

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

JULIANA DOS SANTOS FERNANDES

**EFEITOS DOS POLIMORFISMOS T945M, C305T E BM1500 EM CARACTERES
PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS EM FÊMEAS NELORE**

Dourados – MS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

JULIANA DOS SANTOS FERNANDES

**EFEITOS DOS POLIMORFISMOS T945M, C305T E BM1500 EM CARACTERES
PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS EM FÊMEAS NELORE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia – Faculdade de
Ciências Biológicas e Ambientais –
Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Profa. Dra. Alexeia Barufatti
Grisolia.

Dourados – MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F363e Fernandes, Juliana dos Santos
 Efeitos dos polimorfismos T945M, C305T e BM1500 em caracteres
 produtivos e reprodutivos em fêmeas Nelore / Juliana dos Santos Fernandes.
 –2017.
 37 f.

 Orientadora: Dra. Alexeia Barufatti Grisolia.
 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)–
 Universidade Federal da Grande Dourados, 2017.

 1. Gado Nelore. 2 Curva de crescimento. 3. Leptina. 3 Microsatélite. 4.
 Zebuínos. I. Título.

**Ficha catalográfica gerada automaticamente no UFGDNet com dados fornecidos
pela autora.**

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

JULIANA DOS SANTOS FERNANDES

**EFEITOS DOS POLIMORFISMOS T945M, C305T E BM1500 EM CARACTERES
PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS EM FÊMEAS NELORE**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito necessário para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, pela banca examinadora formada por:

Prof. Dra Alexeia Barufatti Grisolia
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Rusbel Raul Aspilcueta-Borquis
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Dourados, 16 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado a vida, e por todas as graças concedidas.

À minha família, por todo o apoio e incentivo para a concretização desta importante etapa.

À Professora Dra. Alexeia Barufatti pela orientação, por toda dedicação, confiança e ensinamentos proporcionados dentro e fora da sala de aula.

Às meninas (Adrielle, Allana, Amanda, Karina, Suzana e Thamiris) que tive o prazer de conhecer e conviver durante a graduação. Vocês são grandes presentes que a Biotec me deu.

Aos “TOPS da Bio Mol” (Allana, Caroline, Rafaela, Rafael e Reiane), o lab não seria o mesmo sem vocês.

Aos colegas dos Laboratórios de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal e Mutagênese Ambiental, pelos momentos de descontração.

Aos professores da FCBA, por todo o conhecimento transmitido durante a graduação.

Aos professores Leonardo de Oliveira Seno e Rusbel Raul Aspilcueta-Borquis, por todo o auxílio durante as análises estatísticas.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de cursar a graduação em Biotecnologia.

À UFGD, CNPq e FUNDECT pelo suporte financeiro à pesquisa e concessão de bolsa de iniciação científica.

À Fazenda São Jorge do Maracay, por disponibilizar material biológico e dados fenotípicos dos animais, para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e meu desenvolvimento acadêmico.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Hipóteses.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1Pecuária de corte brasileira	5
2.2 Seleção assistida por marcadores.....	5
2.3 Características de interesse no setor produtivo e reprodutivo	8
2.4 Leptina e polimorfismos associados a caracteres de interesse econômico	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Animais e fenótipos	13
3.2 Coleta de sangue e extração de DNA	13
3.3 Avaliação da integridade e quantidade do DNA total	14
3.4 Amplificação por PCR.....	14
3.5 SNP T945M	15
3.6 SNP C305T	15
3.7 Microssatélite BM1500.....	15
3.8 Avaliação dos <i>amplicons</i>	16
3.9 Análises populacional e estatística	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Diversidade populacional do rebanho.....	18
4.2 Análise de associação	20
5. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMO

O peso corporal de novilhas está relacionado com o início da puberdade nas mesmas e consequentemente, com o início do ciclo reprodutivo. A reprodução animal é um parâmetro de grande retorno em gado de corte, pois proporciona maior disponibilidade de animais, portanto, maior lucratividade. Animais zebuínos correspondem a maior parcela do gado de corte brasileiro e as fêmeas dessas raças tendem a atingir a maturidade sexual tardiamente. Assim, a identificação de genes e polimorfismos que possam estar envolvidos com o maior desempenho reprodutivo é relevante para identificar tal condição. O objetivo deste estudo foi avaliar polimorfismos no gene da leptina (C305T), no gene do receptor da leptina (T954M) e em região de microssatélite (BM1500) próxima ao gene da leptina e buscar associações com característica produtiva de peso corporal e características reprodutivas de idade ao primeiro parto (IPP), intervalo entre partos (IEP) e eficiência reprodutiva (ER), em um grupo amostral de fêmeas bovinas da raça Nelore. Foi realizada a extração de DNA de 138 fêmeas e, em seguida, a amplificação das regiões genômicas para os marcadores SNP T945M e C305T e para o marcador microssatélite BM1500. Após a genotipagem, os dados obtidos foram analisados quanto à diversidade populacional por meio do *software* Cervus 3.0. O estudo de associação entre os genótipos de cada marcador com as características peso, IPP, IEP e ER, foi realizado por meio do procedimento PROC MIXED do *software* SAS[®]. Para as medidas longitudinais de peso foi utilizado o modelo não linear de Gompertz para obtenção dos parâmetros da curva de crescimento e posteriormente realizou-se o teste de *Lack of Fit* para comparar o ajuste do modelo completo com o modelo reduzido. Ambos os marcadores SNP apresentaram duas variações alélicas, C e T, e ambos os genótipos CC tiveram as maiores frequências, sendo 0,73 e 0,67, para T945M e C305T, respectivamente. O microssatélite BM1500 apresentou três alelos, 149, 147 e 138, com maior frequência genotípica para 147/147 (0,55). As análises de associação entre os todos os marcadores e as características reprodutivas e entre os marcadores SNP e a característica peso corporal, não foram significativas ($p < 0,05$). Porém, avaliando o marcador BM1500, observou-se efeito ($p = 0,0383$) do alelo 138 sobre o peso corporal, sendo a curva de crescimento para tal alelo (Teste de *Lack of Fit* = 0,01) relacionada com o menor peso assintótico médio. A baixa frequência alélica (0,06) para este alelo e a ausência de genótipo homocigoto indicam que o ele foi sendo eliminado do rebanho por processos de seleção, visto que sua relação com o aumento do peso corporal foi negativa. Esses resultados poderão ajudar produtores de gado em seus processos de seleção por meio da seleção assistida por marcadores, pois o marcador BM1500 mostrou-se eficiente para fornecer informações sobre o peso corporal de fêmeas Nelore.

Palavras-chave: Curva de crescimento, Leptina, Microssatélite, SNP, Zebuínos.

ABSTRACT

Body weight in heifers be related to the onset of puberty and consequently to the onset of the reproductive cycle. The reproduction is a parameter of great return in beef cattle, because it provides greater availability of animals, therefore, greater profitability. Zebu animals correspond to the largest proportion of Brazilian beef cattle and the zebu females tend to reach their sexual maturity in a late period. Thus, the identification of genes and polymorphisms that may be involved with higher reproductive performance is relevant to identify such condition. The aim of this study was to evaluate two SNP markers in the leptin gene (C305T) and in the leptin receptor gene (T954M), and the one microsatellite marker (BM1500) located close to the leptin gene and to seek for associations with the body weight productive trait and reproductive traits of age at first calving (AFC), calving interval (CI) and reproductive efficiency (RE) in a group of Nellore cattle. DNA extraction from 138 females was performed, followed by amplification of the SNP T945M and C305T and BM1500 microsatellite. After genotyping the data obtained were analyzed for population diversity using Cervus 3.0 software. The study of association between the genotypes of each marker with the characteristics weight, AFC, CI and RE, was performed using the PROC MIXED procedure of the SAS[®] software. For the longitudinal measures of weight, the non-linear Gompertz model was used to obtain the parameters of the growth curve and after that, the Lack of Fit test was performed to compare the fit of the complete model with the reduced model. Both SNP markers presented two allelic variations, C and T, and both CC genotypes had the highest frequencies, 0.73 and 0.67, for T945M and C305T, respectively. The BM1500 microsatellite presented three alleles, 149, 147 and 138, with a higher genotypic frequency for 147/147 (0.55). The association analyses between all markers and reproductive traits and between the SNP markers and the body weight trait were not significant ($p < 0.05$). However, for the BM1500 microsatellite, the effect of the allele 138 ($p = 0.0383$) on body weight was observed, with the growth curve for such allele (Lack of Fit Test = 0.01) being related to low asymptotic weight. The low allele frequency (0.06) for this allele and absence of homozygous genotype indicate that it was eliminated from the herd by selection processes, once its relation with the increase in body weight was negative. These results could help cattle producers in their selection processes through marker-assisted selection, as the BM1500 microsatellite proved to be efficient in providing information about the body weight of Nellore females.

Keywords: Growth curve, Leptin, Microsatellite, SNP, Zebu cattle.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é de grande importância no agronegócio brasileiro, pois garante destaque para o país no cenário mundial em produção e exportação de carne. Além disso, o país é um dos líderes mundiais em exportação, tendo exportado para quase 140 países no ano 2016 (USDA, 2016; ABIEC, 2017a).

Em termos reprodutivos, as fêmeas zebuínas (*Bos indicus*) são mais tardias quando comparada com as taurinas (*Bos taurus*), visto que as zebuínas demoram um tempo maior para atingir a puberdade, além de requerer alta porcentagem do peso corpóreo (RODRIGUES et al. 2002; ROSA e MENEZES, 2016).

Assim, técnicas de biologia molecular que permitem o estudo de genes envolvidos com características quantitativas e mensuráveis em animais, constituem ferramentas relevantes nos programas de melhoramento genéticos, por meio de seleção assistida por marcadores (VECHETINI, 2007).

A reprodução animal é apresentada como parâmetro de maior retorno econômico, merecendo maior atenção dos criadores de gado de corte, pois rebanhos detentores de características reprodutivas favoráveis proporcionam maior disponibilidade de animais, garantindo maior lucratividade para venda (abate) e seleção genética (BERGMAN, 1999; MATOS, 2012). Caracteres reprodutivos como idade ao primeiro parto e intervalo entre partos são utilizados na avaliação da reprodutividade de bovinos, e menores valores para essas características acarretam em melhores índices de eficiência reprodutivas nas fêmeas (VIU et al., 2008). Ainda, a puberdade, que marca o início da atividade reprodutiva é altamente influenciada pelo peso das vacas, onde sua manifestação é atingida quando a fêmea apresenta cerca da metade de seu peso adulto (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Características produtivas e reprodutivas apresentam uma diversidade de genes envolvidos em suas manifestações, e marcadores moleculares são eficientes na detecção de genes e seus polimorfismos. Estes são marcas presentes nas sequências de DNA localizadas próximas a regiões/genes de interesse, que permitem verificar a segregação alélica ao longo de gerações, podendo assim, identificar e selecionar características desejadas antes das mesmas serem expressas (PASSOS, 2006; COUTINHO et al., 2010). Por meio de marcadores é possível identificar polimorfismos, localizados em genes estruturais ou em regiões próximas, que podem estar associados com manifestações de fenótipos importantes (VECHETINI, 2007).

Diversos genes e polimorfismos têm sido citados pela literatura por apresentarem associações com características de importância econômica. Dentre eles, o gene da leptina é bastante estudado, pois o mesmo tem sido reportado por sua ligação com eventos reprodutivos (WILLIAMS et al., 2002). Além disso, esse gene é caracterizado como o gene da obesidade, estando envolvido no controle do apetite, portanto, apresenta ligação com o ganho de peso em animais (SALMAN e COSTA, 2006).

O gene receptor da leptina (LEPR) foi relatado por apresentar associações com caracteres produtivos (LIEFERS et al., 2004; KOMISAREK e DORYNEK, 2006). Da mesma forma, o marcador microssatélite BM1500, localizado próximo ao gene da leptina também tem sido relatado pela literatura por apresentar associação com características produtivas, como deposição de gordura (FITZSIMMONS et al., 1998; SILVA et al., 2014).

Considerando que o gene da leptina, seu receptor e regiões próximas ao mesmo apresentem associações com características de interesse produtivo e reprodutivo, torna-se relevante pesquisar polimorfismos que possibilitem identificar tal condição. Essas associações podem contribuir para a seleção de animais que garantam maior retorno econômico.

1.1 Objetivos

Geral

Analisar os marcadores SNP T945M e C305T e o marcador microssatélite BM1500, em fêmeas bovinas da raça Nelore e verificar associação com características produtivas e reprodutivas.

Específicos

Determinar as frequências alélicas e genotípicas para os marcadores T945M, C605T e BM1500 em população de fêmeas da raça Nelore;

Verificar associação individualmente dos marcadores T945M, C305T e BM1500 com a característica produtiva peso;

Verificar associação individualmente dos marcadores T945M, C305T e BM1500 com as características reprodutivas idade ao primeiro parto, intervalo entre partos e eficiência reprodutiva.

1.2 Hipóteses

H_0 : Não existem associações significativas ($p < 0,05$) entre os marcadores T945M, C305T e BM1500 com as características de peso, idade ao primeiro parto, intervalo entre partos e eficiência reprodutiva, na avaliação individual de cada polimorfismo com cada característica, no grupo amostral constituído por fêmeas bovinas da raça Nelore;

H_1 : Existe associação significativa ($p < 0,05$) entre, pelo menos um marcador e uma característica, na avaliação no grupo amostral de fêmeas bovinas da raça Nelore.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pecuária de corte brasileira

A bovinocultura brasileira, principalmente a de corte, garante destaque para o Brasil no cenário mundial da produção animal. Dados do IBGE (2016) mostraram que até o terceiro trimestre de 2016 foram abatidas cerca de 7,32 milhões de cabeças de bovinos e, a estatística anual de produção para o mesmo ano indicou que foi exportado mais de 1,4 milhão de toneladas de carne (na forma in natura, processada, miúdos, tripas e salgadas), gerando um faturamento de 5,5 bilhões de dólares, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Importadoras de Carnes (ABIEC, 2017b).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês *United States Department of Agriculture*) (USDA, 2016), estimou que, de janeiro a setembro de 2016 o Brasil ocupava a terceira colocação mundial em produção de carne, além de liderar, juntamente com a Índia, a exportação de carne bovina.

O rebanho de corte brasileiro abrange animais das raças taurinas e zebuínas, sendo predominante formado por animais zebuínos (cerca de 80%) e, dentro desta parcela, aproximadamente 80% são animais Nelore (ROSA e MENEZES, 2016). Os animais zebuínos são adaptados às condições climáticas brasileira, uma vez que apresentam origem indiana, com clima semelhante ao Brasil (ACNB, 2016).

Entretanto, as raças zebuínas, que correspondem a maior parcela do gado de corte, apresentam taxas reprodutivas inferiores em comparação com animais taurinos, atingindo a puberdade em idade mais avançada, além de requerer alta porcentagem do peso corpóreo (RODRIGUES et al. 2002; MATOS, 2012; ROSA e MENEZES, 2016). Como o gado zebuíno corresponde a maior parcela do gado de corte, é importante investir no melhoramento genético dessa raça a fim de aumentar a qualidade e produtividade dos rebanhos brasileiros, de modo a contribuir para demanda mundial de carne bovina (PASSOS, 2006).

2.2 Seleção assistida por marcadores

A demanda por animais com maior qualidade e produtividade dentro dos rebanhos requer o aperfeiçoamento dos mesmos, por meio de técnicas de manejo, sanidade,

alimentação e melhoramento genético, a fim de destacar características qualitativas e quantitativas de interesse econômico (SALMAN, 2006).

Na genética clássica, as características desejadas para utilização em programas de melhoramento estão relacionadas com a qualidade das informações adquiridas, sendo estas avaliadas com base em dados fenotípicos (desempenho visual) e de pedigree, tanto do animal a ser melhorado como de seus parentais (CARDOSO, 2009).

Visando manter e melhorar os índices de produtividade, avanços nas técnicas de biologia molecular possibilitaram estudar minuciosamente a influência que os genes exercem sobre as características consideradas importantes, sendo assim, um grande incremento para a seleção genética baseada exclusivamente no fenótipo (SALMAN, 2006).

Entretanto, o uso da seleção baseada nas técnicas moleculares não significa a exclusão da seleção genética clássica, visto que esta última tem sido praticada há muito tempo, fazendo-se uso da genética mendeliana clássica. Assim, ambas devem ser empregadas conjuntamente a fim de aumentar o valor econômico (produção e lucratividade) de espécies domesticadas. Dentre as técnicas que possibilitam essa união, têm-se a seleção assistida por marcadores (SAM) (LANDE e THOMPSON, 1990).

A seleção assistida por marcadores moleculares é uma ferramenta que permite a investigação de genes e polimorfismos, contribuindo para a seleção genética, pois possibilita o aumento da acurácia de seleção quando há expressão fenotípica tardia, baixa herdabilidade e características de difícil mensuração, podendo selecionar animais jovens antes mesmo da expressão de determinadas características (SILVA, 2008; POLIDO et al., 2012; GOTTSCHALL et al., 2013).

Progressos obtidos com a biologia molecular e técnicas de análise de DNA permitiram estudos minuciosos a respeito da influência dos genes sobre características importantes, contribuindo assim, para a melhoria dos rebanhos bovinos (SALMAN, 2006; PASSOS, 2006).

Marcadores moleculares são definidos como “marcas” presentes na sequência de DNA nas proximidades de genes ou regiões de interesse, ou seja, qualquer traço molecular relacionado a regiões expressas ou não expressas no genoma. Por meio deles é possível acompanhar a segregação de alelos ao longo das gerações e, dessa forma, monitorar as características associadas a tais alelos. Ainda, podem-se identificar mutações (polimorfismos) que exercem influência nas características controladas por um ou mais

genes, contribuindo para a identificação de variações genéticas em indivíduos (MARCELINO et al., 2007; COUTINHO et al., 2010; POLIDO et al., 2012).

Os polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, do inglês, *Restriction Fragment Length Polimorphism*) foram os primeiros marcadores desenvolvidos, na década de 1970, sendo baseados na técnica de hibridização do DNA (fragmentação com enzimas de restrição) em sondas marcadas radioativamente ou com compostos que liberam reações luminescentes (MARCELINO et al., 2007; SILVA, 2009).

Entretanto, limitações da técnica de hibridização, como a necessidade grande quantidade de DNA e conhecimento prévio das sequências-alvo, acarretaram ao desenvolvimento de marcadores baseados em PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), que utilizam oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para flanquear regiões específicas da sequência de DNA para amplificação (FALEIRO, 2007; POLIDO et al., 2012).

Marcadores microssatélites ou SSR (do inglês, *Simple Sequence Repeats*) ou ainda, STR (do inglês, *Short Tandem Repeats*) são constituídos por pequenas sequências nucleotídicas (2 a 6 pares de bases) repetidas em *tandem*, em regiões codificadoras ou não, sendo seu polimorfismo resultado da variação dos elementos repetitivos. As regiões repetitivas de microssatélite são altamente conservadas, podendo ser variáveis entre diferentes espécies e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (PASSOS, 2006; YANG et al., 2013).

Devida a sua ampla distribuição no genoma, facilidade de detecção genotípica e alélica (reação de PCR e análise eletroforética) e elevado grau polimórfico, os SSR são utilizados em estudos de filogenias, caracterização de raças e no melhoramento genético (PASSOS, 2006; RAMOS et al., 2006; POLIDO et al., 2012).

Com os avanços das técnicas de sequenciamento de DNA, foi possível descobrir um novo tipo de marcador, baseado em polimorfismos de DNA, o marcador SNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) (SILVA, 2012; POLIDO et al., 2012). Os marcadores SNP envolvem substituições, nas bases nitrogenadas da cadeia de DNA, ocasionando mutações do tipo transições, transversões, inserções e deleções, que devem ocorrer em pelo menos 1% da população para serem caracterizadas como SNP (CAETANO et al., 2009; YANG et al., 2013).

Os SNP podem estar presentes em regiões codificadoras ou não no genoma, sendo mais predominantes em espaços intergênicos, sem função conhecida (CAETANO, 2009).

Porém, quando ocorrem em regiões regulatórias, podem acarretar em substituições aminoacídicas nas sequências de proteínas, resultando em mutações não sinônimas, conservativas ou não, que, dependendo das propriedades físico-químicas dos aminoácidos envolvidos, pode haver modificações na estrutura e funcionalidade da proteína (SALMAN, 2006).

A genotipagem de SNP ocorre por meio de marcadores do tipo CAPS (do inglês, *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), mais conhecido como PCR-RFLP (do inglês, *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). O DNA é amplificado por PCR com a utilização de *primers* específicos, e posteriormente, os *amplicons* (regiões amplificadas) são digeridos com endonucleases de restrição. O resultado é observado por meio de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. A técnica de PCR-RFLP apresenta facilidade de manipulação, alta confiabilidade e custos relativamente baixos (FALEIRO, 2007; VECHETINI, 2007).

Dessa forma, a seleção assistida por marcadores oferece uma seleção indireta de genes e alelos desejáveis na produção e reprodução animal (CAVALCANTI, 2009).

2.3 Características de interesse no setor produtivo e reprodutivo

O peso corporal de bovinos avaliado em diferentes idades é comumente utilizado na avaliação do desempenho produtivo de rebanhos, em análises de crescimento e desenvolvimento dos animais, de modo a contribuir com a qualidade e quantidade da carne a ser produzida (FRIZZAS et al., 2009; BUZANSKAS, 2013).

Em programas de melhoramento genético, a característica peso corporal pode ser utilizada em avaliações genéticas como medida repetida ou dado longitudinal, ou seja, várias mensurações de peso são realizadas em diferentes idades de cada animal (TEIXEIRA, 2015). Assim, o crescimento do animal é descrito por uma função do peso em relação à idade (PAZ, 2002).

As características reprodutivas também despertam a atenção dos produtores e são de grande importância econômica (BUZANSKAS, 2013). Dentre elas, há destaque para a puberdade, que é o período transitório entre a infância e fase adulta, onde as funções reprodutivas são atingidas e as novilhas estão aptas a gerar descendentes. A puberdade (ou idade da primeira monta) é definida como a transição entre a infância e a idade adulta, alcançando a capacidade reprodutiva (TERASAWA e FERNANDES, 2001). Nesse

período são adquiridas algumas características sexuais, como a produção de gametas maduros (espermatozoides e oócitos), de modo a manifestar comportamento sexual completo (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Por marcar o início da atividade reprodutiva, a precoce idade à puberdade permite o retorno antecipado das fêmeas à recria, o que é importante sob o ponto de vista econômico (ABUD, 2013). Fatores como fotoperíodo, ambiente físico, idade e raça dos parentais, peso corporal e adiposidade afetam diretamente o início da puberdade. Este está mais relacionado com o peso corpóreo do que com a idade. No gado de corte esta é atingida quando o peso do corpo está em torno de 45% a 55% do peso adulto, ocorrendo geralmente entre 12 e 24 meses de idade (HAFEZ e HAFEZ, 2004; SALMAN e COSTA, 2006; VAICIUNAS, 2007).

Outro fator relacionado à maturidade do sistema reprodutivo é a idade ao primeiro parto (IPP), que segundo Matos (2012), é um fenótipo derivado da expressão da precocidade sexual e de fácil mensuração, pois reflete a idade à puberdade, garantindo o aumento da produtividade dos rebanhos quando há redução na IPP, possibilitando aumentar a quantidade de bezerros produzidos durante a vida das fêmeas.

O intervalo (IEP) entre partos avaliado em bovinos de corte apresenta influência direta sobre a reprodução, pois com um IEP de 365 dias, gerando um bezerro por ano, há um aumento na produção durante a vida útil das fêmeas (VIU et al. 2008).

Além da idade à puberdade e IPP, a eficiência reprodutiva de um rebanho pode ser avaliada por outros parâmetros, como o intervalo entre partos (número de dias entre os partos das fêmeas), dias para o parto, período gestacional, probabilidade de prenhez, número de crias produzidas, ovulação (TANAKA, 2010; MATOS, 2012).

A elevada idade ao primeiro parto e longo intervalos entre partos são fatores que diminuem a eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas, logo o desejável é que as mesmas tenham um parto a cada 12-13 meses (AZEVEDO et al., 2001).

2.4 Leptina e polimorfismos associados a caracteres de interesse econômico

A leptina é um hormônio peptídico, produto do gene da leptina (LEP), também conhecido como gene da obesidade (ob). Este hormônio tem peso molecular de 14 a 16 kDa (Kilodalton), é composto por 162 aminoácidos e produzido principalmente pelo tecido

adiposo branco. Entretanto, o tecido adiposo marrom, estômago, músculo esquelético, cartilagem fetal, tecido mamário e placenta têm sido relatados como produtores de leptina (ZIEBA et al., 2005; CATUNDA et al., 2014).

A palavra leptina é derivada do grego *leptos*, que significa magro, e sua descoberta ocorreu por meio de estudos realizados em camundongos, usados como modelos experimentais de obesidade, em estudos de parabiose (interligação da circulação sanguínea) entre camundongos normais (magros) e obesos. A partir desse experimento evidenciou-se a presença de um fator circulante (leptina) responsável pelo emagrecimento dos camundongos obesos (ZIEBA et al, 2005; KOWALSKI et al., 2014).

A elevação de peso corporal está diretamente relacionada com o aumento do tecido adiposo, conseqüentemente com maior quantidade de adipócitos, acarretando em maior de liberação de leptina na corrente sanguínea (KOWALSKI et al., 2014). Quando o nível circulante de leptina está aumentado, este hormônio é detectado por receptores expressos no cérebro e em regiões hipotalâmicas, sinalizando para uma resposta envolvendo o metabolismo de queima de gordura, e conseqüentemente agindo no controle da ingestão alimentar (Figura 1) (SILVA, 2008; SOUSA et al., 2009; CATUNDA et al., 2014).

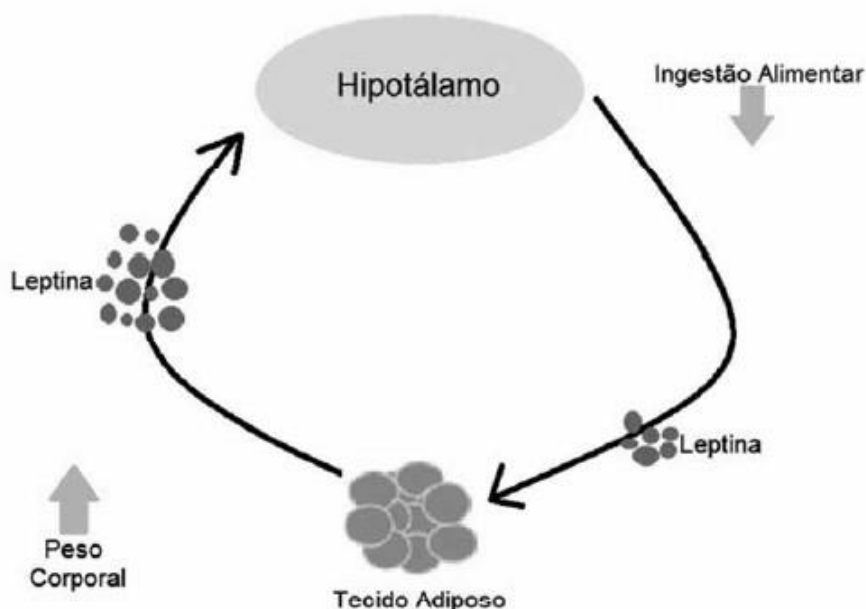


Figura 1. Mecanismo de ação da leptina na comunicação com o hipotálamo e resposta sobre a ingestão alimentar e peso corporal. (Fonte: KOWALSKI et al., 2014).

A leptina tem sido relatada por sua ação no controle de ingestão de alimentos e composição corporal em mamíferos, uma vez que ela atua na sinalização do estado de saciedade (GEARY et al., 2003; ROMERO e ZANESCO, 2006). Estudos com diferentes polimorfismos no gene da leptina mostraram associações significativas para maior ingestão de alimento, características de composição corporal (LIEFERS et al., 2002; NKRUMAH et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Em bovinos, o gene da leptina (GenBank U50365.1) está localizado no cromossomo 4, possui três éxons separados por duas regiões de íntrons (TANIGUCHI et al., 2002).

Buchanan et al. (2002), identificaram um polimorfismo no éxon 2 (SNP C305T ou E2FB) do gene da leptina que apresentou associações com níveis de gordura na carcaça em bovinos, sendo o alelo T associado a carcaças mais gordas. O polimorfismo C305T (GenBank AY138588.1:c.305C>T) está localizado no éxon 2 do gene da leptina, no cromossomo bovino 4, e é caracterizado pela transição entre as bases nitrogenadas citosina e timina, ocorrendo assim, troca dos aminoácidos arginina por cisteína.

Este mesmo polimorfismo foi estudado por Carvalho et al. (2012), que encontraram associações significativas com característica de espessura de gordura na carcaça. Oliveira et al. (2013) também observaram a mesma variação polimórfica juntamente com outro polimorfismo no éxon 2, que mostraram-se significativamente associados com distribuição de gordura na carcaça, intensidade da coloração do músculo vermelho e espessura de gordura de marmoreio e pós-abate em gado Nelore

O gene receptor da leptina (LEPR) também é bastante citado na literatura por suas correlações com características produtivas. O polimorfismo T945M (GenBank AJ580801.1:g.115C>T) presente na região receptora do LEPR, está localizado no cromossomo 3 bovino, no éxon 20 do gene LEPR, na posição nucleotídica 115 e, é responsável pela substituição do aminoácido treonina pelo aminoácido metionina, ocorrido pela troca das bases nitrogenadas C>T (citosina por timina) (KOMISAREK & DORYNEK, 2006).

Ferraz et al. (2009) encontraram associação entre o polimorfismo T945M e área de músculo *longissimus dorsi*. O mesmo polimorfismo foi estudado por Komisarek e Dorynek (2006), em fêmeas da raça Jersey e associaram o polimorfismo com maior teor de gordura no leite. Também usando vacas Jersey, Liefers et al. (2004) verificaram que este

polimorfismo mostrou-se associado com concentrações de leptina circulante durante gravidez tardia.

Ainda, Trakovická et al. (2013) encontraram associação significativa com a característica intervalo entre partos, onde o genótipo heterozigoto apresentou correlação com menor intervalo. Komisarek (2010) verificou associação significativa com menor idade à primeira inseminação. E em características produtivas, este polimorfismo foi apresentado associação com ganho de peso em gado Nelore (SILVA et al., 2012).

O marcador microssatélite BM1500 (GenBank G18568.1) localizado aproximadamente à 3,6 Kb (Kilobase) *downstream* do *stop codon* (códon de parada) do gene da leptina, no cromossomo 4 bovino (BUCHANAN et al., 2002) foi estudado por Fitzsimmons et al. (1998) e foi associado com diferentes características de gordura em touros de corte.

Associações significativas deste SSR com espessura de gordura de garupa e subcutânea, peso e comprimento de carcaça foram encontradas por Silva et al. (2014). Estes autores sugerem que a associação encontrada pode estar relacionada ao fato de que os alelos do marcador BM1500 apresentarem algum envolvimento na redução do funcionamento da leptina, acarretando em aumento do acúmulo de gordura.

Os polimorfismos acima citados foram descritos na literatura com associações com diversas características produtivas e reprodutivas, que geram retorno econômico. Assim, a realização de mais estudo buscando encontrar associações com outras características é importante para a utilização desses polimorfismos na seleção assistida por marcadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e fenótipos

O grupo amostral foi constituído por 138 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*), nascidas entre os anos de 1996 a 2007, provenientes da Fazenda São Jorge de Maracay, localizada no município de Iguatemi, MS. Trata-se de um rebanho comercial, onde os animais eram mantidos exclusivamente a pastagem (*Brachiaria* spp.) com suplementação mineral *ad libitum*. O grupo amostral foi constituído de fêmeas com paternidade conhecida.

No estudo foram utilizados os registros de peso do nascimento até 48 meses de idade das vacas. Foi possível obter de cada animal várias medições de peso, o que caracteriza as medidas repetidas ou dados longitudinais para esta característica produtiva.

Além das medidas de pesagem, também foram avaliadas as características reprodutivas de idade ao primeiro parto (IPP), em meses; intervalo entre partos (IEP), em dias e eficiência reprodutiva (ER), em porcentagem. Para ER dos indivíduos foi adotado o índice descrito por Wilcox (1957), como:

$$ER(\%) = \frac{365 * (N - 1) * 100}{D},$$

em que, ER (%) = eficiência reprodutiva; N = número total de partos; D = número de dias do primeiro ao último parto; 365 = intervalo entre partos.

Todos os dados fenotípicos foram obtidos a partir da base de dados fazenda, que permite a gestão, armazenamento e controle dos dados de cada animal. A manipulação do arquivo de dados e análise de consistência foram realizadas com o auxílio do software SAS[®] (*Statistical Analysis System*) University Edition.

3.2 Coleta de sangue e extração de DNA

Para a realização das análises laboratoriais foram coletados 4,5 mL de sangue periférico de cada animal por meio da punção da veia jugular. As amostras foram armazenadas em tubos do tipo Vacutainer com EDTA potássico à -20°C até o processamento. As atividades experimentais foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (FCA/UFGD).

A extração de DNA genômico foi realizada seguindo o protocolo de Crispim et al. (2012) com algumas adaptações. O DNA foi extraído a partir de 300 µL sangue congelado de cada amostra, que foi adicionado em tubo de polipropileno de 2 mL e acrescentado, em seguida, 3 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 500 µL de SDS 20%. Os tubos foram homogeneizados em *vortex* e incubados em banho-maria por 1 hora e 30 minutos à temperatura de 60°C. Transcorrido o período de incubação, adicionou-se aos tubos 800 µL de clorofórmio e homogeneizou-se novamente em *vortex*. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos em rotação de 14000 rpm, e logo após a fase aquosa foi transferida para tubos de 1,5 mL, onde foi acrescentado 1 mL de etanol (100%) gelado, e realizada a homogeneização por inversão até observar a formação de um precipitado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 14000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol (70%), e novamente centrifugando-se por 2 minutos à 14000 rpm. Posterior à centrifugação, o conteúdo foi desprezado e os tubos foram colocados invertidos sobre a bancada para secar o sedimento (cerca de 10-15 minutos). Passado esse tempo, adicionou-se 100 µL de TE pH 8,7 com RNase (10 µg de RNase por mL de amostra – 1 µL de RNase para cada 1000 µL de TE) e homogeneizou-se lentamente. Para finalizar, incubou-se em banho-maria por 1 hora à 37°C.

3.3 Avaliação da integridade e quantidade do DNA total

A quantificação do DNA das amostras extraídas foi realizada no aparelho de espectrofotometria NanoPhotometer[®] Pearl (Implen), onde avaliou-se a quantidade (ng/µL) e a pureza (razão de absorvância da faixa de 260/280 nm) do DNA.

A avaliação da qualidade do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,05 µg/mL), onde as amostras de DNA foram visualizadas e identificadas por meio de bandas formadas no gel, quando submetidas à luz ultravioleta (UV) do aparelho de fotodocumentação PhotoDoc-It[™] (UVP[®]).

3.4 Amplificação por PCR

As fêmeas foram genotipadas para os seguintes marcadores: T945M (KOMISAREK e DORYNEK, 2006), C305T (BUCHANAN et al., 2002) e BM1500 (FITZSIMMONS et al., 1998), sendo eles encontrados no gene receptor da leptina, no gene

da leptina e próximo ao stop códon do gene da leptina, respectivamente. As amplificações pela reação em cadeia da polimerase e as reações enzimáticas foram realizadas no termociclador MyCycler™ thermal cycler (BIORAD®).

3.5 SNP T945M

Os primers forward (5'GCAACTACAGATGCTCTACTTTTGT-3') e reverse (5'CAGGGAAATTTCCCTCAAGTTTCAA-3') foram usados para amplificar um fragmento de 400 pb do SNP T945M. A reação de amplificação continha 6 µL de H₂O ultra-pura (livre de nuclease), 1,5 µL (10 pM/µL) de cada primer, 13 µL do Mix de PCR (ThermoScientific®) e 2 µL do DNA genômico (50 ng/µL). O protocolo de amplificação consistiu em desnaturação inicial (94°C por 5 min), seguindo por 35 ciclos (desnaturação à 94°C por 30 s, anelamento à 56°C por 30 s e extensão à 72°C por 40 s) e extensão final à 72°C por 4 min. Os fragmentos foram digeridos em reação contendo 5 µL de H₂O ultra-pura, 1 µL de tampão 10X, 3U da enzima de restrição *TaqI* (ThermoScientific®) e 5 µL do produto de PCR, à 65°C por 4 h.

3.6 SNP C305T

Os primers forward (5'ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC-3') e reverse (5'TTCCGGAAGGTCCAGAGATGACACCA-3') foram usados na amplificação do fragmento de 94 pb do SNP C305T. A reação de amplificação continha 6 µL de H₂O ultra-pura, 2,0 µL (10 pM/µL) de cada *primer*, 12,5 µL do Mix de PCR (ThermoScientific®) e 2,5 µL (50 ng/µL) do DNA genômico. As condições da amplificação consistiram em desnaturação inicial (94°C por 4 min) seguida por 35 ciclos (desnaturação à 94°C por 45 s, anelamento à 56°C por 55 s e extensão à 72°C por 50 s) e extensão final à 72°C por 5 min. Os fragmentos foram digeridos em reação contendo 13 µL de H₂O ultra-pura, 1,5 µL do tampão, 2U da enzima de restrição *Kpn2I* (ThermoScientific®) e 12 µL do produto amplificado, à 37°C por 6 h.

3.7 Microssatélite BM1500

Os primers forward (5'GATGCAGCAGACCAAGTGG-3') e reverse (CCCTTGCTAGAACCCAGG-3') foram usados para amplificar o microssatélite

BM1500. A reação de amplificação continha 7,5 µL de H₂O ultra-pura, 1,5 µL (10 pM/µL) de cada *primer*, 12,5 µL do Mix de PCR (ThermoScientific®) e 2,0 µL (50ng/µL) do DNA genômico. As condições da amplificação apresentaram um passo de desnaturação inicial (94°C por 3 min), seguida por 25 ciclos (desnaturação à 94°C por 45 s, anelamento à 57°C por 30 s e extensão à 72°C por 45 s); e extensão final à 72°C por 4 min.

3.8 Avaliação dos *amplicons*

Os fragmentos obtidos da digestão enzimática para os SNP foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,05 µg/mL), e os alelos para o microssatélite BM1500 foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

3.9 Análises populacional e estatística

Os parâmetros populacionais examinados (frequências alélicas e genotípicas, heterozigosidade esperada e observada, conteúdo de informação polimórfica, e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg) foram calculados usando o software CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS® (Statistical Analysis System) University Edition, disponível online (https://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html).

A análise de associação entre as características reprodutivas (IPP, IEP e ER) e os marcadores considerou os efeitos fixos de ano de nascimento da vaca e cada genótipo dos marcadores individualmente (T945M, C305T e BM1500), bem como, o efeito aleatório de pai, por meio de modelo misto, no procedimento PROC MIXED.

Na análise de associação entre os marcadores e as medidas repetidas de peso foram considerados efeitos fixos de ano de nascimento da vaca, a idade do animal na data da pesagem e os genótipos de cada marcador individualmente (T945M, C305T) bem como, o efeito aleatório de pai aninhado no animal.

Para o marcador BM1500 foi realizada a análise de associação considerando ausência e a presença dos alelos no lugar do genótipo do marcador (0 para ausência e 1, 2 e 3 para presença, respectivamente, para os alelos 138, 147 e 149). Também foram avaliados

os números de cópias de cada alelo, tanto na forma homozigota quanto heterozigota (0, 1 e 2 cópias) e ausência e presença dos alelos em homozigose (0 e 1, respectivamente).

Os efeitos fixos e aleatório foram os mesmos considerados para os marcadores SNP. As análises de modelo misto foram submetidas ao procedimento PROC MIXED do SAS, considerando a idade do animal na data da pesagem como medida repetida na função REPEATED. Após avaliação prévia da estrutura de covariância dos dados de peso, em que foram testadas as estruturas AR (Autorregressiva), ARH (Autorregressiva Heterogênea), CS (Simetria Composta), TOEP (Toeplitz) e VC (Componentes de Variância), observou-se que TOEP ajustava de maneira mais adequada ao conjunto de dados analisados (estatística não apresentada).

Nas análises de associação todos os P-values foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

O modelo não linear de Gompertz (LAIRD, 1965) foi aplicado para os dados de peso na análise com o marcador microssatélite BM1500 na obtenção dos parâmetros da curva de crescimento por meio do método Marquardt (MARQUARDT, 1963), utilizando regressão não linear, pelo procedimento NLIN do SAS, no ajuste do modelo reduzido (curva média) e modelo completo (ajuste da curva para cada alelo separadamente). O modelo de Gompertz é dado pela equação:

$$y_t = C^{(-b^{(-at)})} + \varepsilon_t,$$

onde y_t representa o peso médio dos animais em função da idade (t); C é peso assintótico ou peso adulto do animal quando $t \rightarrow \infty$; b é constante de integração, sem função biológica, que tem a função de modelar a curva de crescimento para um formato sigmoidal, a partir do nascimento até a idade adulta do animal; a é a taxa ou índice de maturidade, que mensura a variação na velocidade do crescimento, ou seja, pode ser um indicador da velocidade com que o animal atinge o peso assintótico; e ε_t é o erro aleatório associado a cada pesagem (PAZ, 2002; GARNERO et al., 2005; SILVA et al., 2011). Após a obtenção das curvas para os dois modelos, realizou-se o teste de *Lack of Fit* para testar o ajuste do modelo completo em relação ao modelo reduzido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade populacional do rebanho

A Tabela 1 mostra as estimativas para as frequências alélicas e genótípicas, número de animais observados para os genótipos de cada marcador, heterozigidade esperada (H_E) e heterozigidade observada (H_O), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para os marcadores estudados.

Tabela 1. Análise populacional dos marcadores T945M, C305T e BM1500 em fêmeas bovinas da raça Nelore.

Marcador	Frequência Alélica	Frequência Genotípica	N	H_O	H_E	PIC	EHW
T945M	C = 0,85	CC = 0,73	101	0,24	0,25	0,22	NS
	T = 0,15	CT = 0,24	34				
		TT = 0,02	3				
C305T	C = 0,82	CC = 0,67	93	0,29	0,29	0,25	NS
	T = 0,18	CT = 0,29	41				
		TT = 0,03	4				
BM1500		138/138 = 0,00	0	0,40	0,41	0,37	NS
		147/138 = 0,08	12				
	138 = 0,06	149/138 = 0,02	76				
	147 = 0,73	147/147 = 0,55	3				
	149 = 0,21	149/147 = 0,30	40				
	149/149 = 0,05	7					

H_E : heterozigidade esperada; H_O : heterozigidade observada; N: números de animais; PIC: conteúdo de informação polimórfica; HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg; NS: não significativo.

O SNP T945M apresentou duas variações alélicas (alelos C e T) e três tamanhos de fragmentos, sendo 400 pb resultante da amplificação (genótipo TT) e 375 pb e 25 pb, obtidos após a digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição *TaqI*, sendo esses padrões de fragmentos relacionados com o genótipo CC. O genótipo heterozigoto CT apresentou os três diferentes tamanhos de fragmentos: 400, 375 e 25 pb. O alelo C foi o mais frequente, juntamente com o genótipo CC, encontrado em 73% da população (Tabela 1).

A maior frequência alélica (85%) observada para o SNP T945M foi o alelo C (Tabela 1). Silva et al. (2012) relataram em seu estudo com touros Nelore frequência semelhante para o mesmo alelo (88%). As frequências genóticas para o genótipo CC foram superiores em ambos os estudos. Liefers et al. (2004) também obtiveram maior frequência para o alelo C (93%), porém os autores utilizaram vacas taurinas (Holstein-Friesian).

Duas variações alélicas também foram observadas para o SNP C305T e os tamanhos dos fragmentos obtidos após a amplificação e digestão enzimática com a endonuclease *Kpn2I* foram, 94 pb (genótipo TT) e 75 pb e 19 pb (genótipo CC), respectivamente. O genótipo heterozigoto CT apresentou os três tamanhos de fragmentos e foi encontrado em 29% da população.

Para o SNP C305T houve predominância do alelo C (82%) sobre o alelo T (0,18) e maior frequência para o genótipo CC (0,67), resultados que são similares com o estudo de Oliveira et al. (2013), que utilizaram animais provenientes de um rebanho comercial de animais da raça Nelore. Buchanan et al. (2002) encontrou frequências de 0,54 e 0,46 para os alelos C e T, respectivamente, em estudo realizado com raças taurinas, verificando também maior frequência para o alelo C.

Três alelos e cinco genótipos foram obtidos para o microssatélite BM1500. O alelo 147 foi o mais frequente (73%), bem como o genótipo CC, presente em 55% da população (Tabela 1). A menor frequência alélica foi observada para o alelo 138 (6%) e em homozigose, não foi observada frequência genotípica para este alelo.

Fitzsimmons et al. (1998) estudaram o microssatélite BM1500 em raças taurinas e observaram maior frequência alélica para o alelo 138 (47%). Esse resultado difere do presente estudo onde o alelo 138 apresentou a menor frequência (Tabela 1) e a frequência genotípica para este alelo em homozigose não foi observada. Silva et al. (2014) estudaram esse marcador em machos da raça Nelore e também verificaram menor frequência para o alelo 138 (8%), porém a maior frequência genotípica foi observada para o genótipo 149/149 (70%), diferentemente desse estudo que encontrou maior frequência genotípica para 147/147 (55%).

As diferenças observadas para as frequências alélicas e genóticas quando comparadas com estudos prévios para os marcadores estudados são relevantes, pois os estudos presentes na literatura em sua maioria foram desenvolvidos com raças taurinas,

além disso animais machos e fêmeas podem apresentar padrões diferentes para a caracterização das frequências alélicas e genótípicas.

A classificação de Botstein et al. (1980) para o conteúdo de informação polimórfica considera como marcadores altamente informativos, medianamente informativos e pouco informativos, valores de PIC superiores a 0.50, entre 0.25 e 0.50 e abaixo de 0.25, respectivamente. Os dois marcadores SNP estudados apresentaram baixos valores de PIC, pois como o SNP é um marcador bialélico estima-se que o PIC atinja o valor máximo de 0,50, quando ambos os alelos tenham a mesma frequência (OLIVEIRA et al., 2011). O microssatélite BM1500 apresentou valor de PIC medianamente informativo (0,37) e, apesar de ser um marcador com alto grau de informação polimórfica, o valor encontrado pode ser justificado pelo tamanho do grupo amostral. O rebanho avaliado apresentou resultado não significativo para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os marcadores. Este fato pode estar relacionado com a seleção artificial que o rebanho sofreu por mais de 30 anos, assim, a busca pela melhor produtividade promoveu a seleção indireta de frequências alélicas e genótípicas por meio de fenótipos associados com as características em estudo a cada geração.

4.2 Análise de associação

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de médias e desvios-padrão para a análise do modelo misto entre as características reprodutivas IPP, IEP e ER e os marcadores SNP e microssatélite.

Tabela 2. Médias estimadas e desvios padrão das características idade ao primeiro parto, intervalos entre partos e eficiência reprodutiva para os genótipos dos marcadores SNP T945M e C305T e para os alelos do marcador BM1500 em fêmeas bovinas da raça Nelore.

Marcador	Genótipo/ Alelo	IPP	IEP	ER
SNP T945M	CC	29.81 ± 0.64	420.05 ± 10.61	84.88 ± 2.77
	CT	30.84 ± 0.87	427.11 ± 15.32	85.88 ± 3.66
	TT	29.57 ± 2.14	435.93 ± 41.32	76.25 ± 8.35
	P value	0.3244	0.8162	0.5122
SNP C305T	CC	29.85 ± 0.69	424.81 ± 11.34	85.06 ± 2.91
	CT	30.04 ± 0.76	415.40 ± 12.76	84.51 ± 3.20
	TT	30.22 ± 1.84	437.60 ± 28.51	87.13 ± 7.21
	P value	0.9446	0.6143	0.9251

SSR BM1500				
Alelo 138	0	28.35 ± 3.64	447.20 ± 60.10	78.23 ± 15.55
	1	28.07 ± 4.12	473.73 ± 68.79	77.75 ± 13.09
	P value	0.9518	0.4279	0.2034
Alelo 147	0	28.18 ± 3.19	448.96 ± 60.76	82.57 ± 10.52
	2	28.33 ± 3.72	449.81 ± 61.48	77.83 ± 15.56
	P value	0.4539	0.3369	0.1607
Alelo 149	0	28.18 ± 3.79	448.78 ± 59.10	77.53 ± 15.81
	3	28.56 ± 3.49	451.26 ± 65.02	79.33 ± 14.35
	P value	0.7490	0.8203	0.4983
Cópia 138*	0	28.35 ± 3.64	447.20 ± 60.10	78.23 ± 15.55
	1	28.07 ± 4.12	473.73 ± 68.79	77.75 ± 13.09
	P value	0.9518	0.4279	0.2034
Cópia 147	0	28.18 ± 3.18	448.96 ± 60.76	82.57 ± 10.52
	1	28.54 ± 3.81	458.47 ± 69.72	78.06 ± 14.89
	2	28.18 ± 3.68	444.28 ± 55.52	77.68 ± 16.09
	P value	0.7552	0.1945	0.3112
Cópia 149	0	28.18 ± 3.80	448.78 ± 59.10	77.53 ± 15.81
	1	28.60 ± 3.49	451.38 ± 64.69	78.77 ± 14.70
	2	28.35 ± 3.81	450.68 ± 71.83	82.67 ± 12.42
	P value	0.8412	0.8776	0.6196
Alelo 147 vs 147	0	28.48 ± 3.69	456.44 ± 67.39	78.81 ± 14.28
	1	28.18 ± 3.68	444.28 ± 55.52	77.68 ± 16.09
	P value	0.8358	0.2953	0.2972
Alelo 149 vs 149	0	28.32 ± 3.68	449.66 ± 60.71	77.93 ± 15.41
	1	28.34 ± 3.81	450.68 ± 71.83	82.67 ± 12.42
	P value	0.5700	0.7232	0.3784

*A cópia do alelo 138 aparece somente em heterozigose, logo as médias obtidas para as características reprodutivas são as mesmas para o alelo 138, pois há somente uma cópia.

Nenhuma associação significativa foi observada para o Os dois SNP, T945M e C305T e o microssatélite BM1500 avaliados não apresentaram influência sobre as características reprodutivas, não sendo observados efeitos significativos dos marcadores sobre as características analisadas (Tabela 2).

A população de fêmeas bovinas analisadas foi proveniente de um rebanho comercial que realiza seleção com base em fenótipos reprodutivos, assim, os valores encontrados para IPP, IEP e ER para os marcadores refletem anos de seleção aplicada nos animais.

Em relação à análise do modelo misto entre ambos os marcadores SNP e a característica produtiva peso, também não foi observada efeito significativo dos SNP T945M ($p = 0,1641$) e C305T ($p = 0,0681$) sobre a característica. Por outro lado, na avaliação do microssatélite BM1500 com o peso das novilhas, onde foram considerados os alelos do marcador, uma associação significativa foi encontrada para o alelo 138 ($p = 0.0383$).

Os parâmetros do modelo de Gompertz obtidos pelo ajuste do modelo não linear dos dados de peso-idade das fêmeas bovinas em relação aos alelos do microssatélite BM1500 estão apresentados na Tabela 3. A comparação do ajuste das curvas de crescimento do modelo completo e reduzido, por meio do teste de *Lack of Fit*, apresentou efeito significativo ($p = 0.012875$), portanto foi observada diferença para o ajuste das curvas de ambos os modelos (Figura 1).

Tabela 3. Estimativas do peso assintótico (C), constante de integração (b) e taxa de maturação (a) e seus respectivos desvios padrão para o modelo de Gompertz, ajustados aos dados de peso-idade, do nascimento até os 48 meses de idade, em fêmeas bovinas da raça Nelore.

	Parâmetros		
	C	b	a
Curva média (modelo reduzido)	436,8 ± 3,85	2,9342 ± 0,07	0,2807 ± 0,007
Curva dos alelos 147 e 149	443,0 ± 4,14	2,9003 ± 0,07	0,2720 ± 0,007
Curva do alelo 138	386,8 ± 9,34	3,4349 ± 0,34	0,3798 ± 0,029

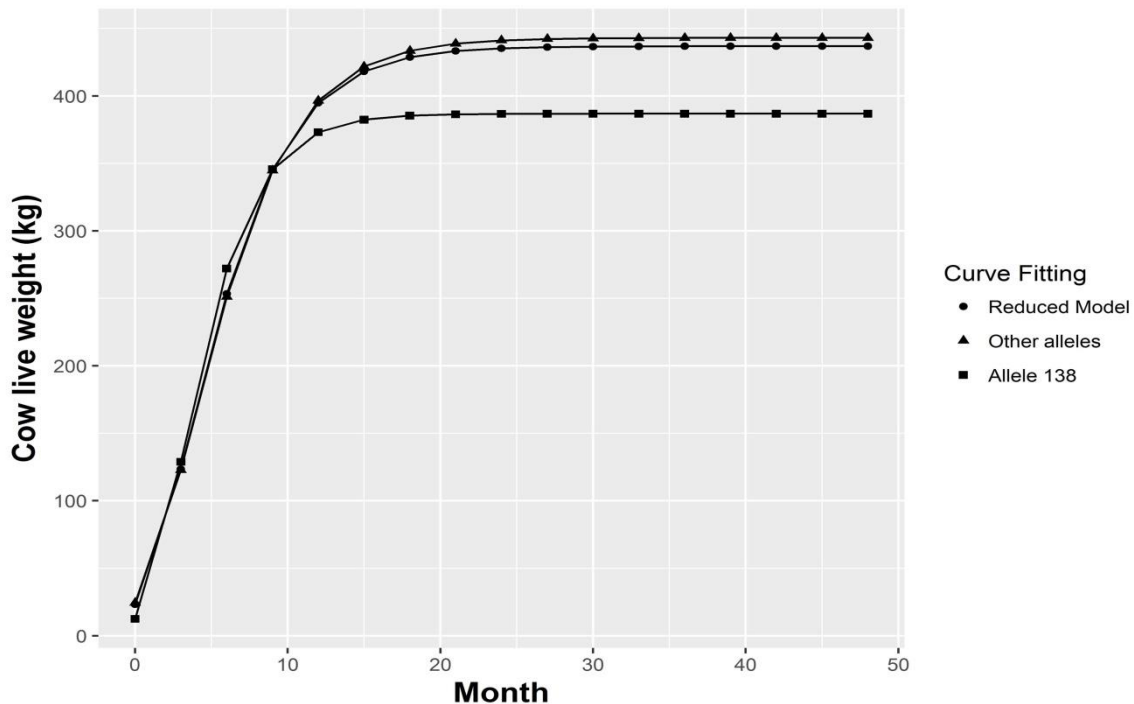


Figura 1. Curvas de crescimento do modelo reduzido (marcador microssatélite BM1500) e do modelo completo (alelo 138 e outros alelos – 147 e 149, do marcador microssatélite BM1500) para mensurações de peso, do nascimento até os 48 meses de idade, em fêmeas bovinas da raça Nelore.

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento dos modelos completo e reduzido, para os dados de peso-idade das fêmeas Nelore em relação aos alelos obtidos para o marcador microssatélite BM1500. A curva para o alelo 138 apresentou o menor crescimento para o peso durante os 48 meses de observação.

O microssatélite BM1500 está localizado próximo ao stop códon do gene da leptina e os alelos 138 e 147 foram relacionados com o aumento e diminuição, respectivamente, da deposição em touros das raças Angus, Charolês, Simental e Hereford (FITZSIMMONS et al., 1998). Silva et al. (2014) observaram associações do marcador BM1500 com características de deposição de gordura em touros Nelore. Avaliando o peso corporal de animais da raça colombiana Velásquez, Montoya et al. (2009) verificaram que o alelo 146 para o microssatélite BM1500 esteve associado com maior peso corporal entre as idades 18 e 24 meses. Diferentemente do presente estudo, os autores observaram os tamanhos 136, 144 e 146 para os alelos do microssatélite BM1500.

As diferenças nos padrões de alelos obtidos entre os trabalhos acima citados podem estar relacionadas com as diferentes raças utilizadas. A informação acurada para os

tamanhos dos alelos pode ser informada por meio de eletroforese capilar, uma técnica eficiente na detecção de alelos para marcadores microssatélites (VEMIREDDY et al., 2007), porém nenhum dos trabalhos utilizaram essa técnica.

O alelo 138 apresentou associação com menor peso nas novilhas e na Figura 1 foi possível observar que a curva para esse alelo foi inferior quando comparada com a curva para os demais alelos, em relação ao peso assintótico médio. O peso assintótico é um fator considerado importante sob o ponto de vista zootécnico, uma vez que vacas mais pesadas atingem a idade a puberdade mais rapidamente, com cerca de 40-55 % do peso adulto, logo geram mais bezerros, fator desejável em gado de corte (PAZ et al., 2004; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Esses resultados corroboram com a análise populacional (Tabela 1), onde as frequências encontradas para o alelo 138 foram menores, sendo nula a frequência genotípica. Esse fato indica que durante o processo de seleção artificial desenvolvido nesse rebanho, o fenótipo associado (menor peso) a esse alelo tem sido eliminado, por não ser de interesse comercial.

5. CONCLUSÃO

Os dois marcadores SNP (T945M e C305T) e o marcador microssatélite BM1500 foram eficientes para avaliar a população, mostrando-se polimórficos para o grupo amostral analisado, identificando diferentes genótipos. As análises de associação entre os marcadores e as características produtiva e reprodutiva não foram significativas, de forma que os marcadores não estavam envolvidos com as características avaliadas, embora, segundo dados presente na literatura, os mesmos indicaram associação com fenótipos de produção.

A associação encontrada entre o alelo 138 do marcador BM1500 e a característica peso, é um dado importante, pois o marcador BM1500 pode ser utilizado para eliminar as fêmeas que apresentem o alelo 138, pois elas não terão tanta eficiência no ganho de peso em comparação com as fêmeas que não apresentem tal alelo. Assim, o marcador poderá ser utilizado em processos de seleção assistida por marcadores, e em análises com maior número amostral a fim de ter maior acurácia nas análises estatísticas, para buscar associações significativas em populações de bovinos com interesse econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Importadoras de Carnes** (2017a). Disponível em: < <http://abiec.com.br/ExportacoesPorPais.aspx>>. Acesso em: 24 jan. 2017.
- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Importadoras de Carnes** (2017b). Disponível em: <<http://abiec.com.br/download/abiec-170117.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2017.
- ABUD, L.J. **Peso, idade e perfil bioquímico, hematológico e hormonal de novilhas Nelore à puberdade**. 2013. 85 f.. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- ACNB – Associação dos Criadores de Nelore do Brasil** (2016). Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca/Caracterizacao>>. Acesso em: 21 dez. 2016.
- AZEVÊDO, D.M.M.; AZEVÊDO, A.R.; ALVES, A.A. Eficiência reprodutiva em bovinos de leite. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, 3 (2): 48-61, 2001.
- BERGMAN, J.A.G. **Seleção de Zebuínos para Precocidade Sexual**. In: SIMCORTE - Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte, 1. 1999, Viçosa. *Anais...Viçosa*: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 51-64.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, H.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet.**, 32: 314-331, 1980.
- BUCHANAN, F.C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genet Select Evol.**, 34: 105-116, 2002.
- BUZANSKAS, M.E. **Associação de polimorfismos de nucleotídeo único com características de crescimento e reprodutivas em bovinos Canchim**. 2013. 111 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, 2013.
- CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceito básico, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **R. Bras. Zootec.**, 38: 64-71 (supl. Especial), 2009.
- CARDOSO, F.F. **Ferramentas e estratégias para o melhoramento genético de bovinos de corte**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2009. 42 p.
- CARVALHO, T.D. et al. Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. **R. Bras. Zootec.**, 41 (10): 2162-2168, 2012.
- CATUNDA, A.G.V. et al. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 38 (1): 3-9, 2014.
- CAVALCANTI, J.J.V. **Importância da seleção assistida por marcadores moleculares**. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 12. 2009, Fortaleza, *Anais... Fortaleza*,

Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11692/1/RE09165.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estud. av.**, 24 (70): 123-147, 2010.

CRISPIM, B.A.; SANTOS, D.B.S.; BANARI, A.C.; SENO, L.O.; GRISOLIA, A.B. Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélite. **Journal of the Selva Andina Research Society**, 1(1): 3-13, 2012.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genéticos moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FERRAZ, J.B.S. et al. Association of single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. **Genet. Mol. Res.**, 8 (4): 1360-1366, 2009.

FITZSIMMONS, C.J.; SCHMUTZ, S.M.; BERGEN, R.D.; MCKINNON, J.J. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mamm Genome**, 9: 432-434, 1998.

FRIZZAS, O.G. et al. Heritability estimates and genetic correlations for body weight and scrotal circumference adjusted to 12 and 18 months of age for male Nellore cattle. **Animal**, 3 (3): 347-351, 2009.

GARNERO, A.D.V.; MARCONDES, C.R.; BEZERRA, L.A.F.; OLIVEIRA, H.N.; LÔBO, R.B. Parâmetros genéticos de taxa de maturação e do peso assintótico de fêmeas da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 57 (5): 652-662, 2005.

GEARY, T.W. et al. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **J. Animal Sci.**, 81:1-8, 2003.

GOTTSCHALL, C.S. et al. Resposta reprodutiva de novilhas de corte associada a marcadores moleculares relacionados à fertilidade. **Acta Sci Vet.**, 41: 1-12, 2013.

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

KOMISAREK, J. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. **Anim. Sci. Pap. Rep.**, 28: 133-141, 2010.

KOMISAREK, J.; DORYNEK, Z. The relationship between the T945M single nucleotide polymorphism in the leptin receptor gene (*LEPR*) and milk production traits in Jersey cows. **Anim. Sci. Pap. Rep.**, 24 (4): 271-277, 2006.

KOWALSKI, L.H. et al. Leptina e grelina na produção de ruminantes. **Revista de Ciências Agrárias**, 37 (4): 375-383, 2014.

LAIRD, A.K. Dynamics of relative growth. **Growth**, 29: 249-263, 1965.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. **Genetics Society of America**, 124: 743-756, 1990.

LIEFERS, S.C. et al. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Anim Genet**, 35: 138-141, 2004.

LIEFERS, S.C.; te PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; van der LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. **J Dairy Sci**, 85: 1633-1663, 2002.

MARCELINO, F.C.; BINNECK, E.; ABDELNOOR, R.V.; NEPOMUCENO, A.L. **Ferramentas biotecnológicas aplicadas à culturas de soja**. Circular Técnica 47 – Embrapa Soja, Londrina – PR, 2007.

MARQUARDT, D.W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **J. Soc. Ind. Appl. Math.**, 11: 431-441, 1963.

MATOS, M.C. **Associação genômica ampla para características reprodutivas em bovinos da raça nelore**. 119 f. Jaboticabal, 2012. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N.; FILHO, E.C.P.; BERMEJO, J. V.D. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **R. Bras. Zootec.**, 35 (4): 1336-1341, 2006.

NKRUMAH, J.D. et al. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. **J. Animal Sci.**, 83: 20-28, 2005.

OLIVEIRA, E.J. et al. **Seleção de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) informativos para integração de análises moleculares em mandioca**. In: Congresso Brasileiro De Mandioca, 14.; Feira Brasileira Da Mandioca, 1., 2011, Maceió. *Anais...* Maceió: ABAM: SBM, 2011.

OLIVEIRA, J.A. et al. Association of the leptin gene with carcass characteristics in Nelore cattle. **Anim Biotechnol.**, 24: 229-242, 2013.

PASSOS, D.T. **Efeito de polimorfismos no gene LEP na expressão da leptina em adipócitos de bovinos de corte**. 81 f. Porto Alegre, 2006. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2006.

PAZ, C.C.P. et al. Ajuste de modelos não-lineares em estudos de associação entre polimorfismos genéticos e crescimento em bovinos de corte. **R. Bras. Zootec.**, 33 (6): 1416-1425, 2004.

PAZ, C.P.P. **Associação entre polimorfismos genéticos e parâmetros da curva de crescimento em bovinos de corte**. Piracicaba, 2002. 107 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

POLIDO, P.B.; FERREIRA, F.G.; ALBERTON, O.; SOUZA, S.G.H.; Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, 15 (2): 161-169, 2012.

RAMOS, N.P.; BRUNELLI, K.R.; CAMARGO, L.E.A.; FILHO, J.M. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Rev. bras. sementes**, 28 (1): 99-105, 2006.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biol Reprod.**, 66(3): 603-609, 2002.

ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev. Nutr.**, 19 (1): 85-91, 2006.

ROSA, A.N.F.; MENEZES, G.R.O. **Artigo: Papel do Zebu na pecuária de corte brasileira**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9523901/artigo-papel-do-zebu-na-pecuaria-de-corte-brasileira>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

SALMAN, A.K.D. **Perspectivas de uso dos marcadores moleculares na bovinocultura de corte**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 18 p.

SALMAN, A.K.D.; COSTA, R.B. Ação hormonal da leptina em ruminantes. **Embrapa Rondônia**, Porto Velho, Rondônia, 2006. 21 p.

SILVA, D.B.S. et al. Genetic variations in the leptin gene associated with growth and carcass traits in Nellore cattle. **Genet Mol Res.**, 13 (4): 3002-3012, 2014.

SILVA, D.F. **Identificação e validação de marcadores moleculares indel e SNP para lipoxigenases de sementes de soja**. 65 p. 2009. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

SILVA, F.L.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R.; PACKER, I.U.; MOURÃO, G. B. Curvas de crescimento em vacas de corte de diferentes tipos biológicos. **Pesq. agropec. bras.**, 46 (3): 262-271, 2011.

SILVA, P.I.T. **Descoberta e validação de marcadores SNPs por sequenciamento de alta performance do genoma estrutural e por genotipagem por sequenciamento (GSB) de arroz sequeiro (*Oryza sativa* spp. *japônica*)**. 139 p. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2012.

SILVA, R.C.G. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. **Genet Mol Res.**, 11 (4): 3721-3728, 2012.

SILVA, R.C.G. **Estudo de caracterização e associação de marcadores moleculares relacionados à leptina para características de crescimento e precocidade de acabamento em bovinos da raça Nelore**. 72 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2008.

SOUSA, M.; BRÁS-SILVA, C.; LEITE-MOREIRA, A. O papel da leptina na regulação da homeostasia energética. **Acta Med Port.**, 22: 291-298, 2009.

TANAKA, A.L.R. **Eficiência reprodutiva de fêmeas Nelore**. 2010. 116 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, 2010.

TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T.; SASAKI, Y. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB life**, 53 (2): 131-135, 2002.

TEIXEIRA, B.B. **Avaliação genética do crescimento em bovinos da raça nelore por meio de modelos multivariados e de regressão aleatória**. 2015. 53 f. Tese (*Doctor Scientiae* em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D.L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocr Rev.**, 22 (1): 111-115, 2001.

TRAKOVICKÁ, A.; MORAVČÍKOVÁ, N.; KASARDA, R. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. **Acta Biochim. Pol.**, 60: 783-787, 2013.

USDA – **United States Department of Agriculture** (2016). Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2016.

VAICIUNAS, A. **Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não-precoces**. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição e Produção Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VECHETINI, M.E. **Caracterização de polimorfismos no gene *DGATI* e no gene da leptina em uma população de novilhas Nelore**. 2007. 32 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Universidade Estadual Paulista.

VIU, M.A.O. et al. Índices usados para seleção de características reprodutivas em bovinos de corte. **PUBVET**, Londrina, 2 (37), 2008.

WILCOX, C.J. An investigation of the inheritance of female reproductive performance and longevity, and their interrelationship with a Holstein-Friesian herd. *Journal of Dairy Science*, **J Dairy Sci.**, 40 (8): 924-947, 1957.

WILLIAMS, G.L. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domest Anim Endocrinol.**, 23: 339–349, 2002.

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; FANG, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **J Anim Sci Biotechnol.**, 4 (1): 2, 2013.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domest Anim Endocrinol.**, 29: 166-185, 2005.