, later, they were slaughtered and the reproductive apparatus, including the corpus  
66 luteum, were removed for weighing and processing into samples for analysis of gene  
67 expression. The samples (40mg) were performed using the total removal protocol of Trizol®  
68 (ThermoFisherScientific®) ® III (Invitrog en TM, Termo Fisher Scientific, Brazil) and qPCR  
69 for an analysis of relative gene expression. From the statistical analysis, it was possible to  
70 note that there was an effect of nutritional management on the relative abundance of the leptin  
71 receptor, which was higher in ewes G-Super group. The enzymes HSD3B1 (p=0.1085),  
72 STAR (p=0.6516), IGF (p=0.3277) and IGBP3 (p=0.12) did not differ according to the  
73 nutritional systems offered. It was possible to concluded that the different nutritional systems  
74 offered to ewes in pre and peripuberty had a significant impact on body weight and  
75 consequently on the relative of Leptin receptors.

76 **Keywords:** sheep. HSD3b. leptin. IGF. IGFBP3. STAR.

77

78

## 79 INTRODUÇÃO

80

81

82 Além da genética, fatores ambientais, como o status nutricional, influenciam no eixo  
83 reprodutivo animal. O início da puberdade e a manutenção da função reprodutiva estão  
84 fisiologicamente ligados à nutrição e à condição corporal, sendo esta definida como o  
85 despertar do eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal (SMITH; CLARKE, 2010).

86

87 Nutrições restritivas resultam na supressão da liberação pulsátil de Hormônio  
88 Luteinizante (LH) e na cessação da atividade gonadal, GnRH, responsáveis pelas atividades  
89 ovarianas e assim, postergam a puberdade em várias espécies, incluindo ovelhas (FOSTER,  
90 BUCHOLTZ, HERBOSA, 1995 *apud* SHOJI *et. al.*, 2000; MEZA-HERREIRA *et al.*, 2009).  
91 Em contrapartida, a secreção de hormônio do crescimento GH aumenta em humanos e  
92 ovelhas quando presentes em sistemas nutricionais restritos (FRIEDMAN, HALAAS, 1998).

93

94 Além de uma nutrição balanceada, para que a primeira ovulação ocorra, é necessário  
95 que as borregas atinjam um peso específico corporal. A média do peso das fêmeas deve ser  
96 em torno de 60% do peso adulto das ovelhas do rebanho, assim, faz-se necessário o  
97 investimento em uma boa nutrição (KOYUNCU; CANBOLAT, 2009). Ademais do peso  
98 corporal, as enzimas e proteínas estão intimamente ligadas a cascata de esteroidogênica e à  
99 idade a puberdade.

100

As enzimas STAR e HSD3D determinam os primeiros passos na esteroidogênese da  
fêmea pré-púbere (JIANG, Y. F. *et al.*, 2011). A enzima STAR tem o papel de transportar o  
colesterol para dentro da mitocôndria, de modo que esse será convertido em pregnenolona e,  
posteriormente, em progesterona (GIOMETTI *et al.*, 2009). Enquanto que as beta-

101 hidroxisteroides desidrogenases (HSD3D) estão envolvidas tanto na biossíntese quanto no  
102 metabolismo de esteroides, além de possuírem um papel importante na fisiologia e  
103 desenvolvimento de mamíferos, incluindo a determinação e diferenciação do sexo (JIANG, Y.  
104 F. et al., 2011).

105 Também envolvido com a cascata esteroidogênica, a presença da leptina desempenha  
106 um papel muito importante no sistema nervoso central (SNC) do animal sinalizando que o  
107 peso encontra-se adequado para a reprodução, a partir disso, ocorre a secreção de fator de  
108 crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e conseqüentemente da proteína ligadora IGF3  
109 (IGFBP3) (BOSSIS *et al.*, 1999) que promovem a foliculogênese, ovulação, fertilização,  
110 implantação e posteriormente o desenvolvimento do embrião (FOSTER e NEGATANI,  
111 1999).

112 A puberdade e os eventos reprodutivos são controlados por diversas interações entre  
113 sinais regulatórios do cérebro, hipófise e gônada que, por sua vez, são altamente influenciados  
114 pelo nível nutricional do animal e conseqüentemente pelos hormônios e metabolismo  
115 energético (SORIANO, 2021). Nessa visão, dentre vários fatores que podem causar resultados  
116 negativos, a nutrição é um dos fatores mais acessíveis para ser modificado pelo produtor para  
117 assegurar resultados satisfatórios (SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

118 Entende-se que a puberdade é, portanto, a demarcação do processo reprodutivo e  
119 produtivo que reflete na economia e no melhoramento genético, uma vez que, seu  
120 adiantamento possibilita um retorno mais rápido do investimento, aumento da vida útil animal  
121 e reduz o intervalo entre gerações (EMERICK *et al.*, 2009).

122 Em virtude dos fatos mencionados, o presente estudo teve como objetivo investigar a  
123 influência de três diferentes sistemas nutricionais de borregas na peripuberdade sobre a  
124 funcionalidade do CL observada pela concentração plasmática de progesterona, e abundância  
125 relativa do RNAm do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), da proteína  
126 ligadora de IGF3 (IGFBP3), da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR), da 3B-  
127 hidroxisteroide desidrogenase (HSD3B) e do receptor de leptina (LEPR) em tecido luteal.

128

## 129 MATERIAL E MÉTODOS

130

131 Trata-se de um estudo experimental devidamente cadastrado e aprovado pela CPDI e  
132 pelo Comitê de ética no utilização de animais (CEUA), da Unoeste, sob protocolo número  
133 4393.

134 O experimento tomou lugar no Centro Zootécnico da Universidade do Oeste Paulista –  
135 UNOESTE, localizado no Campus II, na cidade de Presidente Prudente, Oeste do Estado de  
136 São Paulo (latitude de 22°07 norte e longitude 51°23’).

137 Um total de 24 borregas (7/8 Dorper) foram selecionadas e pesadas, com idades entre  
138 6 a 7 meses provenientes do mesmo rebanho de matrizes e nascidas de partos sincronizados  
139 após IATF com sêmen do mesmo reprodutor. Posteriormente, as ovelhas foram distribuídas  
140 de forma aleatória em três grupos com oferta nutricional diferente: G-Sub (n=7) (70-80% da  
141 exigência do National Research Council [NRC]), G-Control (n=8) (100-110% [NRC]) e G-  
142 Super (n=8) (140% [NRC]). Desta forma o nível de exigência nutricional dos grupos  
143 experimentais acima citados foi elaborado de acordo com a realidade do ovinocultor brasileiro  
144 e os diferentes tipos de planos nutricionais adotados.

145 Os animais do grupo G-Sub (n=8) foram mantidos a pasto (*Panicum maximum cv.*  
146 *Tanzânia*), com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. O grupo G-Control (n=8) também  
147 permaneceu a pasto, porém recebendo 1,5% do peso vivo de ração comercial<sup>®</sup> (FORT  
148 OVINOS 16, FORTSAL<sup>®</sup>) para ovinos contendo: proteína bruta mínima (160 g/kg); NDT  
149 estimado (720 g/kg); extrato etéreo mínimo (33g/kg); fibra bruta máxima (62 g/kg); FDA  
150 máximo (70 g/kg); material mineral máximo (50g/kg); cálcio máximo (18g/kg); cálcio  
151 mínimo (17g/kg) e fósforo mínimo (8000mg/kg). As borregas do G-Sub e G-Control foram  
152 mantidas a pasto em módulo rotacionado (HEGARTY *et al.*, 2006), totalizando área de 0,8  
153 hectares, subdivididos em 4 piquetes de aproximadamente 2.000m<sup>2</sup>, onde permaneceram por  
154 9 dias em cada piquete com período de descanso do capim de 27 dias e área de pastagem de  
155 22m<sup>2</sup> por animal.

156 As borregas do grupo G-Super (n=8) ficaram confinadas durante todo o período  
157 experimental, recebendo dieta total, na proporção volumoso/concentrado de 20:80, em cocho  
158 individual, com acesso a água e sal mineral (quelatado) *ad libitum*. O volumoso utilizado foi  
159 feno de *Tifton* e o concentrado a ração comercial citada acima, contendo 16% de PB e 72% de  
160 NDT, visando ganho de peso diária de 200g/dia conforme NRC (2007). Inicialmente as  
161 ovelhas receberam 3,5% do peso vivo da dieta total (feno+ração), sendo esta porcentagem  
162 aumentada até atingir em média de 4,5 a 5% do peso vivo (ROGÉRIO *et al.*, 2007;  
163 PARENTE *et al.*, 2009).

164 As ovelhas dos grupos G-Control e G-Super foram alimentadas, duas vezes ao dia, às  
165 oito horas da manhã e 4 horas da tarde, durante o experimento, sendo pesadas a cada 15 dias  
166 para ajuste da dieta em função do peso vivo.

167 Ao atingir o peso corporal de 35kg as ovelhas foram sincronizadas pela inserção de  
168 um dispositivo vaginal de liberação de progesterona (Easy-Breed CIDR<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) por  
169 12 dias. No dia da retirada do implante (D12) foram administrados, por via intramuscular,  
170 0,075mg de cloprostenol (cloprostenol, Veteglan<sup>®</sup>, HertapeCalier, Brasil) e 300 UI de  
171 gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Brasil).

172 Posteriormente, foi realizado o abate após 5 dias da ovulação, para isso, as ovelhas  
173 ficaram 18h em jejum e foram insensibilizadas por meio de uma descarga elétrica de 0,50 A  
174 por 8 segundos, conforme metodologia proposta por Gomide (2006), sendo um método  
175 efetivo, induzindo a insensibilidade instantânea. A seguir foi realizada a sangria, pela secção  
176 das veias jugulares e as artérias carótidas.

177 Imediatamente após o abate, o aparelho reprodutor foi localizado e seccionado,  
178 mantido em gelo e enviado para o laboratório para processamento das amostras. Os CLs  
179 foram seccionados em pelo menos 3 fragmentos e pesados (aproximadamente 40mg) e em  
180 seguida foram imediatamente depositados, individualmente, em criotubos e congelados em  
181 nitrogênio líquido (-196°C), posteriormente ficaram armazenados em freezer -80°C até a  
182 realização da RT-qPCR.

183 Os fragmentos de CLs foram triturados em um homogeneizador de tecidos e  
184 submetidos ao protocolo de extração do Trizol<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>) de extração total.  
185 A concentração de RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria. Todas as  
186 amostras de RNA total foram tratadas com DNase abres de serem submetidos ao RT-qPCR,  
187 conforme as instruções do protocolo DNaseI – Amplification Grade (Invitrogen<sup>®</sup>).

188 A transcrição reversa foi realizada utilizando o protocolo High Capacity (Termo  
189 FisherScientific, Brasil), seguindo protocolo fabricante.

190 A qPCR foi realizada para análise quantitativa da expressão gênica relativa. Como  
191 controle interno das reações PCR em tempo real foi utilizado o gene endógeno glicose-6-  
192 fosfato-desidrogenase (G6PD).

193 Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes-alvos no CL foram: fator de  
194 crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), gene de proteína ligadora de IGF3 (IGFBP3),  
195 gene da regulatória esteroideogênica aguda (STAR), 3B-hidroxiesteroide desidrogenase  
196 (HSD3B) e receptor de leptina (LEPR). Todos os oligonucleotídeos iniciadores e suas  
197 respectivas sondas para os genes alvos e endógeno serão obtidos a partir de ensaios TaqMan<sup>®</sup>  
198 (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster, USA), já padronizados (Quadro 2).

199  
200

201 **Quadro 2.** “Primers” (oligonucleotídeos iniciadores) que serão utilizados na qPCR.

“Primers	Gene	GeneBank	Produto
IGF1	Alvo	NM_001009774.3	62 PB
IGFBP3	Alvo	NM_001159276.1	66 PB
STAR	Alvo	NM_001009243.1	69 PB
HSD3B	Alvo	NM_001135932.1	85 PB
LEPR	Alvo	NM_001009763.1	69 PB
G6PD	Endógeno	NM_001093780.1	73 PB

202 **Fonte.** Dos autores.

203

204 As PCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão foi  
205 determinada pela quantificação em relação ao gene controle. Para quantificação relativa das  
206 ampliações foi empregado o método Pfaffl (2001).

207

## 208 ANÁLISE ESTATÍSTICA

209

210 Para a análise estatística da abundância relativa de IGF-1, IGFBP3, STAR, HSD3B e  
211 LEPR de acordo dos três grupos de borregas em função do plano nutricional, inicialmente, os  
212 dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de *Shapiro-wilk*. A seguir foi  
213 utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de *Tuckey* quando houve diferença,  
214 levando em consideração 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

215

## 216 RESULTADOS

217

218 Os três tipos de manejos nutricionais usados neste estudo durante a pré e  
219 peripuberdade das borregas, não influenciou significativamente no peso dos órgãos como os  
220 ovários direito e esquerdo (Tabela 1). Entretanto, houve uma influência no peso dos animais  
221 G-Super ( $p = 0,0002$ ).

222

223 **Tabela 1.** Efeito do plano nutricional sobre a média e desvio padrão dos pesos dos ovários  
224 (direito e esquerdo) e peso vivo das n=borregas no dia do abate nos grupos G-Sub (n=7), G-  
225 Control (n=8) e G-Super (n=8).

	Peso ovário esquerdo (g)	Peso ovário direito (g)	Peso vivo (kg) no dia do abate
<b>G-Sub</b>	1.314±0.523	0.960±0.401	35.214±1.983
<b>G-Control</b>	0.881±0.441	2.390±3.070	36.050±2.522
<b>G-Super</b>	0.960±0.401	1.259±0.405	40.911±2.547

226

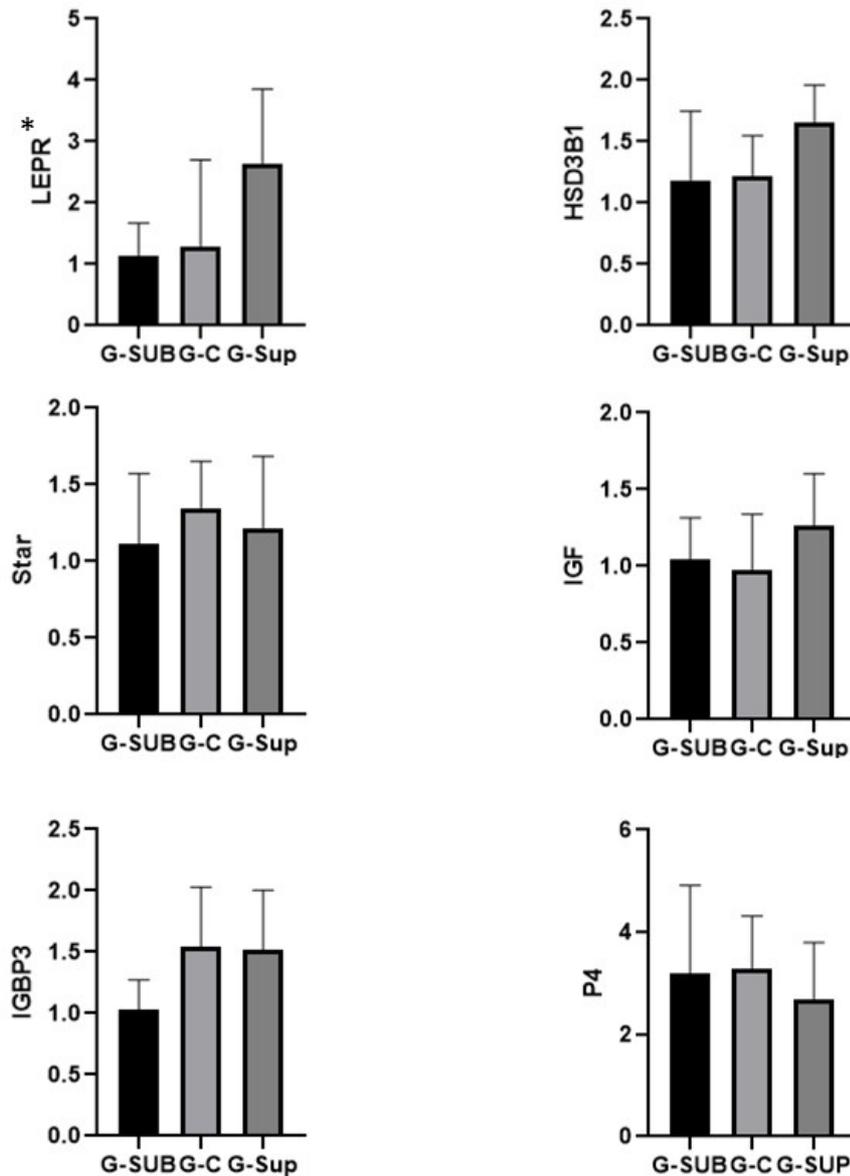
Fonte: Dos autores.

227

228 Houve efeito ( $p=0,0125$ ) do manejo nutricional na abundância relativa do receptor de  
 229 leptina (LEPR), o qual foi maior nas borregas do grupo G-Super e não diferiu entre os grupos  
 230 G-Sub e G-Control (Figura 1).

231 Já expressão dos genes das enzimas HSD3B1 ( $p= 0,1085$ ), STAR ( $p = 0,6516$ ), IGF  
 232 ( $p= 0,3277$ ) e IGBP3 ( $p= 0,12$ ) não diferiram de acordo com o plano nutricional (Figura 1).

233



234

235

236 **Figura 1.** Efeito da nutrição (Média  $\pm$  EPM) sobre a abundância relativa de RNAm receptor de leptina  
 237 (LEPR), fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), gene da proteína ligadora de IGF 3  
 238 (IGFBP3), gene regulatória da esteroidogênese aguda (STAR), 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase  
 239 (HSD3B) e Progesterona (P4) em corpos lúteos de borregas submetidas a diferentes planos  
 240 alimentares na pré e peripuberdade, nos grupos G-Sub (n=7), G-Control (n=8) e G-Super (n=8)  
 241 alimentadas.

241

242

**243 DISCUSSÃO**

244

245 Estudos explicam que o balanço energético positivo, ou seja, o manejo realizado para  
246 o grupo G-Super leva ao aumento das concentrações de receptores de leptina e insulina no  
247 sangue além do aumento da captação de glicose, e conseqüentemente essas alterações afetam  
248 diretamente o ovário e estão associadas ao aumento da foliculogênese e aumento da taxa de  
249 ovulação em borregas.

250 Outro estudo também mostrou que ovelhas com maior peso corporal possuíram um  
251 nível maior de leptina quando comparado com ovelhas magras em restrição alimentar  
252 (CHILLIARD *et al.*, 2001).

253 A alteração da leptina pode ser explicada pelo fato de que ela responde à mudanças  
254 agudas na dieta e também mede as reservas de energia corporal a longo prazo, ou seja, quanto  
255 maiores essas reservas, maior será a concentração sanguínea de leptina no animal. Nesse  
256 sentido, nutrições baixas em nutrientes ou animais em jejum prolongado acarretarão na  
257 redução dos níveis de RNAm da leptina, como verificado na abundância relativa enzimática  
258 obtida no grupo de borregas G-Sub e G-Control, as quais tiveram um menor ganho de peso  
259 (BLACHE *et al.*, 2000).

260 Tanto a expressão gênica quanto as concentrações plasmáticas de leptina circulantes  
261 ficam reduzidas de forma significativa em ovelhas desnutridas (ADAM *et al.*, 2003 *apud*  
262 BOCQUIER *et al.*, 1998; BLACHE *et al.*, 2000; DELAVALAUD *et al.*, 2000; MARIE *et al.*,  
263 2001).

264 Na mesma linha de raciocínio, segundo Williams *et al.* (2002), a expressão de leptina  
265 é aumentada pela disponibilidade de glicose, insulina, hormônios esteróides, em  
266 contrapartida, sua expressão é diminuída devido ao jejum, baixa proporção de gordura em  
267 relação à massa corporal e hormônio do crescimento (GH) entre outros fatores relacionados.  
268 Dessa forma, entende-se que um sistema de manejo abundante e variado proporciona  
269 melhores condições nutricionais e até reprodutivas como é o caso observado em G-Super.

270 Quando o animal se encontra em uma situação metabólica positiva, como é o caso do  
271 G-Super, o maior consumo de energia aumenta os níveis de glicose, insulina e  
272 conseqüentemente, aumenta o fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-1)  
273 (SANTOS,1998) que, de acordo com os resultados obtidos, mostrou-se satisfatório e  
274 condizente com o presente estudo. Por outro lado, em balanço energético insatisfatório  
275 observa-se o efeito reverso, com ocorrência de hipoglicemia, hipoinsulinemia, supressão de

276 IGF e aumento de GH plasmático, este por sua vez, foi relatado por Friedman e Halaas (1988)  
277 com níveis elevados em humanos e ovelhas em pobre status nutricional.

278 O IGF-1 e IGFBP3 não sofreram influência do plano alimentar. Em estudos  
279 realizados por Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002) foi constatado que a suplementação nutricional  
280 de curto prazo não demonstrou efeito sobre a concentração plasmática de IGF-1.

281 Em uma outra pesquisa comparando a infusão intravenosa de glicose em ovelhas e a  
282 ingestão oral de suplementação duas vezes ao dia, a insulina e a leptina plasmáticas  
283 aumentaram de forma aguda na infusão intravenosa. Em contrapartida, com ingestão oral em  
284 até 5 dias, o aumento foi lento e gradual. Já o IGF-1 não sofreu alteração em sua abundância  
285 relativa enzimática levando à suposição de que os efeitos nutricionais de curto prazo sobre o  
286 sistema IGF no folículo envolvam mecanismos ligados aos sistemas insulina-glicose e leptina  
287 (SCARAMUZZI RJ, 2011).

288 Outros estudos relatados por Lozano *et al.* (2003), sugerem que a desnutrição reduz  
289 as concentrações de IGF-1 em ovelhas e gado leiteiro. Para Luna-Pinto & Cronjé (2000), em  
290 uma pesquisa utilizando novilhas pré-puberes em manejo nutricional negativo foi encontrado  
291 diferenças em concentrações de leptina, IGF-1 e IGFBP3.

292 Os níveis elevados de IGF-1 em todos os grupos de ovelhas (G-Sub, G-Control e G-  
293 Super) neste estudo podem ser explicados, hipoteticamente, pela subalimentação (períodos  
294 críticos) que desencadeia em alguns órgãos, como o cérebro e o coração, a ação de  
295 preservação da síntese de IGF-1 na circulação (BREIER *et al.*, 2000).

296 A enzima STAR está relacionada com a esteroidogênese ovariana, ela tem o papel de  
297 auxiliar na captura do colesterol para síntese de progesterona feita pela enzima HSD3B  
298 (GERVÁSIO *et al.*, 2014). Assim, entende-se que o fato de existir um balanço nutricional  
299 positivo contribui significativamente para a atuação da atividade enzimática e por isso há uma  
300 maior abundância relativa de STAR no grupo de ovelhas G-Super. Por outro lado, as médias  
301 encontradas nos grupos G-Sub e G-Control também estão altas, e isso, pode ser devido ao  
302 motivo de que as borregas em estado nutricional negativo apresentam significativa  
303 concentração séricas de colesterol, portanto, supõe-se que haveria uma maior atividade da  
304 enzima para esse estado também, como observado em G-Sub. Nesse mesmo sentido, a  
305 abundância relativa da enzima HSD3B também apresenta médias elevadas devido a sua  
306 atuação conjunta com a STAR na cascata de esteroidogênese na conversão de pregnenolona  
307 em progesterona (P4).

308 A enzima HSD3B encontra-se em níveis elevados quando o corpo lúteo (CL) está em  
309 desenvolvimento, enquanto que a fase de regressão do CL é marcada pela redução do número

310 de células que expressam a enzima (CONLEY *et al.* 1995; BAO; GARVERICK 1998). Além  
311 disso, a abundância relativa do RNAm da enzima é diretamente proporcional ao hormônio  
312 progesterona, assim, como as médias da enzima HSD3B foram relativamente altas para os  
313 três manejos, a progesterona também não diferiu significativamente entre os grupos.

314 Ainda com relação a P4, é possível notar que, apesar de estar relativamente elevada  
315 nos três grupos de ovelhas, ela se encontra discretamente inferior no G-Super quando  
316 comparado com G-Control e G-Sub, respectivamente, pelo raciocínio, levando em  
317 consideração que a atividade da progesterona estaria mais elevada em ovelhas com maior  
318 massa corporal devido abundância de colesterol, como já citado anteriormente, tal fato pode  
319 ser explicado, de acordo com Macedo (2010), que planos nutricionais altos reduzem os teores  
320 plasmáticos de progesterona devido ao aumento do fluxo sanguíneo hepático e à degradação  
321 acelerada do hormônio, uma vez que o fígado é o principal órgão de metabolismo de  
322 esteróides, podendo metabolizar 95% da progesterona em uma única passagem e diminuir os  
323 níveis do hormônio (MACEDO, 2010). O mesmo achado foi relatado por O'Callaghan *et al.*  
324 (2000) em ovelhas com alimentação abundante onde as concentrações de progesterona foram  
325 reduzidas quando comparada às ovelhas sob uma alimentação restrita.

326 É sabido que os hormônios esteróides são seletivamente armazenados em gorduras,  
327 desse modo, planos alimentares que resultam na mobilização de gordura pode resultar na  
328 liberação de progesterona estocada. Isto explica os níveis elevados de P4 no G-Sub, onde  
329 houve aumento da progesterona mesmo em baixo plano nutricional (PAULA, 2004 *apud*  
330 Mann *et al.*,1996).

331 Estudos anteriores comprovaram o aumento do IGFBP3 durante períodos de estado  
332 nutricional positivo em novilhas pré-pubescentes, sendo que no período de puberdade houve uma  
333 queda da abundância relativa do RNAm da enzima (LUNA-PINTO; CRONJÉ, 2000). É  
334 notável que o manejo nutricional exerce um papel de grande influência na eficiência  
335 reprodutiva de forma direta, na oferta de nutrientes para as funções fisiológicas, e na forma  
336 indireta na síntese de hormônios e na quantidade de receptores nas células e suas interações  
337 metabólicas.

338 Os impactos nutricionais causados na reprodução continuarão sendo um assunto de  
339 intensa investigação, uma vez que, o manejo nutricional é fator de fácil acesso que pode ser  
340 manipulado pelos criadores de animais de produção visando precocidade e lucratividade.

341

342

343

344 **CONCLUSÃO**

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354 **REFERÊNCIAS**

355

356

357 ADAM, C. L.; ARCHER Z.A.; MILLER, D.W. Leptin actions on the reproductive  
358 neuroendocrine axis in sheep. *Reproduction*. **Cambridge, England**. Supplement vol. 61: 283-  
359 97. 2003.

360

361 BAO B.; GARVERICK H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor  
362 genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76:1903-1921. 1998.

363

364 BLACHE D.; TELLAM R.L.; CHAGAS L.M.; BLACKBERRY M.A.; VERCOE P.E.;  
365 MARTIN G.B. Level of nutrition affects leptin Concentra Concentra Concentra Concentra  
366 Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra Concentra concentrations in  
367 plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J Endocrinol* 2000.

368

369 BREIER, B. H. et al. Regulation of growth and metabolism during postnatal  
370 development. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction*.  
371 **London: CAB International**, 2000.

372

373 CHILLIARD, Y., BONNET, M., DELAVAUD, C., FAULCONNIER, Y., LEROUX, C.,  
374 DJIANE, J. & BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and  
375 mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic. Anim. Endocrinol.* 21:  
376 271–295. 2001.

377

378 CONLEY A.J., KAMINSKI M.A, DUBOWSKY S.A., JABLONLA-SHARIFF A.,  
379 REDMER D.A.; REYNOLDS L.P. Immunohistochemical localization of 3 dehydrogenases  
380 and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and  
381 cows. *Biol. Reprod.* 52:1081-1094. 1995.

382

383 DELAVAUD, C.; BOCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D. H.; GERTLER, A.  
384 KANN, G. Plasma leptin determination in ruminants: Effect of nutritional status and body  
385 fatness on plasma leptin concentrations specifically by specified by RIA in sheep. *Journal*  
386 **Endocrinology**, v. 165, p. 519-526, 2000.

387

- 388 EMERICK, L. L.; DIAS J. C.; GOLÇALVES P. E. M.; MARTINS J. A. M.; LEITE, T. G.;  
389 ANDRADE, V. J.; VICENTE, R. V. F. Aspectos relevantes sobre a puberdade em fêmeas.  
390 **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.11-19, jan./mar. 2009.  
391
- 392 FRIEDMAN J.M; HALAAS J.L. **Leptin and the regulation of body weight in<sup>[1]</sup>mammals.**  
393 Nature 395:763–770, 1998.  
394
- 395 GERVÁSIO, C. G.; BERNUCI, M. P.; SILVA-DE-SÁ, M.F.; ROSA-E-SILVA, A.C.J.S. The  
396 role of androgen hormones in early follicular development. ISRN obstetrics and gynecology,  
397 v. 2014, p. 1-11, 2014.  
398
- 399 GIOMETTI I.C.; CASTILHO A.C.S.; SÁ-FILHO O.G.; PAPA P.C.; BURATINI J.R.J.  
400 Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. **Revista**  
401 **Brasileira Reprodução Animal**, v.33, p.34-52, 2009.  
402
- 403 GOMIDE,L.A.M. **Tecnologia de abate e tipificação de carcaças.** UFV, 2006.  
404
- 405 HEGARTY, R.S.; SHANDS, C.; MARCHANT, R.; HOPKINS, D.L; BALL, A. J.  
406 HARDEN, S. Effects of available nutrition and sire breeding values for growth and muscling  
407 on the development of crossbred lambs 1: Growth and carcass characteristics. **Australian**  
408 **Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 593-604, 2006.  
409
- 410 JIANG, Y. F.; TSUI, K. H.; WANG, P. H.; LIN, C. W.; WANG, J. Y.; HSU, M. C.; CHEN,  
411 Y. C.; CHIU, C. H. Hypoxia regulates cell proliferation and steroidogenesis through protein  
412 kinase A signaling in bovine corpus luteum. **Anim Reprod Sci**, v. 129, n. 3-4, p. 152-161,  
413 2011.<sup>[1]</sup>  
414
- 415 KOYUNCU, M.; CANBOLAT, O. Effect of different dietary energy  
416 levels on the reproductive performance of Kivircik sheep under a semi-intensive semi-  
417 intensive system in the South-Marmara region of Turkey. **Animal Feed Science and**  
418 **Technology**, 50 (6), 243-248. 2009.  
419
- 420 LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of  
421 nutrition on the effectiveness of programmes programs programs programs programs  
422 programs programs programs grams. In wes: effect on oocyte quality and post-fertilization  
423 development. **Reproduction**. V.125, p. 543 - 553, 2003.  
424
- 425 LUNA-PINTO, G.; CRONUÉ, P.B. The roles of the insulin-like growth factor system and  
426 leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and  
427 compensatory growth in dairy heifers. **South African Journal of Animal Science**, v.30, n.2,  
428 p. 155 - 163, 2000.  
429
- 430 MARIE M., FINDLAY P.A., THOMAS L., ADAM C.L. Daily patterns of plasma leptin in  
431 sheep: effects of photoperiod and food intake. **J Endocrinol**, v. 170, p. 277-286, 2001.  
432
- 433 MEZA-HERRERA, C.A; GONZALEZ-BULNES, A KRIDLI, R.T.; MELLADO, M.  
434 ARECHIGA-FLORES, C.F; SALINAS, H.; LUGINBUHL, J.M. Neuroendocrine Metabolic  
435 and Genomic Cues Signalling the Onset Puberty in Females. **Reproduction in Domestic**  
436 **Animals**, v45, M.6, p. 943-1134, 2009.  
437

- 438 MUÑOZ-GUTIÉRREZ M.; BLACHE D.; MARTIN G.B.; SCARAMUZZI R.J.  
439 Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep  
440 after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding.  
441 **Reproduction**. 2002.  
442
- 443 NRC. Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world  
444 camelids. **National Academy Press**, 384 p. 2007.  
445
- 446 O'CALLAGHAN, D.; LOZANO, J.M.; FAHEY, J.; GATH, V.; SNIJDERS, S.E.M.;  
447 BOLAND, M.P. Recent developments in the effect of nutrition on fertility in dairy cows. **Atti**  
448 **della Societa Italiana di Buiatria**. XXXII 9-19, 2000.  
449
- 450 PARENTE, H. N.; MACHADO, T.M.M; CARVALHO, F.C; GARCIA, R.; ROGERICI,  
451 M.C.P BARROS, N.N.N; ZANINE; "A.M. Desempenho produtivo de ovinos. Em  
452 confinamento, alimentados com diferentes dietas. **Ara. Bras. Med. Vet. Zootec.**, V.61,n.2,  
453 p.460-466, 2009.  
454
- 455 PAULA, N. R. de O. Influência da nutrição sobre a função ovariana de caprinos explorados  
456 no nordeste do brasil. **Dissertação de mestrado em Reprodução e Sanidade animal**.  
457 Universidade Estadual do Ceará. 2004.  
458
- 459 PFAFFL, M.W.A new mathematical model for relative quantification in real-time RT- PCR.  
460 **Nucleic Acids Res**. V.29, p.2002-2007, 2001.  
461
- 462 ROGÉRIO, M.C.P. BORGES, I; NEIVA, J.N.M; RODRIGUEZ, NM.: PIMENTEL. J.C.M.j  
463 MARTINS, G.A.; RIBEIRO, T. P.; 'COSTA, J.B.; SANTOS, S.F.; CARVALHO. F.C. Valor  
464 nutritivo do resíduo da industria processadora de abacaxi (*Ananascomosus* L.) em dietas para  
465 ovinos. 1. Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado. **Arq. Bras.**  
466 **Med. Vet. Zootec.**, V.59, p.773-781, 2007.  
467
- 468 SANTOS JEP, AMSTALDEN M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arq. Fac. Vet.**  
469 **UFRGS**. 1998.  
470
- 471 SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.A.; DUPONT,  
472 J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTY,  
473 K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGER, P.; MONNIAUX, D.; VINOLES, C.; WEBB,  
474 R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate. **Reproduction,**  
475 **Fertility and Development**, v.23, p.444–67, 2011.  
476
- 477 SHOJI N.; YANHUA Z.; DUANE H. K.; DOUGLAS L.; FOSTER, CRAIG A. JAFFE.  
478 Leptin Regulates Pulsatile Luteinizing Hormone and Growth Hormone Secretion in the  
479 Sheep. Vol. 141. No. 11. Printed in USA. **The Endocrine Society**, 2000.  
480
- 481 SMITH, J.T.; CLARKE, I.J, Seasonal breeding as neuroendocrine a neuroendocrine model  
482 for puberty in sheep. **Molecular and Cellular Cellular Endocrinology**, V, 324, p. 102-109,  
483 2010.  
484
- 485 SMITH, O.B; AKINBAMIJO, O.O. Micronutrients, and reproduction in farm animals.  
486 **Animal Reproduction Science**, v.60, p. 549-560, 2000.  
487

488 SORIANO G. A. M. Impacto de diferentes sistemas alimentares na peripuberdade sobre a  
489 anatomo-fisiologia reprodutiva de borregas. **Dissertação de Doutorado**. Unoeste, 2021.  
490  
491  
492  
493  
494  
495

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ZYGOTE

### Preparing your materials

#### Policy on prior publication

When authors submit manuscripts to this journal, these manuscripts should not be under consideration, accepted for publication or in press within a different journal, book or similar entity, unless explicit permission or agreement has been sought from all entities involved. However, deposition of a preprint on the author's personal website, in an institutional repository, or in a preprint archive shall not be viewed as prior or duplicate publication. Authors should follow the Cambridge University Press [Preprint Policy](#) regarding preprint archives and maintaining the version of record.

#### Scope

*Zygote* is an international journal dedicated to the rapid publication of original research in early embryology. It covers interdisciplinary studies in animals and humans, from gametogenesis through fertilization to gastrulation. The scope includes gametogenesis, sperm–oocyte interaction, gamete and embryo physiology, cell polarity, cell–cell interactions, nuclear transfer, haploidization, molecular genetics, developmental genetics, *in-vitro* fertilization, and stem-cell and cryoconservation technologies. **Please note:** papers of a technical nature or which involve industrial-scale IVF are not suitable for *Zygote* and should be submitted elsewhere.

The editors favour work describing fundamental processes in the cellular and molecular mechanisms of animal development, and, in particular, the identification of unifying principles in biology. New technologies, clinical papers, review articles, debates and letters will become prominent features.

#### Submissions

All manuscripts must be submitted online at:

<http://mc.manuscriptcentral.com/zygote>

Submission of a paper will be taken to imply that it is unpublished and it is not being considered for publication elsewhere.

There is no formal restriction on length; however, *Original Articles* and *Reviews* of less than 15000 words are likely to appear sooner than longer ones. *Short Communications* should not exceed 1500 words and *News and Views Commentaries* should not exceed 500 words.

#### Preparation of manuscripts

Manuscripts must contain continuous line numbering throughout and should be organised as follows:

The title page should include:

- The **title** of the article, which **should be short** (preferably up to 12 words) but informative and accurately reflect the content.
- Authors' names and contact details: please list a brief affiliation for each author including country (assigned with superscript numbers) below the author names, and in addition, indicate the corresponding author with an asterisk and in this case provide an email address
- Word count, including all text but excluding tables, figures and references.

An Abstract of not more than 250 words followed by 5 Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (combined Results and Discussion may be used for short papers), Acknowledgements, References, Endnotes, Tables and Figure Legends.

Manuscripts should be prepared using SI units.

#### Figures

Figures should be numbered consecutively as they appear in the text. Any indication of features of special interest should also be included. Figures must be supplied electronically. They must be saved at final publication size and ideally supplied in the following file formats: halftone figures (black & white, and colour) as TIF files at 300 dpi; black & white line figures as TIF or EPS files at 1000–1200 dpi. PDF format is also accepted. When relevant, photographs should be submitted with proposed reduction or magnification indicated by a scale line on or beside, the illustration. The places for insertion into the text should be indicated in the text as 'Fig. 1' etc. Legends for all illustrations should be typed together, separately from the main text. There is no charge for online publication of colour photographs or figures. More detailed information is available at: [www.cambridge.org/core/services/authors/journals/journals-artwork-guide](http://www.cambridge.org/core/services/authors/journals/journals-artwork-guide).

#### Tables

Tables with concise headings should be placed at the end of the paper. Each table must have a text reference, in the form 'Table 1' etc.

#### References

References should be cited in the text 'as Conklin (1905) showed' or 'as shown (Conklin, 1905)'. For papers with three or more authors, use et al. A full list of references in alphabetical order should be given at the end of the text: surname of author and initials; year of publication (in parentheses); title of paper; journal or book name (the former being abbreviated in accordance with the World List of Scientific Periodicals); volume number; first and last page of the reference. For books and conference proceedings, the place of publication and publisher (and editor(s) if appropriate) should be included.

#### Acknowledgements

You may acknowledge individuals or organisations that provided advice, support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

#### Ethics Statements

##### **Financial Support**

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

##### **Conflict of Interest declaration**

All authors must include a conflict of interest declaration in their manuscript. This declaration will be subject to editorial review and may be published in the article.

Conflicts of interest are situations that could be perceived to exert an undue influence on the content or publication of an author's work. They may include, but are not limited to, financial, professional, contractual or personal relationships or situations.

If the manuscript has multiple authors, the author submitting must include a conflict of interest declaration relevant to all contributing authors. Example wording for a declaration is as follows: "Conflict of interest: Author A is employed at company B. Author C owns shares in company D, is on the Board of company E and is a member of organisation F. Author G has received grants from company H." If no conflicts of interest exist, the declaration should state "Conflict of interest: The author(s) declare none".

### **Ethical Standards**

Where research involves human and/or animal experimentation, the following statements should be included (as applicable): "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008." and "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals."

### **Publication Ethics**

Please visit [here](#) for information on our ethical guidelines.

#### Proofs

Proofs will be sent to the author for checking. Typographical or factual errors only may be changed at proof stage. The publisher reserves the right to charge authors for correction of non-typographical errors.

#### Offprints

A PDF offprint of each article will be supplied free to each first named author. Paper offprints may be purchased from the publisher if ordered at proof stage.

#### Open Access

*Authors in Zygote have the option to publish their paper under a fully Open Access agreement, upon payment of a one-off Article Processing Charge. In this case, the final published Version of Record will be made freely available to all in perpetuity under a creative commons license, enabling its re-use and re-distribution. This Open Access option is only offered to authors upon acceptance of an article for publication. For more information on Open Access please see [our policy pages](#).*

#### Copyright

*The policy of Zygote is that authors (or in some cases their employers) retain copyright and grant Zygote a licence to publish their work. In the case of gold open access articles this is a non-exclusive licence. Authors must complete and return an author publishing agreement form (via upload to the journal's submission site) as soon as their article has been accepted for publication; the journal is unable to publish without this. Please download the appropriate publishing agreement [here](#).*

*For open access articles, the form also sets out the [Creative Commons licence](#) under which the article is made available to end users: a fundamental principle of open access is that content should not simply be accessible but should also be freely reusable. Articles will be published under a Creative Commons Attribution license (CC-BY) by default. This means that the article is freely available to read, copy and redistribute, and can also be adapted (users can "remix, transform, and build upon" the work) for any commercial or non-commercial purpose, as long as proper attribution is given. Authors can, in the publishing agreement form, choose a different*

*kind of Creative Commons license (including those prohibiting non-commercial and derivative use) if they prefer.*

*Cambridge Language Editing Service*

*We suggest that authors whose first language is not English have their manuscripts checked by a native English speaker before submission. This is optional, but will help to ensure that any submissions that reach peer review can be judged exclusively on academic merit. We offer a Cambridge service which you can find out more about [here](#), and suggest that authors contact as appropriate. Please note that use of language editing services is voluntary, and at the author's own expense. Use of these services does not guarantee that the manuscript will be accepted for publication, nor does it restrict the author to submitting to a Cambridge-published journal.*

*ORCID IDs*

*Zygote now requires that all corresponding authors identify themselves using ORCID when submitting a manuscript to the journal. Joining ORCID is fast, free and you do not need to have a current affiliation. ORCID provides a unique identifier for researchers and, through integration in key research workflows such as publication and grant applications, provides the following benefits:*

- Discoverability: ORCID increases the discoverability of your publications, by enabling smarter publisher systems and by helping readers to reliably find work that you've authored.*
- Convenience: As more organisations use ORCID, providing your ID or using it to register for services will automatically link activities to your ORCID profile, and will save you re-keying information multiple times.*
- Keeping track: Your ORCID profile is a neat place to record and display (if you choose) validated information about your research activities.*

*If you don't already have an ID, you'll need to create one if you decide to submit a manuscript to Zygote. You can register for one directly from your user account on ScholarOne or Editorial Manager or via <https://orcid.org/register>. If you already have an ID, please use this when submitting by linking it to your ScholarOne user account. Simply log in to your account using your normal username and password. Edit your account by clicking on your name at the top right of the screen and from the dropdown menu, select 'E-Mail / Name'. Follow the instructions at the top of the screen to update your account.*

*For more information on ORCID please visit: <https://www.cambridge.org/using-ORCID>*