

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS ALFA 2 - ADRENÉRGICA,
DOPAMINÉRGICA E GABAÉRGICA NO CONTROLE DA
SECREÇÃO DE GH NO PERÍODO PRÉ-PÚBERE EM
NOVILHAS DA RAÇA NELORE**

Emiliana de Oliveira Santana Batista
Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE ODONTOLOGIA E CURSO MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS ALFA 2 - ADRENÉRGICA,
DOPAMINÉRGICA E GABAÉRGICA NO CONTROLE DA
SECREÇÃO DE GH NO PERÍODO PRÉ-PÚBERE DE
NOVILHAS DA RAÇA NELORE**

Emiliana de Oliveira Santana Batista

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, curso Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

EMILIANA DE OLIVEIRA SANTANA BATISTA - nasceu na cidade de Araçatuba – SP, em 29 de junho de 1983. Em 2003 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Odontologia, Unesp - Campus Araçatuba. Em novembro de 2007 apresentou o relatório final de seu estágio curricular supervisionado. Graduiu-se em 30/11/2007. No período de 01/01/08 a 30/06/08 realizou treinamento técnico no Laboratório de Endocrinologia Animal – Campus Araçatuba. Em julho de 2008 iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Ciência Animal), nível de Mestrado na Faculdade de Odontologia, curso de Medicina Veterinária – Unesp – Campus de Araçatuba.

**“Acontece a todo o momento:
as pessoas decidem mudar seu futuro”.** (Richard Bach)

**“Quanto maior são as dificuldades a vencer, maior será a
satisfação”.** (Cícero)

“Disciplina é liberdade”. (Renato Russo)

Dedico esse trabalho, aos meus pais, Isabel Cristina de Oliveira Santana Batista e Milton de Oliveira Batista. Agradeço por todo apoio e amor que sempre dedicaram a mim. Muito obrigada por acreditarem nos meus sonhos.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, pela paciência e confiança.

Ao Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira, por ceder as replicatas de suas amostras para o meu trabalho.

A Profa. Dra. Silvia Venturolli, pela contribuição com a estatística do trabalho.

A Profa. Dra. Cláudia Maria Bertan Membrive e ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini por terem aceito participar da minha banca de qualificação, muito obrigada.

Ao Prof. Ciro Moraes Barros e a Profa. Dra. Cláudia Maria Bertan Membrive por terem aceito participar da minha banca de defesa, muito obrigada.

A Profa. Dra. Juliana Regina Peiró, Coordenadora do Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal.

A seção de pós-graduação em Ciência Animal, principalmente a Valéria de Queiroz M Zagatto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos meus pais, Milton de Oliveira Batista e Isabel Cristina de Oliveira Santana Batista e ao meu irmão Milton de Oliveira Batista Filho (Tinho) por todo apoio e dedicação oferecida a mim em mais uma etapa importante da minha vida.

Aos meus tios Carmem Silva e Sérgio Casteletto, Martha Santana Gottardi e Aguinaldo Gottardi, que foram mais do que tios para mim em Araçatuba. Não tenho nem palavras para dizer o quanto foram e o quanto são importantes. Muito obrigada!

A vó Lola e ao tio Lee, com quem morei durante estes anos de mestrado.

A toda minha família que reside em Araçatuba.

À equipe do Laboratório de Endocrinologia Animal – UNESP – Araçatuba: Rafael Silva Cipriano (Rafa), Leandro Mingroni Pavanello (Lê), Maria Carolina Villani Miguel (Carolzita) e Sarita Gobbo Ferrari (Sá), por estarem sempre ao meu lado, por me ajudarem sempre quando precisei. Para onde quer que eu vá, serão amigos que vou levar sempre comigo.

A Devani Mariano Pinheiro (Dê), pela dosagem hormonal. Alguém que eu vou sempre lembrar com muito carinho.

A meu grande amigo, Anivaldo Olívio Corte Júnior (Pano), um irmão, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos, a quem eu tenho grande admiração. Muito obrigada por tudo sempre!

Aos meus amigos, Juliana Peli Vides (Nê), Diogo Gaubeur de Camargo (Shu), Lucas Cardoso (Cufri), Fabrine Bigatão (Fá), Tatiana Barbosa (Tati), Tatianna Frate (Tatinha), Larissa Bedore Zoccal (Laris). Amigos especiais, pessoas importantes. Meu mestrado em Araçatuba não teria sido o mesmo sem vocês.

As minhas grandes e eternas amigas: Maria Paula Marçal (Mary), Gislangi Martins Neto (Gi), Juliana Perroni de Aguiar (Ju), Livia Maria Martins Ramos (Li), Anna Luiza Tomazzi (Ana), que mesmo longe estão sempre presentes. Amo vocês!!!

E a todos, que de alguma forma colaboraram com essa etapa, que estiveram comigo nesta caminhada, com certeza fizeram a diferença. Muito Obrigada!!!

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS ALFA-2-ADRENÉRGICA, DOPAMINÉRGICA E GABAÉRGICA NO CONTROLE DA SECREÇÃO DE GH NO PERÍODO PRÉ-PÚBERE EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE

RESUMO - Foi avaliada a variação na concentração de GH em resposta a agonistas ou antagonistas de neurotransmissores durante o período pré-púbere em 10 novilhas da raça Nelore. A administração de um antagonista gabaérgico (picrotoxina, 0,18 mg/kg, I.V., amostras a cada 15 min por 10 h) aumentou a concentração de GH aos 10 meses de idade, mas não aos 14 e 17 meses. Tanto no grupo Picrotoxina, como no Controle a concentração média de GH foi maior aos 10 meses do que aos 17 meses de idade. O grupo picrotoxina apresentou aos 17 meses maior área de concentração de GH que o controle. O grupo picrotoxina apresentou aos 14 meses maior área total de picos que o controle. Aos 10 e 14 meses no grupo Picrotoxina houve maior amplitude de picos do que aos 17 meses. Bloqueando o receptor (D2) dopaminérgico (sulpiride, 0,59 mg/kg, SC, amostras a cada 15 min por 10 h) houve aumento na concentração de GH aos 8 e 12 meses, mas não aos 16 meses de idade, comparado ao grupo controle. No grupo Sulpiride a concentração média de GH foi maior aos 8 e 12, comparado com os 16 meses de idade. Em relação à área total de secreção, área total de picos, e amplitude máxima de picos de secreção de GH não houve diferença entre os grupos. Aos 8 meses o grupo Sulpiride apresentou menor tempo, porém aos 12 meses o tempo foi maior para o primeiro pico em relação ao controle. O tempo para o primeiro pico foi menor aos 8 e 16 meses que aos 12 meses no grupo Sulpiride. No grupo controle aos 12 meses o tempo para o primeiro pico foi menor que aos 8 e 16 meses. Aos 16 meses o grupo Sulpiride apresentou maior frequência de picos que o Controle. A aplicação de um estimulador alfa-adrenérgico (clonidina, 10 µg/kg, I.V., amostras a cada 15 min por 4 h) aumentou a concentração média de GH aos 8 e 15 meses em relação ao grupo Controle e em alguns intervalos aos 12 meses. Aos 8 meses o grupo Clonidina apresentou maior área total de secreção, área total de picos, amplitude máxima

de picos e menor tempo para o primeiro pico de secreção de GH em relação ao grupo Controle. Foi possível concluir que, em novilhas pré-púberes da raça Nelore as vias gabaérgica e dopaminérgica têm papel inibitório enquanto que a via alfa 2 - adrenérgica tem papel estimulatório na secreção de GH e a participação destes varia em função da idade.

Palavras – chave: Maturação sexual, Hormônio do crescimento, *Bos Indicus*, Picrotoxina, Sulpiride, Clonidina.

ROLE OF THE ALPHA-ADRENERGIC, DOPAMINERGIC AND GABAERGIC PATHWAYS IN THE GROWTH HORMONE SECRETION CONTROL IN PRE-PUBERTAL NELORE HEIFERS

SUMMARY- This study evaluated the GH concentration after neurotransmitter agonist or antagonists injection in prepubertal Nelore heifers at different ages. A gabaergic antagonist (picrotoxin, 0.18 mg/kg, I.V., samples every 15 min for 10h) promoted an increase on GH concentration at 10 months of age but not at 14 and 17 mo. In both Picrotoxin and Control groups GH average concentration was higher at 10 mo than at 17 month of age. At 17 mo the picrotoxin group had a larger GH concentration area than control. There was no difference among the groups on the time for the first GH surge, but at 14 mo the Picrotoxin group had a higher total peak area than control. At 10 and 14 mo the Picrotoxin group had an higher peak amplitude than at 17 months. Blocking the D2-dopaminergic receptor (Sulpiride 0.59 mg/kg, SC, samples every 15 min for 10 h) there was an increase on GH secretion at 8 and 12 months, but not at 16 mo of age, compared to control group. Inside Sulpiride group the average GH concentration was higher at 8 and 12 mo than at 16 month of age. For both total area, peaks total area, time for first peak, and peak maximal amplitude there was no difference among groups. The time for the first GH peak was lower for Sulpiride compared to Control group at 8 mo, but at 12 mo the time was higher than in Control. Inside Sulpiride group time was lower at 8 and 16 month compared to 12. In the control group time for the first peak was lower at 12 than 8 and 16 months. At 16 month the Sulpiride group had higher peak frequency than Control. An alpha adrenergic stimulation (Clonidine, 10 µg/kg, IV, samples every 15 min for 4 h) increased mean GH concentration at 8 and 15 months compared to Control group and at some intervals at 12 months. At 8 months Clonidine group had higher total secretion area, total peak area, maximum peak amplitude and lowe time for the first GH secretion peak, compared to control group. It was possible to conclude that in prepubertal Nelore, that both gabaergic and dopaminergic pathways had inhibitory effects,

for instance alpha 2 adrenergic pathways had stimulatory effects their roles changes according to age.

Key words: Prepubertal, growth hormone, *Bos Indicus*, picrotoxin, sulpiride, clonidine.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes, que receberam picROTOXINA (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses (n = 5), 14 meses (n = 5), 17 meses (n =4) e solução salina a 0,9% aos 10, 14 e 17 meses, com n = 4.....	49
Figura 2 - Área total de secreção de GH (ng/mL) min, valores não transformados; Média \pm EPM em novilhas Nelore pré - púberes que receberam picROTOXINA (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses (n = 5), 14 meses (n = 5), 17 meses (n = 4) e solução salina a 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com n = 4.....	50
Figura 3 - Tempo necessário para o aparecimento do primeiro pico de secreção de GH (min, valores não transformados, Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picROTOXINA, (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses (n = 5), 14 meses (n =5), 17 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses (n = 4)	51
Figura 4 - Área total de picos de secreção de GH (ng/mL) min, valores não transformados; Média \pm EPM em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picROTOXINA, (0,18 mg/kg, I.V.) em 10 meses n = 5, 14 meses (n = 5) e 17 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com n = 4.....	52
Figura 5 - Amplitude máxima dos picos de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam picROTOXINA (0,18 mg/kg, I.V.) em 10 meses (n= 5), 14 meses (n = 5) e 17 meses (n =4) e solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com n = 4.....	53

Figura 6 -	Número de picos de secreção de GH (valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam picrotoxina (0,18 mg/kg, I.V.) em 10 meses (n= 5), 14 meses (n = 5) e 17 meses (n =4) e solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com n = 4	54
Figura 7 -	Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0, 59 mg/kg, SC) aos 8 meses (n = 5), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 8 meses (n =4),12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4).....	63
Figura 8 -	Área total de secreção de GH (ng/mL) min, valores não transformados; Média \pm EPM entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0, 59 mg/kg, SC) aos 8 meses (n = 5), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4).....	64
Figura 9 -	Área total de picos de secreção de GH (ng/mL), valores não transformados; Média \pm EPM entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0, 59 mg/kg, SC) aos 8 meses (n = 5), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4)	65
Figura 10 -	Tempo para aparecimento do primeiro pico de secreção de GH (min, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0, 59 mg/kg, SC) aos 8 meses (n = 5), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4).....	66

Figura 11 - Comparação da amplitude máxima dos picos de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré - púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses (n = 5), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4)	67
Figura 12 - Número de picos de secreção de GH (valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses (n = 5), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4) e solução salina 0,9% aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 16 meses (n = 4).....	68
Figura 13 - Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.) e solução salina 0,9% aos 8 meses com n = 4.....	75
Figura 14 - Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore que receberam clonidina, n = 4 (10 μ g/kg, I.V.) e solução salina 0,9% aos 12 meses com n = 5.....	76
Figura 15 - Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore aos 15 meses que receberam clonidina,(10 μ g/kg, I.V.), n = 5 e solução salina 0,9% com n = 4.....	77
Figura 16 - Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.), aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 4) e 15 meses (n = 5) e solução salina aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 15 meses (n = 4).....	78

<p>Figura 17 - Área total de picos de secreção de GH (ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μg/kg, I.V.), aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 4) e 15 meses (n = 5) e solução salina aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 15 meses (n = 4).....</p>	79
<p>Figura 18 - Área total de secreção de GH (ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μg/kg, I.V.), aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 4) e 15 meses (n = 5) e solução salina aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 15 meses (n = 4).....</p>	80
<p>Figura 19 - Amplitude máxima de picos de GH (ng/mL), valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μg/kg, I.V.), aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 4) e 15 meses (n = 5) e solução salina aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 15 meses (n = 4).....</p>	81
<p>Figura 20 - Tempo para aparecimento do primeiro pico de secreção de GH (min); valores não transformados; Média \pm EPM em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μg/kg, I.V.), aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 4) e 15 meses (n = 5) e solução salina aos 8 meses (n = 4), 12 meses (n = 5) e 15 meses (n = 4).....</p>	82
<p>Figura 21 - Esquema da possível ação dos neurotransmissores na regulação da secreção de GH, em novilhas da raça Nelore, durante o processo de maturação sexual, (+) feedback positivo, (-) feedback negativo..</p>	87

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervoso Central
GH	Hormônio do Crescimento
IGF	Fator de Crescimento tipo insulina
IGF-1	Fator de Crescimento tipo insulina 1
rbST	Somatotrofina recombinante bovina
LH	Hormônio luteinizante
mRNA	RNA mensageiro
FSH	Hormônio folículo estimulante
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GABA	Ácido gama aminobutírico
GABAA	Receptor para GABA tipo A
GABAB	Receptor para GABA tipo B
GABAC	Receptor para GABA tipo C
D1	Receptor para dopamina tipo 1
D2	Receptor para dopamina tipo 2
LC	<i>Locus coeruleus</i>
PBN	Núcleo parabraquial
I.M.	Intramuscular
I.V.	Intravenoso
S.C.	Subcutâneo
12 GA	12 Gauge
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
NaCl 0,9%	Cloreto de Sódio a 0,9%
MEC	Taxa metabólica basal
SMEC	Custo energético específico mínimo
K	Constante
PM	Peso Metabólico
PB 0,05	Solução tampão fosfato potássio a 0,05
PB 0,01	Solução tampão fosfato potássio a 0,01
BSA 1%	Albumina Sérica Bovina a 1%
PBS-BSA	Solução tampão fosfato potássio com albumina sérica bovina
h	Horas
rpm	Rotações por minuto
min	Minutos

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 21
2	REVISÃO DE LITERATURA 24
2.1	Hormônio do crescimento..... 24
2.2	Papel do hormônio do crescimento na reprodução..... 25
2.3	Hormônio do crescimento e puberdade..... 28
2.4	Regulação da secreção do hormônio do crescimento. 29
2.5	Sistema gabaérgico..... 30
2.6	Sistema dopaminérgico..... 31
2.7	Sistema noradrenérgico..... 32
3	HIPÓTESES 34
4	OBJETIVOS 34
4.1	Objetivos Gerais..... 34
4.2	Objetivos Específicos..... 34
5	MATERIAL E MÉTODOS 36
5.1	Generalidades..... 36
5.1.1	Canulação da jugular..... 36
5.2	Sistema alométrico para transposição de doses..... 38
5.2.1	Uso, características e definições..... 38
5.2.2	Utilidades..... 40
5.2.3	Fórmulas..... 40
5.3	Radioimunoensaio para GH..... 42

6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
7	Experimento 1: Estudo sobre a participação do sistema gabaérgico, no controle da secreção de GH, em novilhas Nelore pré-púberes.....	46
7.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
7.1.1	Animais e manejo.....	46
7.1.2	Administração de picrotoxina e coleta de amostras de sangue.....	47
7.1.3	Delineamento experimental.....	47
7.2	RESULTADOS.....	48
7.3	DISCUSSÃO.....	54
7.4	CONCLUSÕES.....	60
8	Experimento 2: Estudo sobre a participação do sistema dopaminérgico, no controle da secreção de GH, em novilhas Nelore pré-púberes.....	61
8.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
8.1.2	Animais e Manejo.....	61
8.1.3	Delineamento experimental.....	61
8.1.4	Administração de sulpiride e coleta de amostras de sangue.....	62
8.2	RESULTADOS.....	62
8.3	DISCUSSÃO.....	68
8.4	CONCLUSÕES.....	72

9	Experimento 3: Estudo sobre a participação do sistema adrenérgico, no controle da secreção de GH, em novilhas Nelore pré –púberes.....	73
9.1	MATERIAL E MÉTODOS	73
9.1.2	Animais e Manejo.....	73
9.1.3	Administração de clonidina e coleta de amostras de sangue.....	73
9.1.4	Delineamento experimental.....	74
9.2	RESULTADOS	74
9.3	DISCUSSÃO	82
9.4	CONCLUSÕES	85
10	CONCLUSÕES FINAIS	86
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE	105

Apêndice A – Fig. 1A - Delineamento de aplicação dos tratamentos e do período de coleta de amostras durante o experimento 1: tratamento – picrotoxina (0,18 mg/kg, I.V.) ou solução salina 0,9% (grupo Controle), coleta de sangue por 1 h antes do tratamento e por 10 h pós-tratamento, em intervalos de 15 min.; experimento 2: tratamento – sulpiride (0,59 mg/kg, SC) ou solução salina 0,9% (grupo Controle), coleta de sangue por 1 h antes do tratamento e por 10 h pós-tratamento, em intervalos de 15 min.; experimento 3: tratamento – clonidina (10 µg/kg, I.V.) ou solução salina 0,9% (grupo Controle), coleta de sangue por 1 h antes do tratamento e por 4 h pós tratamento, em intervalos de 15 min..... 106

1 INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro possui mais de 200 milhões de cabeças, sendo o segundo maior do mundo (PRODUÇÃO, 2009). Desse montante, 80 % dos animais possuem sangue zebuíno, com destaque para a raça Nelore, a principal da pecuária de corte nacional (HISTÓRIA, 2009). Isto graças à rusticidade dos zebuínos, mais adaptados que os taurinos às condições ambientais brasileiras.

Nos aspectos mais relevantes do sistema produtivo, como raça, peso e idade dos animais ao abate, capacidade de suporte dos pastos, suplementação alimentar, cobertura, natalidade e taxa de desfrute, a maior parte do plantel está ainda sujeita a níveis de desempenho muito aquém do recomendado (IPARDES, 2002).

As falhas reprodutivas são um dos mais importantes fatores que limitam o melhor desempenho da pecuária de corte brasileira (PESSUTI & MEZZADRI, 2004). Associado a baixa qualidade do desempenho reprodutivo está o desenvolvimento adequado das novilhas. A idade a puberdade, condição reprodutiva, raça e composição genética são características importantes nas matrizes, que irão influenciar a produtividade. Melhoria genética e nutricional visando redução da idade à puberdade contribui para o aumento na vida reprodutiva do animal e conseqüentemente a produção de um maior número de bezerros ao longo da vida reprodutiva da fêmea, com benefícios para toda a cadeia produtiva (CARDOSO & NOGUEIRA, 2007).

Desta forma, além da implementação de boas práticas de manejo para melhoria do sistema de produção, é importante conhecer os processos fisiológicos que controlam a primeira ovulação (PATTERSON et al., 2006).

Sabe-se que a idade à primeira ovulação e a manutenção da função reprodutiva está ligada à nutrição e a condição corporal, mas se desconhece a maneira exata como essa relação é estabelecida (CHEUNG et al., 1997).

Para que a primeira ovulação ocorra, o peso do animal é uma característica importante, uma vez que a nutrição inadequada atrasa a puberdade. Uma questão importante é a de que como o sistema nervoso central (SNC) reconhece que o organismo chegou a um desenvolvimento apropriado, compatível com a reprodução (NOGUEIRA, 2006). Em uma revisão recente, Chagas et al. 2007 indicaram a importância da ligação entre o fluxo de nutrientes com o eixo gonadotrófico e somatotrófico. Hormônios metabólicos como hormônio do crescimento (GH), insulina, fatores de crescimento do tipo insulina (IGFs) e leptina, têm papel importante em integrar as funções de lactação, apetite, metabolismo e reprodução.

O GH parece ter um papel no controle folicular ovariano. Em ovelhas hipofisectomizadas, o crescimento folicular e a ovulação não foram induzidos pela administração de gonadotrofina exógena, exceto enquanto GH era co-administrado (ECKERY et al., 1997).

Em ratas, a redução da secreção de GH promoveu atraso na puberdade. Um dos mecanismos pelo qual o GH parece participar do processo de maturação

que permite que ocorra a puberdade é por aumentar a sensibilidade ovariana as gonadotrofinas (ADVIS et al., 1981). Mudanças na concentração média e amplitude dos pulsos de GH foram observadas no período pré-púbere em novilhas, sugerindo que o GH tenha participação no desenvolvimento pubertal (YELICH et al., 1996).

Durante a maturação sexual na novilha, além das modificações na sensibilidade do hipotálamo ao estradiol, ocorrem alterações nas respostas a neurotransmissores estimulatórios e inibitórios em função da idade e da disponibilidade de energia no meio interno (RAWLINGS et al., 2003). Em novilhas Nelore pré-púberes, os mecanismos neuroendócrinos que controlam a secreção de GH foram pouco estudados. Entendendo os mecanismos neuroendócrinos envolvidos na maturação sexual de novilhas Nelore é possível interferir no processo de puberdade e antecipar a idade à primeira ovulação destes animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hormônio do Crescimento

O GH é um hormônio protéico com peso molecular de aproximadamente 22.000 e 191 aminoácidos (bGH), sintetizado em somatotrófos na hipófise anterior como um peptídeo de 190 aminoácidos nos suínos e como um peptídeo de 191 aminoácidos em ovinos e bovinos (MILLER et al., 1980, WARWICK et al., 1989, KATO et al., 1990). Os hormônios da hipófise anterior podem ser classificados em três grupos com base em sua estrutura e semelhança funcional, incluindo a família proopiomelanocortina, a família de hormônios glicoprotéicos, e a família do GH esta última inclui o GH e a prolactina (KAWAUCHI, 1989).

É aceito que o GH seja produzido e atue em vários tecidos (incluindo a hipófise) exercendo ação parácrina (HARVEY e HULL, 1997). Tanto o GH quanto a prolactina são produzidos na placenta de roedores, ruminantes e primatas (FOORSYTH, 1994).

O GH é essencial para o crescimento e desenvolvimento somático normal. Sua secreção é influenciada por vários fatores como sono e estresse, e a concentração plasmática pode variar cerca de 10 vezes em alguns minutos. Um dos maiores aumentos ocorre logo após o começo do sono. Outro estímulo à secreção de GH é o estresse (frio, ansiedade, cirurgia), além de exercício, hipoglicemia severa ou jejum, refeições ricas em proteínas, e o aumento na concentração de aminoácidos como arginina. A resposta ao estresse pode ser

mediada pela ação das catecolaminas, via hipotálamo. Estes e muitos outros estímulos podem ser consequência da ação fisiológica do GH no metabolismo da glicose. No estresse, hipoglicemia, sono ou jejum, o GH promove a lipólise e a entrada de aminoácidos nas células, poupando glicose para o metabolismo cerebral (MURRAY et al., 1990).

Uma variedade de outros agentes influencia a liberação do GH, incluindo dopamina, agentes alfa-adrenérgicos, serotonina, hormônios gastro-intestinais (GAHETE et al., 2009).

2.2 Papel do hormônio do crescimento na reprodução

Vários hormônios metabólicos são reconhecidamente importantes como sinalizadores entre a reserva energética e a reprodução. Em bovinos, problemas no metabolismo aos 7 e 8 meses de idade podem afetar o desenvolvimento folicular resultando em um atraso na puberdade (SIMPSON et al., 1991).

Teoricamente o GH parece afetar a função ovariana por meio de três mecanismos: (1) por estímulo direto na produção de IGF-1 intraovariano, (2) estimulando a produção hepática de IGF-1, que então age no ovário e (3) através de mecanismos independentes de IGF-1 (ZEEV, 1991).

O uso de somatotrofina recombinante (rbST) aumenta a concentração sérica de GH (STANKO et al., 1994). Em novilhas, o uso de rbST bovina dobrou a população de folículos com 2 a 5 mm de diâmetro e este efeito não parece ser

mediado por mudanças na concentração de gonadotrofinas (HALL et al., 1994), mas sim por um aumento nas concentrações de IGF-1 (GONG et al.;1991, GONG et al.; 1993, DEEVER et al., 1999). Porém um efeito direto do GH no ovário não deve ser descartado. Em cultura de células da granulosa de bovinos a adição de GH com a insulina produziu um efeito dose-dependente no número de células e produção de progesterona no meio de cultura (LANGHOUT et al., 1991).

Evidências da importância do GH na função do corpo lúteo foram obtidas em um estudo com ovelhas hipofisectomizadas e suplementadas com hormônio luteinizante (LH) ou LH + GH. Para avaliar a função luteal, concentração de progesterona sérica, peso do corpo lúteo foram determinados. Ambos GH e LH foram necessários para o desenvolvimento normal do corpo lúteo (JUENGEL et al., 1995).

Foi observado que o corpo lúteo bovino continha mais mRNA para receptores de GH, comparado a outros tecidos reprodutivos (KIRBY et al., 1996). Em vacas lactantes, o uso de somatotrofina recombinante bovina (rbST) aumentou as concentrações de progesterona durante a fase luteal (SCHEMM et al., 1990, LUCY et al., 1994), sendo que a resposta luteal à somatotrofina dependeu do status fisiológico, ambiente e nutrição (DEEVER et al., 1999).

Em ovinos, foi observado um aumento no mRNA para GH nos somatotrófos e nas concentrações séricas de GH durante a fase folicular do ciclo, ocorrendo maior aumento próximo ao pico de LH/FSH (LANDEFELD et al., 1989). Foi observada uma distribuição de mRNA para receptores de GH correlacionados com

estágio de desenvolvimento folicular, em folículos primordiais os oócitos mostraram quantidades distintas de receptores de GH, nos folículos terciários o mRNA foi predominantemente localizado em células no *cumulus oophorus* (KOLLE et al., 1998).

Há evidências que o uso da somatotrofina aumente o recrutamento de folículos, mas não tenha ação sobre o processo de dominância (DEAVER et al., 1999). Lucy et al. (1994) trabalhando com novilhas da raça Holandesa tratadas com rbST, observaram um antecipação da segunda onda folicular. Em humanos, a maior resposta a IGF-1 nas células da granulosa foi associada com a maior concentração de estradiol no fluido folicular, sugerindo que o IGF-1 possa ter um papel na seleção folicular (ERICKSON et al., 1989).

Em vacas com deficiência de receptores do hormônio do crescimento, foi observado um número menor de folículos ovarianos durante a primeira onda folicular, um menor tamanho do folículo dominante e um desenvolvimento mais lento do corpo lúteo (CHASE et al., 1998). Além disso, há relatos de que o uso da somatotrofina aumente a resposta superovulatória ao FSH em bovinos (GONG et al., 2002).

A adição de GH durante a maturação *in vitro* acelera a maturação nuclear, induz a expansão do *cummulus*, e promove subsequente clivagem e desenvolvimento embrionário, promovendo uma maior taxa de fertilização como consequência de uma melhora na maturação citoplasmática (IZADYAR et al., 1998).

2.3 Hormônio do crescimento e puberdade

Há evidências que o hormônio do crescimento e IGF-1 são importantes mediadores metabólicos envolvidos no início da puberdade em novilhas. A imunização de novilhas para hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) produziu redução na concentração sérica de GH, IGF-1, insulina e atrasou a puberdade nestes animais (SIMPSON et al., 1991). A redução na concentração sérica e ovariana de IGF-1 pode comprometer o crescimento folicular e desenvolvimento de novilhas pré-púberes dos 3 aos 6 meses de idade (STANKO et al., 1994).

Mudanças na concentração e amplitude de pulsos de GH foram observadas no período pré-púbere de novilhas, búfalas e ratas sugerindo que este hormônio tenha um papel no desenvolvimento pubertal nestes animais (YELICH et al., 1995, OJEDA et al., 1977, HALDAR et al., 2005). Em macacas *rhesus*, a primeira ovulação foi adiantada com o hormônio do crescimento exógeno (WILSON et al., 1989). No entanto, o tratamento com rbST não influenciou o número de novilhas que atingiram a puberdade (McSHANE et al., 1989, HALL et al., 1994, MOREIRA et al., 2000, MOALLEM et al., 2004). Porém, quando o tratamento com rbST foi associado a uma dieta rica em energia, foi observada uma redução na idade ao primeiro parto (RADCLIFF et al., 2000).

Camundongos *knouckt* para receptores de GH exibiram um atraso na maturação sexual (BARTKE, 1999). Ramaley e Phares et al., (1980) observaram

atraso na puberdade em ratas com taxas de crescimento normal, porém com supressão endógena de GH. Advis et al., (1981) observaram um atraso na puberdade em ratas, com níveis séricos de GH reduzidos. Ojeda et al. (1980) observou que os mecanismos pelo quais a prolactina e possivelmente o GH participem do processo de maturação sexual são aumentando a resposta ovariana as gonadotrofinas.

2.4 Regulação da secreção do hormônio do crescimento

Hormônio do crescimento é secretado de maneira episódica ou em pulsos em bovinos e outras espécies (DAVIS et al., 1977, WHEATON et al., 1986). O padrão de secreção de GH pode variar dependendo da espécie, sexo e fotoperíodo (GAHETE et al., 2009).

Dois hormônios hipotalâmicos têm papel fundamental na regulação da secreção de GH, o GHRH e a somatostatina, que inibe a liberação de GH. Em 24 horas, 48,1% dos picos de GH foram associados com aumento de GHRH e uma queda na concentração de somatostatina, porém 9,3% dos picos de GH ocorreram sem nenhuma modificação na liberação de GHRH e somatostatina (CATALDI et al., 1994). Outros neuropeptídeos, neurotransmissores e neurohormônios alteram a secreção de GH indiretamente através de efeitos na liberação de somatostatina e GHRH do hipotálamo. Além disso, outros fatores agem como neurohormônios

hipofisiotróficos, controlando a liberação de GH diretamente dos somatotrófos (McMAHON et al., 2001).

2.5 Sistema gabaérgico

Alguns aminoácidos neurotransmissores estimulam a secreção de GH. Eles estão divididos em duas categorias: excitatórios, que despolarizam as células, e inibitórios, que hiperpolarizam as células no SNC. Aminoácidos excitatórios são ácido glutâmico, aspartato, ácido cistéico e ácido homocistéico, enquanto que os aminoácidos inibitórios são os ácidos gama - aminobutírico (GABA), glicina, taurina e beta-alanina (COOPER et al., 1996).

O sistema gabaérgico é um sistema inibitório do SNC. Ele é formado por neurônios que contém ácido gama - aminobutírico. Atua através de dois tipos de receptores GABA_A e GABA_B. Os receptores GABA_A estão unidos aos canais de cloro. Os receptores GABA_B estão unidos aos canais de cálcio e potássio e se unem a proteína G. Há uma outra subunidade de receptores, denominados GABA_C. Foi observada expressão destes receptores em somatotrófos de ratas (GAMMEL - DIDELON et al., 2003).

O GABA parece ter um papel estimulatório sobre a secreção de GH em ratas (MURAKAMI et al., 1987). Foi observado nesta espécie que a administração de GABA promoveu um aumento dose - dependente na secreção de GH e este efeito foi antagonizado com o uso de picrotoxina (ACS et al., 1987, MARTIN et al.,

1978), sendo que a resposta da hipófise ao GABA parece diminuir durante a 2^o e 3^o semana pós-natal nestes animais (ACS et al., 1987). O efeito estimulatório do GABA sobre a secreção de GH pode estar relacionado ao estágio de desenvolvimento de receptores GABA (Acs et al., 1984).

Em ovinos, o uso do antagonista gabaérgico, picrotoxina, na dose de 300-500 µg/kg, I.V., não afetou a liberação de GH em fetos com menos de 105 dias de gestação ou em cordeiros adultos. Já em fetos com 115 e 140 dias de gestação a picrotoxina estimulou a secreção de GH (GLUCKMAN et al., 1982).

2.6 Sistema dopaminérgico

Dopamina é uma catecolamina sintetizada a partir da tirosina em população de neurônios localizados no hipotálamo e tronco cerebral nos suínos, ovinos e bovinos (LESHIN et al., 1995). A ativação de receptores de dopamina (D1) aumentou a atividade da somatostatina nos neurônios no núcleo hipotálamico periventricular e diminuiu a secreção de GH induzida pelo GHRH, antes da alimentação (McMAHON et al., 1998).

Em uma cultura de células hipofisárias de ovinos, o uso de um agonista dopaminérgico inibiu a liberação de GH, porém aumentou o conteúdo de mRNA para este hormônio (SOYOOLA et al., 1994). Em eqüinos, o uso de 100 ou 500 mg de sulpiride, um antagonista dopaminérgico, não teve efeito sobre a secreção de GH (THOMPSON et al., 1992, KENNEDY et al., 2002).

West et al., (1997) observaram que com o uso de SKF 38393, um agonista de receptor D1, houve aumento na liberação de somatostatina e diminuição na liberação de GHRH. No entanto, nenhuma ativação ou bloqueio de receptores D2 afetou a liberação de somatostatina ou GHRH de fragmentos hipotalâmicos bovinos, sugerindo que os receptores dopaminérgicos D2 não estão envolvidos na regulação de somatostatina ou GHRH em bovinos.

2.7 Sistema noradrenérgico

A noraepinefrina é uma catecolamina sintetizada a partir da dopamina em neurônios localizados no tronco cerebral (LESHIN et al., 1995). O uso de marcador neuronal retrógrado FluoroGold[®] confirmou que as projeções noradrenérgicas para o núcleo arqueado provém da medula ventro - lateral e as projeções noradrenérgicas para o núcleo periventricular também surgem da medula ventro - lateral, além do núcleo do trato solitário, lócus coeruleus (LC) e núcleo parabraquial (PBN). Foi observado em ovinos que a redução do peso pode promover uma atividade alterada no PBN e LC, podendo afetar o controle da secreção de GH (IGBAL et al., 2005).

Há evidências que a norepinefrina modula a secreção de GH e prolactina (LAL et al., 1975). O sistema alfa-adrenérgico parece agir sobre a secreção de GH através do GHRH e somatostatina. West et al. (1997), observaram que com o uso de clonidina, um agonista alfa-2-adrenérgico, houve estímulo da secreção de

GHRH, sem afetar a liberação de somatostatina. No entanto, McMahon et al. (2001), observaram que a indução alfa-2-adrenérgica age sobre a secreção de GH não só estimulando a secreção de GHRH, mas também promovendo a inibição de neurônios de somatostatina no núcleo periventricular.

Em 1981, Gorewit observou pico de GH 10 minutos pós-infusão de clonidina (estimulador alfa-2-adrenérgico) em bovinos Borromeo et al., (1995), verificaram aumento na produção de GH na mesma espécie, 15 a 60 min após administração de clonidina. Em ratas, também foi observado um estímulo na secreção de GH, após administração de clonidina (WILLOUGHBY et al., 1993). No entanto, a ação de clonidina foi suprimida quando administrada posteriormente a alimentação em bovinos (GAYNOR et al., 1993).

Em ovinos, a clonidina inibiu a secreção de GH basal e a secreção estimulada pelo GHRH, porém o uso de agonista alfa-1-adrenérgico e de agonista- β – adrenérgico aumentou a secreção de GH, tanto basal, quanto à estimulada pelo GHRH (SOYOOLA et al., 1994).

3 HIPÓTESES

- A inibição de receptores gabaérgicos aumenta a concentração de GH durante a fase pré-púbere, em novilhas da raça Nelore.
- A concentração de GH é inibida pela dopamina, durante a fase pré-púbere, em novilhas da raça Nelore.
- A estimulação do sistema alfa-2-adrenérgico, durante a fase pré-púbere, em novilhas da raça Nelore, aumenta a concentração plasmática de GH.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Investigar a variação na concentração de GH em resposta a antagonistas e agonistas de neurotransmissores durante a maturação sexual em novilhas, gerando informações sobre os mecanismos neuroendócrinos entre a desmama e a primeira ovulação.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a concentração de GH em resposta à administração da Picrotoxina (antagonista gabaérgico) em diferentes idades (10, 14 e 17 meses) em novilhas pré-púberes da raça Nelore (Experimento 1).

- Mensurar a concentração de GH em resposta à administração do Sulpiride (antagonista dopaminérgico) em diferentes idades (8, 12 e 16 meses) em novilhas pré-púberes da raça Nelore (Experimento 2).
- Verificar a concentração de GH em resposta à administração da Clonidina (agonista alfa - adrenérgico) em diferentes idades (8, 12 e 15 meses) em novilhas pré-púberes da raça Nelore (Experimento 3).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Generalidades

5.1.1 Canulação da jugular

Cada novilha teve a jugular canulada no dia anterior a coleta de amostras de sangue, a fim de permitir coleta seriada, interferindo-se o menos possível no bem-estar dos animais.

Para tranqüilização das novilhas foi feita associação de acepromazina (0,02 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg) por via intramuscular (I.M., AGUIAR, 2004), os animais foram imobilizados, tendo seus membros locomotores amarrados e presos a cordas. Foi realizada tricotomia e assepsia no local da punção com álcool iodado. Para punção da jugular utilizou-se uma agulha 12 GA (12 x 3 mm, Popper & Sons[®]) esterilizada por imersão em álcool 70%. Após a punção, a cânula que consistia em tubo de silicone de 1,5 mm de diâmetro interno e 1,97 mm de diâmetro externo (Medicone[®]) com 45 centímetros de comprimento e previamente autoclavada foi introduzida na veia jugular do animal através da agulha de canulação, permanecendo 20 cm do seu comprimento exposto.

Neste ponto a cânula foi fixada com esparadrapo e suturada à pele do animal. A seguir a agulha de canulação foi retirada e uma agulha (40 x 12 mm, com bisel aparado) foi inserida na porção externa da cânula e colada com Araldite[®] (a fim de permitir o acoplamento de uma seringa à cânula) e fechada com um adaptador Luer Lok (B-D[®]), evitando-se a entrada de ar no período pós -

canulação, que é responsável pelo refluxo de sangue para dentro da cânula, podendo entupi-la em poucos minutos.

No dia da coleta, os animais canulados foram levados ao curral. Para fim de organização, cada animal foi identificado por um brinco, bem como as seringas utilizadas para coleta de suas amostras, administração de tratamentos e aplicação de solução anticoagulante. Os números das novilhas, também, foram escritos nos tubos contendo EDTA a 10%.

O material utilizado durante a coleta foi organizado sobre uma mesa montada no curral. Esse material incluiu: seringas de 10 mL, estantes com tubos para amostras, frasco de citrato de sódio 3,5%, tubos, agulhas e adaptadores para tubos *vacutainer* (16 x 100 mm, com heparina sódica; B – D) usados para coletar o sangue caso houvesse algum problema com a cânula; caixa de isopor refrigerada para acondicionar e transportar as amostras até o laboratório. Antes de dar início ao experimento verificava-se em todos os animais o funcionamento das cânulas. O cronômetro foi programado para soar o alarme no momento de cada coleta, cada qual obedecendo a seguinte rotina: abria-se a bolsa expondo a cânula; retirava-se a tampa da cânula; com uma seringa de 10 mL (seringa do anticoagulante), injetava-se 1 mL de solução de citrato de sódio 3,5% na cânula, visando a impedir a formação de coágulos no seu interior; colocava-se novamente a tampa na cânula; depositava-se a amostra em tubo de vidro contendo 200 µl de EDTA a 10% (em solução de NaCl 0,9%) identificando com o número do animal e o número da amostra; agitava-se cuidadosamente o tubo com a amostra para

homogeneização do anticoagulante e a seguir o tubo era acondicionado na geladeira; recarregava-se a seringa do anticoagulante com citrato de sódio 3,5%, que era mantida em gelo até o momento da próxima coleta.

A cada 15 minutos foram coletadas amostras de sangue de todos os animais. Os tubos contendo as amostras eram transportados em caixas de isopor refrigerado até o laboratório, onde eram centrifugados. A centrifugação do sangue foi realizada a 3000 x g por 15 minutos, a 4°C. Depois disso, os tubos, com as amostras, foram retirados dos adaptadores e deu-se início à retirada de plasma. Uma a uma, as amostras tiveram seu plasma transferido, com auxílio de pipetas Pasteur descartáveis, para seus respectivos microtubos graduados (Scientific Specialties Inc[®]) com 2 mL de capacidade, identificados com o número da amostra, número do animal, data e número do experimento. Após serem preenchidos com o plasma, os microtubos eram colocados em caixas de papelão identificados com o número do animal e data do experimento, e acondicionados a - 20°C. As amostras permaneceram armazenadas nestas condições até a realização do radioimunoensaio para GH.

5.2 Sistema alométrico para transposição de doses

5.2.1 Uso, características e definições

O sistema alométrico foi utilizado para calcular a dose de picrotoxina para bovinos, transpondo a partir da dose de 1,0 mg/kg para ratos (YANG et al., 1999).

O princípio alométrico usa uma escala de parâmetros fisiológicos comparando animais de vários tamanhos, sendo esta mesma escala usada para parâmetros farmacocinéticos. A absorção, distribuição e eliminação de muitas drogas administradas aos animais envolvem processos fisiológicos compatíveis com a escala alométrica. Em resumo, o efeito da droga usado em um determinado animal pode ser extrapolado para o uso em outros animais através de cálculos aritméticos.

Algumas definições:

- Peso metabólico: peso total do animal expresso em quilogramas.
- Taxa metabólica basal (MEC): peso metabólico elevado a 0,75 e multiplicado por uma constante. Observamos que esta constante é específica (Tabela 1). A elevação a 0,75 é constante entre os diversos grupos, pois é esta a distância entre eles, dentro de uma função matemática, já que é um gráfico de massa dos animais x taxa metabólica fornece uma linha reta e a comparação dessas linhas, ter grupos de animais diferentes, mostra uma série paralela que tem uma obliquidade de aproximadamente 0,75 e diferindo apenas em suas intercessões. A taxa metabólica basal pode ser expressa em quilocalorias e indica a energia mínima necessária para manter um organismo vivo com um determinado peso, já que esta é a energia produzida por ele, em uma situação de repouso, em um ambiente termoneutro.

- Custo energético específico mínimo (SMEC): é o peso metabólico elevado a $-0,25$ e multiplicado pela mesma constante do MEC. É expresso em quilocalorias/kg/ dia. Indica a energia mínima produzida por um animal, num dia, para cada quilograma de seu peso.

5.2.2 Utilidades

A alometria permite calcular, por extrapolação, as necessidades energéticas e a variação da atuação das drogas no organismo. Além de calcular as doses podemos calcular a freqüência de administração.

Através do cálculo das necessidades energéticas, podemos calcular a alimentação parenteral necessária para manutenção de um animal. Como forma de simplificar podemos usar o MEC para o cálculo das necessidades energéticas e o SMEC para calcular as doses e a freqüência de medicação.

Tabela 1. Constante para cálculo da taxa metabólica basal (MEC)

GRUPO	CONSTANTE (K)	TEMPERATURA
Passeriformes	129	42
Não passeriformes	78	40
Mamíferos placentários	70	37
Marsupiais	49	35
Répteis	10	37

5.2.3 Fórmulas

$$\text{Peso metabólico (PM)} = \text{Peso}^{0,75} \text{ (kg)}$$

$$\text{Taxa metabólica Basal (MEC)} = K (\text{Peso}^{0,75}) = K \times \text{PM}$$

Custo Energético Específico Mínimo (SMEC) = $k(\text{Peso}^{0,75}/\text{Peso})$

Ou $\text{SMEC} = K (\text{Peso}^{-0,25})$

O uso da alometria, em anestesia, é facilitado pela rapidez na observação da resposta do organismo ao uso da droga. Portanto, os cálculos da extrapolação efetuados podem ser testados com observação direta dos resultados.

$\text{SMEC dose controle} = \text{mg/kg medicamento} / \text{SMEC}$

$\text{FREQUÊNCIA CONTROLE} = \text{Período em horas} / \text{Horas de Intervalo}$

$\text{SMEC dose alvo} = \text{SMEC alvo} \times \text{SMEC dose controle}$

$\text{SMEC freqüência alvo} = \text{SMEC alvo} \times \text{SMEC freqüência controle}$

$\text{FREQUÊNCIA alvo} = 24 / \text{SMEC freqüência alvo}$

Detalhes importantes

- Verificar via de administração
- Trabalhar com animais modelos – com peso e níveis séricos ou efeitos da droga conhecidos
- Classificação taxonômica do animal modelo e do animal alvo deve ser a mais próxima.
- Tomar cuidado especial com drogas cujo mecanismo de ação independe da escala.

5.3 RADIOIMUNOENSAIO PARA GH

A quantificação hormonal foi feita por radioimunoensaio com ensaios *in house*, realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do curso de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba. O material e os protocolos utilizados foram elaborados pelo Dr. A.F. Parlow (National Hormone & Peptide Program. National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases. Harbor – University of California Los Angeles, CA, Torrance, USA). As amostras foram quantificadas em duplicata. Foram realizados 33 ensaios, com um total de 2.805 amostras dosadas. O coeficiente de variação interensaio, intraensaio e sensibilidade dos ensaios de GH foram respectivamente de 17%, 15% e 0,25 ng/mL. A porcentagem de ligação variou de 25 a 30%.

O processo de iodação se faz por substituição do átomo de hidrogênio do anel fenólico da tirosina por um átomo de iodo oxidado, através da ativação da posição *ortho* do anel aromático da tirosina em função do ataque eletrofílico do grupo hidroxila vizinho. O íon iodo (I^+) atua como agente eletrofílico, adquirindo assim propriedade de marcador radioativo (SALACINSKI et al., 1981).

Um estudo comparando os métodos de iodação pela cloramina T e tetracloro (Iodogen[®]) indica que o método tetracloro apresenta uma maior incorporação ao iodo com menores perdas que o método cloramina T, podendo

ser utilizado para uma grande variedade de proteínas e produzindo um marcador estável por até três meses (SALACINSKI et al., 1981).

No presente estudo, utilizamos a iodação pelo tetracloro. Primeiramente, este foi pesado e dissolvido em clorofórmio na concentração de 100 µg/ml. Então, 50 µl dessa solução foram transferidos para frascos de 6 x 50mm que secaram durante 16 horas em capela. Após a evaporação do clorofórmio os frascos foram envolvidos em papel alumínio e armazenados em geladeira em dessecador protegidos da luz.

Utilizamos colunas de Sephadex (G-25H) lavadas na seguinte sequência: 1 ml de solução tampão (PB 0,05) (três vezes), 1 ml de albumina séria bovina (BSA) a 1% (uma vez), PB 0,05 (duas vezes) e por último PB 0,01 (duas vezes). Os tubos (12 x 75mm) para coletar o hormônio iodinado foram numerados de 1 a 16 e continham 500 µl de PBS BSA.

Todo o material usado para a iodação foi colocado em capela de exaustão e anteparo de acrílico. A quantidade necessária (4 -10 µl) de I¹²⁵ (Amersham, IMS300), foi transferida com uma seringa Hamilton[®] apropriada, para o fundo do frasco de reação. A reação foi iniciada quando a alíquota do hormônio foi transferida (com uma seringa de precisão Hamilton[®]) para o frasco de reação. O tempo de reação foi de 90 segundos.

Após o tempo de reação o conteúdo do frasco foi transferido para o topo da coluna de Sephadex P-10 G25 (previamente lavada como citado anteriormente)

usando uma cânula de polipropileno conectada a uma agulha e seringa. Eram colhidas 16 gotas (1ml) no primeiro tubo e 8 gotas (0,5 ml) nos tubos subseqüentes. Depois que a última fração sai da coluna, ela é fechada e descartada. Todo o material usado na capela era colocado em recipiente protegido com chumbo e mantido em *container* protegido no laboratório por 1.200 dias (20 x a meia vida), após esse período o material é inspecionado e quando contiver < 2 mCi/kg poderá ser descartado.

Os frascos contendo o material que sai da coluna, foram homogeneizados em agitador por 5 min. e 5 µl de cada tubo contados em contador gama (Packard®). Os frascos com maior radioatividade (picos orgânicos) foram identificados e utilizados para os ensaios, os demais tubos foram descartados.

As amostras foram incubadas por 48 h, a temperatura de 4°C com anticorpo anti-bGH (AFP55) produzido em macaco, cuja concentração final foi de 1:40.000. Após 48 h de incubação, 100 µl de ¹²⁵I-bGH (aproximadamente 30.000 cpm) foi adicionado em cada tubo, e estes permaneceram em incubação a 4°C por 24 h. Após este período, 100 µl de 2º anticorpo e 500 µl de polietilenoglicol (PEG) foram adicionados aos tubos. Após incubação de quatro horas, estes tubos eram submetidos a centrifugação (centrífuga Hermle Z 513 K) a 30.000 rpm, por 30 min., o sobrenadante era removido e então procedia-se a leitura dos ensaios em contador gama (Packard®).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para identificação dos picos, área de secreção de GH e frequência e amplitude dos picos de secreção de GH foi utilizado o programa GrafPad Prism versão 3.00 for Windows. A concentração média de GH do pós-tratamento (ng/mL) foi a média dos valores do período pós-infusão. Os picos foram identificados como aumento maior que 2 vezes o coeficiente de variação intra-ensaio envolvendo pelo menos três pontos consecutivos das dosagens. O programa calculou a área sob a curva e a área sob os picos utilizando a regra trapezoidal, cuja unidade resultante é o produto da multiplicação da concentração com o tempo, em minuto ((ng/mL)min). O tempo necessário para o aparecimento do maior pico foi determinado em função do momento (minutos) em que surgiu o maior pico.

Os resultados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas empregando-se o proc GLM do programa SAS (System for Windows - SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, 1999-2000). As médias foram comparadas pelo teste Duncan, no nível de significância 5%. Antes de cada análise os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Quando não obedeciam as premissas, os dados eram transformados em Log (X + 1); logaritmo na base 10 – Log₁₀X; Raiz quadrada – RQ ou elevados ao Quadrado – (X²), procurando atender à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias.

7 EXPERIMENTO 1:

ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DA VIA GABAÉRGICA, NO CONTROLE DA SECREÇÃO DE GH, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Animais e Manejo

Foram utilizadas 10 novilhas da raça Nelore, oriundas de um rebanho comercial, não selecionados para precocidade. Após o desmame, aos seis meses de idade, estes animais foram levados para o Campus do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, localizado na cidade de Araçatuba, SP. As novilhas foram mantidas em piquetes de capim Tanzânia recebendo suplementação com bagaço de cana hidrolisado, ração concentrada (milho, soja e núcleo) e tendo livre acesso a sal mineral e água. No dia da coleta, todas as fêmeas canuladas foram conduzidas a um curral de manejo, contidas por um cabresto, sendo fornecido alimento volumoso e água *ad libitum*.

A variação no peso foi acompanhada quinzenalmente, utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

7.1.2 Administração de picrotoxina e coleta de amostras de sangue

Para inibição da ação gabaérgica, utilizou-se a picrotoxina (inibidor de receptor GABA_A, Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US, P1675), um fármaco que bloqueia liberação de cálcio e ativa os canais de potássio na membrana sináptica, impedindo a despolarização nas terminações nervosas gabaérgicas e diminuindo a ação do ácido gama aminobutírico. A dosagem utilizada para a picrotoxina foi de 0,18 mg/kg, I.V., transposta alometricamente da dose de 1,0 mg/kg para ratos (YANG et al., 1999). O sangue foi coletado por 1 hora antes da aplicação do fármaco e por 10 horas, após infusão intravenosa da picrotoxina, com intervalos de 15 minutos. As amostras de sangue (10 mL) eram acondicionadas em tubos de ensaio contendo 200 µl de EDTA. Os tubos de ensaio contendo as amostras de sangue eram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos. O plasma obtido pós-centrifugação era colocado em microtubo de 1,5 mL e acondicionado em freezer a -20 ° C, para posterior quantificação hormonal.

7.1.3 Delineamento Experimental

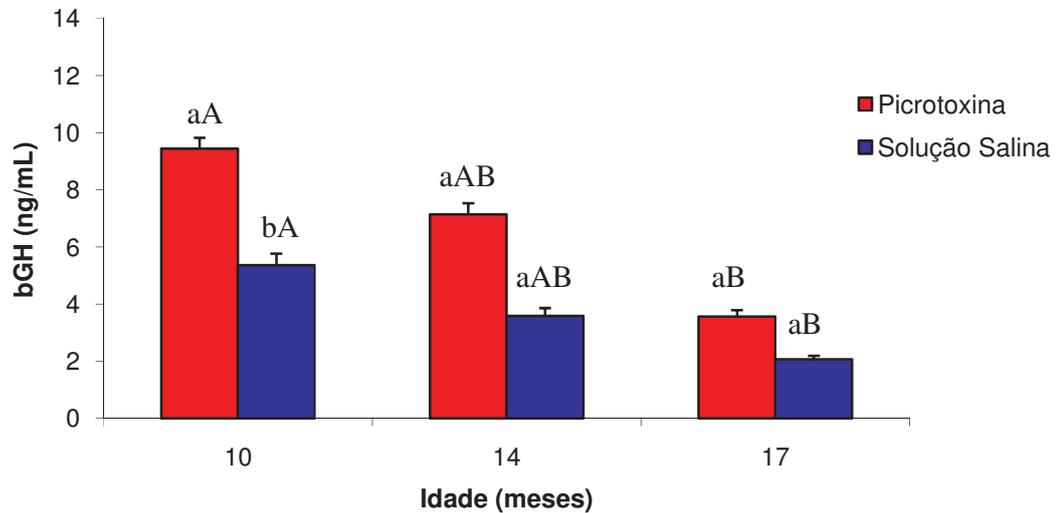
As 10 novilhas foram divididas de forma aleatória em 2 grupos: Grupo Picrotoxina: novilhas que receberam a picrotoxina; Grupo Controle: novilhas que receberam solução salina 0,9% (Apêndice A). Não foi possível coletar sangue de alguns animais durante o experimento, por problemas como obstrução da cânula

deixando alguns grupos com um número menor de animais. O grupo Picrotoxina com cinco, cinco e quatro novilhas e o grupo Controle com quatro novilhas em cada período, respectivamente aos 10, 14 e 17 meses de idade.

7.2 RESULTADOS

A concentração média de GH aos 10 meses de idade foi maior no grupo Picrotoxina comparado ao grupo controle ($9,44 \pm 2,4$ ng/mL vs $5,36 \pm 2,5$ ng/mL; $P < 0,05$). Esta diferença na concentração média não foi observada aos 14 ($7,14 \pm 0,40$ vs $3,60 \pm 0,17$ ng/mL; $P > 0,05$) e aos 17 meses de idade ($2,76 \pm 0,22$ vs $3,10 \pm 0,19$ ng/mL; $P > 0,05$; Fig.1). No entanto, aos 17 meses, foi observada no grupo Picrotoxina uma maior concentração de GH, que no Controle em diversos momentos: aos 195 min ($5,3 \pm 0,25$ ng/mL vs $1,09 \pm 0,5$ ng/mL; $P = 0,0208$), 210 min ($7,72 \pm 1,19$ ng/mL vs $1,11 \pm 0,33$ ng/mL; $P = 0,0004$), 225 min ($6,31 \pm 0,72$ ng/mL vs $1,11 \pm 0,27$ ng/mL; $P = 0,0002$) e aos 270 min ($6,18 \pm 0,77$ ng/mL vs $1,95 \pm 0,44$ ng/mL).

No grupo Picrotoxina, a concentração média de GH foi maior aos 10 meses quando comparada aos 17 meses de idade, ($9,44 \pm 1,10$ ng/mL vs $2,76 \pm 0,22$ ng/mL; $P < 0,05$). O mesmo ocorreu ao longo do tempo no grupo Controle entre o 10^o e o 17^o mês de idade ($6,56 \pm 1,22$ ng/mL vs $3,10 \pm 0,19$ ng/mL; $P < 0,05$; Fig.1).

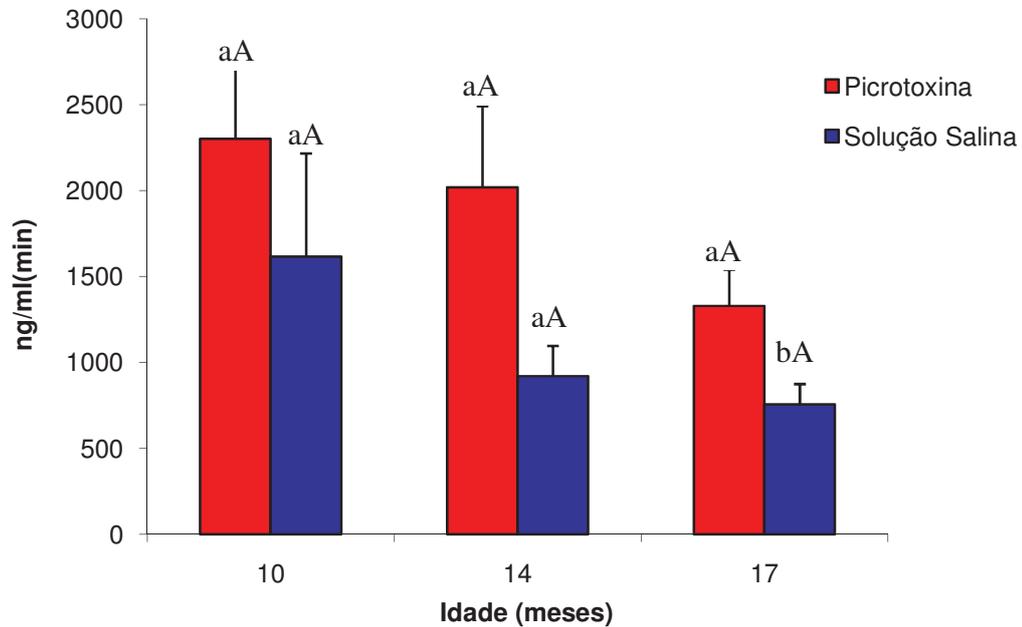


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 1 - Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picrotoxina (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses ($n = 5$), 14 meses ($n = 5$) e 17 meses ($n = 4$) ou solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses, com $n = 4$.

Em relação à área total de secreção de GH, foi observada uma maior área no grupo Picrotoxina em relação ao grupo Controle nos animais aos 17 meses de idade (1330 ± 211 (ng/ml)min vs $755 \pm 119,6$ (ng/ml)min; $P < 0,05$; Fig.2)

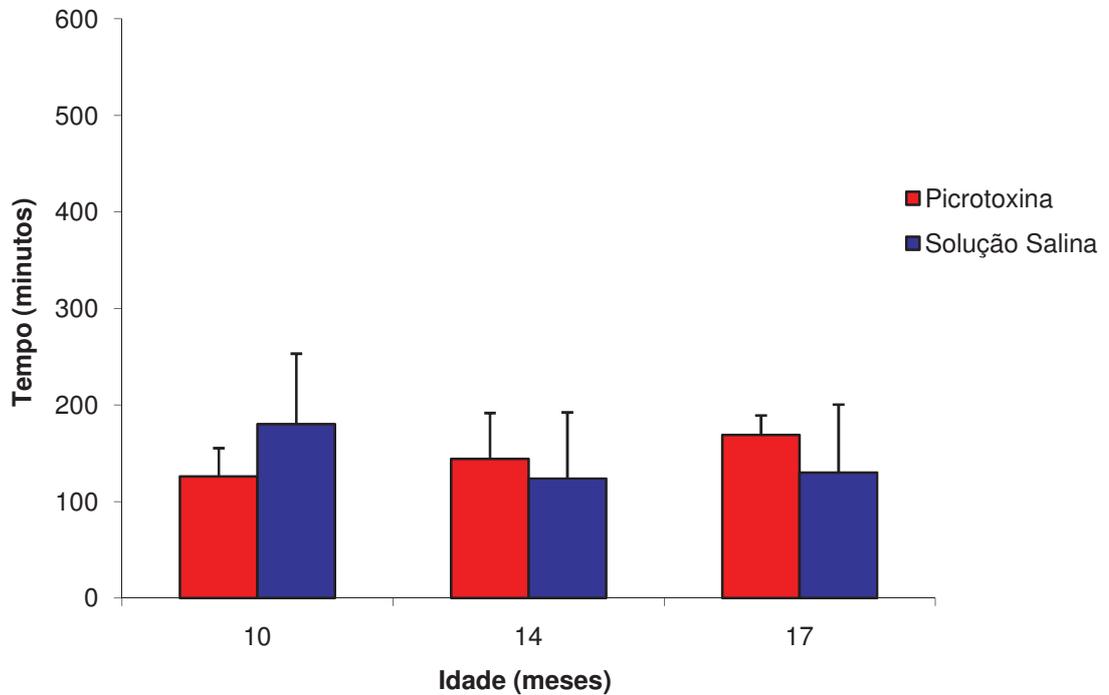


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 2 - Área total de secreção de GH (ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picrotoxina (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses ($n = 5$), 14 meses ($n = 5$) e 17 meses ($n = 4$) ou solução salina a 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com $n = 4$.

Em relação a tempo para aparecimento do primeiro pico de secreção de GH (Fig.3), não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre grupo Picrotoxina e Controle em todos os períodos avaliados.



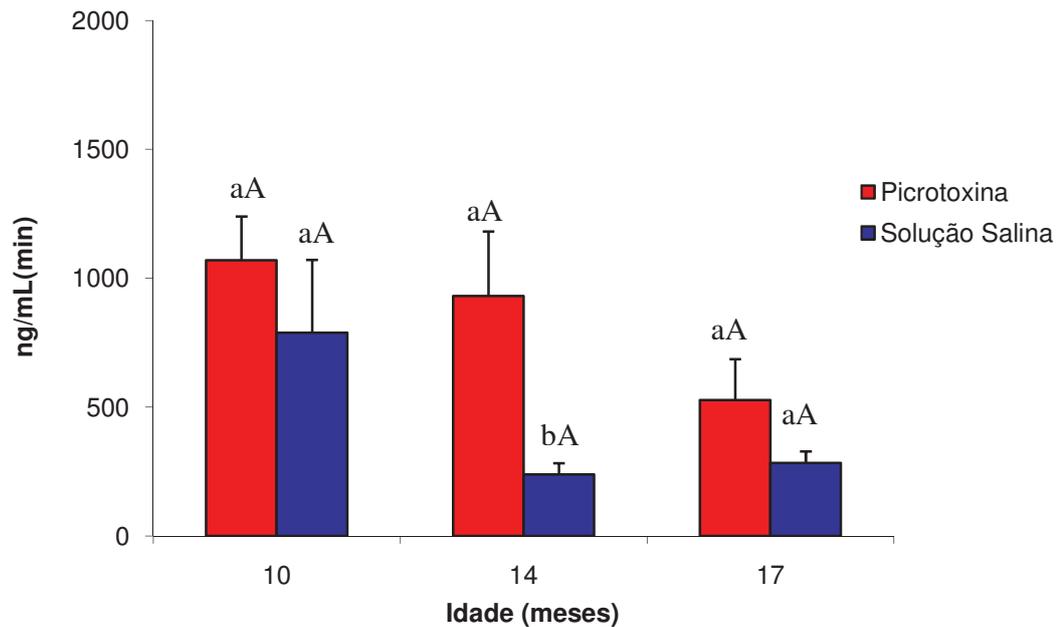
Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 3 - Tempo necessário para o aparecimento do primeiro pico de secreção de GH (min, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picROTOXINA (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses ($n = 5$), 14 meses ($n = 5$) e 17 meses ($n = 4$) ou solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com $n = 4$.

Foi observada uma maior área total de picos aos 14 meses no grupo PicROTOXINA, quando comparado ao grupo Controle ($930,18 \pm 251,54$ vs $238,83 \pm 43,54$ (ng/mL)min; $P = 0,0108$). A mesma diferença não foi observada entre os grupos PicROTOXINA e Controle aos 10 ($1069,22 \pm 170,84$ vs $788,48 \pm 283,13$

(ng/mL)min; $P > 0,05$) e aos 17 meses de idade ($526,58 \pm 159,14$ vs $283,07 \pm 44,74$ (ng/mL)min; Fig. 4).

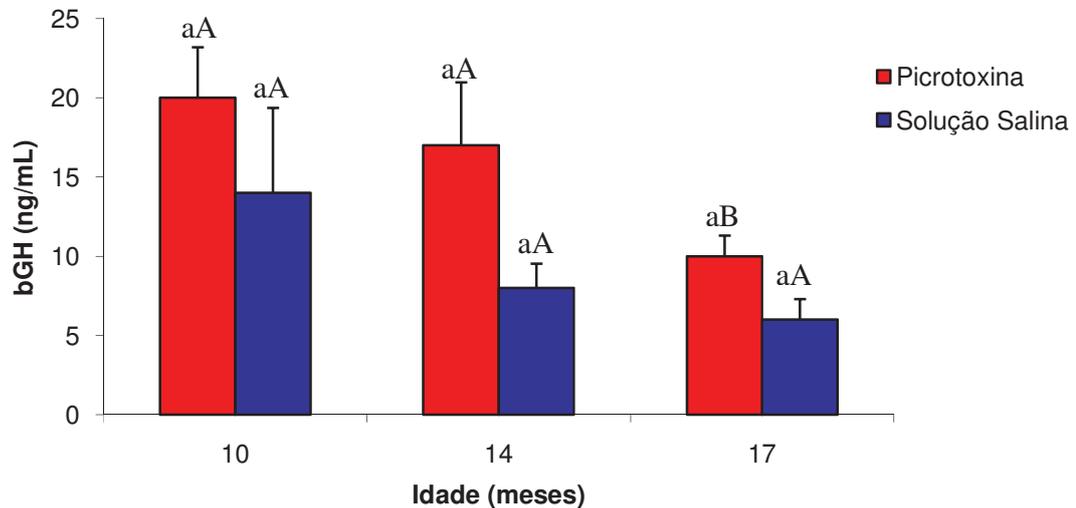


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 4 – Área total dos picos de secreção de GH (ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picrotoxina, (0,18 mg/kg, I.V.) em 10 meses ($n = 5$), 14 meses ($n = 5$) e 17 meses ($n = 4$) ou solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com $n = 4$.

Os animais do grupo Picrotoxina apresentaram maior amplitude do maior pico aos 10 e 14 meses de idade do que aos 17 meses de idade ($20 \pm 3,21$ vs $17 \pm 3,99$ vs $10 \pm 1,31$ ng/mL; $P > 0,05$). Não houve diferença na maior amplitude de concentração entre os meses no grupo Controle ($14 \pm 5,38$ vs $8 \pm 1,54$ vs $6 \pm 1,43$ ng/mL; $P > 0,05$; Fig.5).

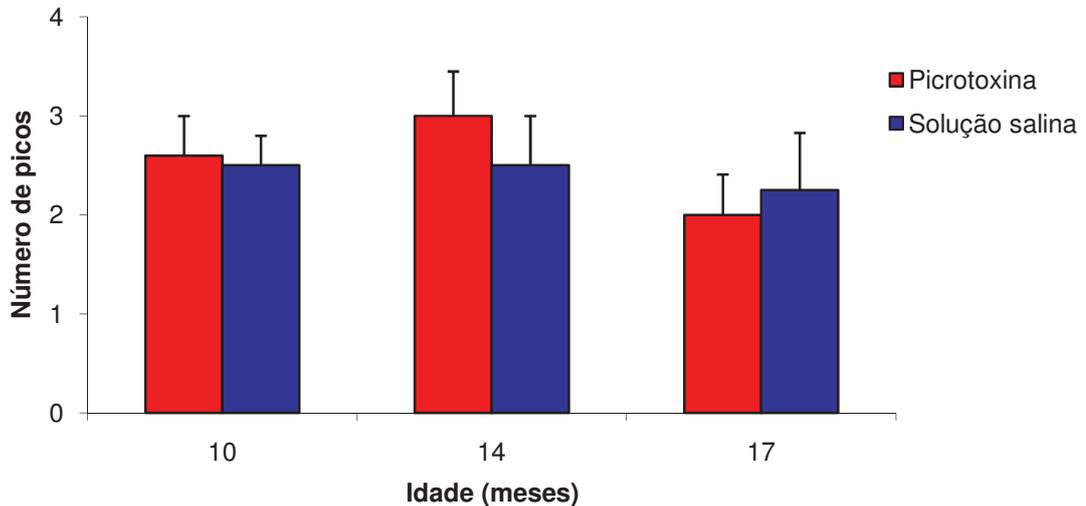


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 5 – Amplitude máxima dos picos de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam picROTOXINA (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses ($n = 5$), 14 meses ($n = 5$) e 17 meses ($n = 4$) ou solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com $n = 4$.

Aos 10 e 14 meses de idade, não foi observada diferença no número de picos, quando comparados os grupos PicROTOXINA e Controle ($2,6 \pm 0,4$ vs $2,5 \pm 0,3$; $3 \pm 0,45$ vs $2,5 \pm 0,5$; $P > 0,05$). O mesmo aconteceu aos 17 meses ($2 \pm 0,41$ vs $2,25 \pm 0,58$) e quando os intervalos foram avaliados em um mesmo grupo entre 10, 14 e 17 meses de idade (Fig.6).



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 6 – Número de picos de secreção de GH (valores não transformados; Média \pm EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes que receberam picrotoxina (0,18 mg/kg, I.V.) aos 10 meses ($n = 5$), 14 meses ($n = 5$) e 17 meses ($n = 4$) ou solução salina 0,9% aos 10, 14 e 17 meses com $n = 4$.

7.3 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o GABA atue inibindo a secreção de GH, já que o uso da picrotoxina (antagonista gabaérgico) ocorreu um aumento na concentração de GH aos 10 meses de idade e apenas em intervalos específicos aos 17 meses, aparentemente a ação inibitória do GABA foi maior nas novilhas mais novas se comparado com mais velhas (Fig.1).

A ação do GABA sobre a secreção de GH, pode ser estimulatória ou inibitória, sendo influenciada pela idade do animal e espécie envolvida (ACS et al., 1987; GLUCKMAN et al., 1982; MARTIN et al., 1978; SANGIAH et al., 1974).

Ocorrem variações na secreção de GH em resposta ao GABA entre o período fetal, pós-natal e adulto. O aumento da secreção de GH em resposta ao GABA diminuiu entre a 2ª e 3ª semana pós-natal no rato (ACS et al., 1987). Em fetos ovinos com menos de 105 dias de gestação, a administração de picrotoxina, I.V. não afetou a liberação de GH, já aos 115 e 140 dias de gestação a picrotoxina estimulou a secreção de GH (GLUCKMAN et al., 1982), sugerindo que nesta espécie, neste período, o GABA tenha ação inibitória sobre a secreção de GH. Esses resultados coincidem com os encontrados nas novilhas Nelore.

No presente estudo, não foi possível confirmar se as diferenças observadas na concentração de GH aos 17 meses tenham sido provocadas pela picrotoxina, já que ocorreram em intervalos muito distantes do tempo de aplicação do antagonista gabaérgico. Foi observado que dois constituintes do complexo molecular da picrotoxina têm meia-vida de aproximadamente 20 min (SOTO-OTERO et al., 1989).

Tanto no grupo Picrotoxina e no grupo Controle a média de secreção de GH diminuiu dos 10 meses para os 17 meses, sugerindo que independente do uso da picrotoxina exista uma variação temporal na concentração do GH que interfere na curva de crescimento dos animais (Fig.1)

Uma possível estimulação de outros receptores para o GABA além do GABA_A, cuja ativação é inibida pela picrotoxina (ACS et al., 1984) e a dose utilizada também devem ser consideradas. Spencer et al. (1994) observaram em ovinos que 10 mg de GABA via intracérebro-ventricular aumentaram, enquanto que 100 mg reduziram a concentração plasmática de GH.

A importância do GH na puberdade não foi bem estabelecida em ruminantes. A média de concentração de GH diminuiu com a idade, mas a frequência de pulsos aumentou da 1^a para a 12^a semana de idade e posteriormente permaneceu constante em bezerros (McANDREWS et al., 1993). A concentração de GH também diminuiu antes da puberdade em ovelhas, mas tal redução não foi um requisito para a puberdade (SUTTIE et al., 1991). Em novilhas holandesas, foi observada alta concentração de GH ao nascimento, que diminuiu rapidamente e permaneceu constante próximo a puberdade (DIAZ-TORGA et al., 2000). No entanto, em búfalas foi observada crescente concentração de GH durante o período puberal (HALDAR e PRAKASH, 2005) e a administração exógena de GHRH acelerou a puberdade (HALDAR e PRAKASH, 2006) enquanto que a imunização para GHRH reduziu as concentrações séricas de GH e atrasou o início da puberdade (SIMPSON et al., 1991).

Neste estudo, foi observada uma maior concentração de GH em períodos distantes (10 a 14 meses) do início da puberdade. O GH pode ter maior importância no período pré-púbere, quando a secreção de gonadotrofinas ainda não está estabelecida, quando ainda está atuante a excessiva retroalimentação

negativa do estradiol sobre a secreção de gonadotrofinas, uma vez que o estradiol também interfere na secreção de GH.

Há evidências que o GH tenha importância no período de crescimento folicular independente de gonadotrofinas, este promoveu um efeito estimulatório no diâmetro folicular e na secreção de estradiol (LIU et al., 1998). No desenvolvimento reprodutivo pré-pubertal de ratas, o GH parece aumentar a resposta dos esteróides ovarianos às gonadotrofinas (ADVIS et al., 1981). Nesta espécie, presumi-se que a falta do controle do GH na regulação da esteroidogênese ovariana cause um atraso na puberdade (JIA et al., 1986).

Em novilhas o tratamento com BST aumentou o recrutamento de pequenos folículos, no entanto não foi observado um aumento nos sítios de ligação do FSH e LH no ovário, sugerindo que os efeitos do BST na foliculogênese ovariana não envolveram mudanças nas concentrações de gonadotrofinas ou nos receptores de gonadotrofinas, mas sim por um aumento nas concentrações de IGF-1, de insulina, ou ambos (GONG et al., 1991; GONG et al., 1993). Em bovinos com deficiência de receptores de GH foi observado um menor número de folículos antrais e uma redução no número de folículos recrutados (CHASE et al., 1998). O estradiol parece modular a secreção de GH através de neurônios de GHRH e somatostatina (SCANLAN et al., 2003). Também foi observado que administração de estradiol em ovelhas ovariectomizadas está associada com um aumento na amplitude de pulsos de GH (DUTOUR et al., 1997). Em bezerros, o uso de um implante de estradiol aumentou as concentrações de GH (GRIGSBY et al., 1986).

Aos 17 meses, foi observada uma maior área total de concentração de GH no grupo Picrotoxina em relação ao grupo Controle, isto provavelmente devido a maior concentração de GH mesmo que em intervalos restritos após administração de picrotoxina. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística na área total de secreção de GH aos 10 e 14 meses, a área total de secreção nesses períodos foi visivelmente maior no grupo Picrotoxina, que no grupo Controle (Fig. 2).

A administração da picrotoxina, não antecipou a ocorrência do primeiro pico de secreção de GH (Fig.3) tão pouco aumentou a frequência de pulsos de GH (Fig.6), sugerindo pela metodologia utilizada uma indetectável ação gabaérgica sobre a pulsatilidade de secreção de GH, em novilhas da raça Nelore dos 10 aos 17 meses.

Em bezerros Angus com média de 285 dias de idade, foi observada uma média de 6,6 picos de secreção de GH em um período de 10 h (WHEATON et al., 1986). Nas novilhas Nelore foi observada uma média de 2,5 pulsos de GH no mesmo período. A diferença na frequência de picos entre os estudos pode ser consequência da raça ou da metodologia empregada para identificar os pulsos. Além disso, também devemos levar em consideração a diferença de idade entre os animais entre os estudos.

A liberação pulsátil de GH foi severamente reduzida em novilhas imunizadas para GHRH; a secreção episódica mostrou-se ausente em 6 das 14 novilhas avaliadas no estudo e nas novilhas que foram detectados pulsos de GH,

a amplitude dos picos de secreção de GH tendeu a ser mais baixa nas novilhas imunizadas para GHRH (SIMPSON et al., 1991).

Embora a somatostatina e o GHRH sejam os principais moduladores da secreção de GH, outros neuropeptídeos, neurotransmissores e neurohormônios alteram a secreção de GH indiretamente agindo sobre a somatostatina e/ou GHRH (McMAHON et al., 2001). Spencer et al., 1994 observaram que a administração de somatostatina não alterou o estímulo na secreção de GH com o uso de 10 mg de GABA, sugerindo que o GABA possa agir sobre a secreção de GH através do GHRH.

Mesmo não tendo sido observado um maior número de picos de GH aos 14 meses no grupo Picrotoxina (Fig.6), foi observado uma maior área total de picos (Fig.4), reforçando a idéia da participação do sistema gabaérgico inibindo a secreção de GH. Estudos *in vitro* sugerem que a quantidade de GHRH liberada determina a amplitude da secreção episódica de GH, enquanto que o padrão de secreção de somatostatina determina sua freqüência e duração (KRACIER et al., 1988). Considerando o presente estudo foi possível observar que houve maior área total de secreção no grupo picrotoxina aos 17 meses se comparado ao controle sugerindo que neste período o bloqueio gabaérgico permitiu um aumento do GHRH aumentando a quantidade de GH secretado. Embora não tenha havido diferença na freqüência de pulsos, os pulsos no grupo picrotoxina aos 10 e 14 meses tinham maior amplitude que aos 17 meses de idade sugerindo que o uso

de um antagonista gabaérgico permitiu um aumento na amplitude dos pulsos, provavelmente conseqüência do aumento do GHRH.

7.4 CONCLUSÕES

Aceitamos a hipótese de que o GABA altera a secreção de GH em novilhas Nelore pré - púberes. Sua ação é predominantemente inibitória, sendo mais evidente aos 10 e 14 meses de idade e menos acentuada aos 17 meses de idade. O aumento na concentração de GH foi mais evidente aos 10 meses de idade.

A concentração de GH tende a ser mais elevada no período pré-púbere em novilhas mais jovens se comparada as mais velhas, independente do tratamento com picrotoxina ou não.

8 EXPERIMENTO 2:

ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO, NO CONTROLE DA SECREÇÃO DE GH, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

8.1 MATERIAL E MÉTODOS

8.1.2 Animais e Manejo

Foram utilizadas 10 novilhas da raça Nelore, oriundas de um rebanho comercial. Após o desmame das novilhas, aos seis meses de idade, estas foram levadas para o Campus do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, localizado na cidade de Araçatuba, SP. As novilhas foram mantidas em piquetes de capim Tanzânia recebendo suplementação com bagaço de cana hidrolisado, ração concentrada (milho, soja e núcleo) e tendo livre acesso a sal mineral e água. A variação no peso foi acompanhada quinzenalmente, utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

8.1.3 Delineamento Experimental

As novilhas foram divididas em dois grupos com cinco animais cada: Grupo controle: novilhas que receberam solução salina a 0,9%, grupo Sulpiride: novilhas que receberam sulpiride (Apêndice A). Não foi possível coletar sangue de algumas novilhas durante o experimento deixando alguns grupos com um número menor

de animais. O grupo Sulpiride com cinco, cinco e quatro novilhas e o grupo Controle com quatro, cinco e quatro animais, respectivamente aos 8, 12 e 16 meses de idade.

8.1.4 Administração do sulpiride e coleta das amostras de sangue

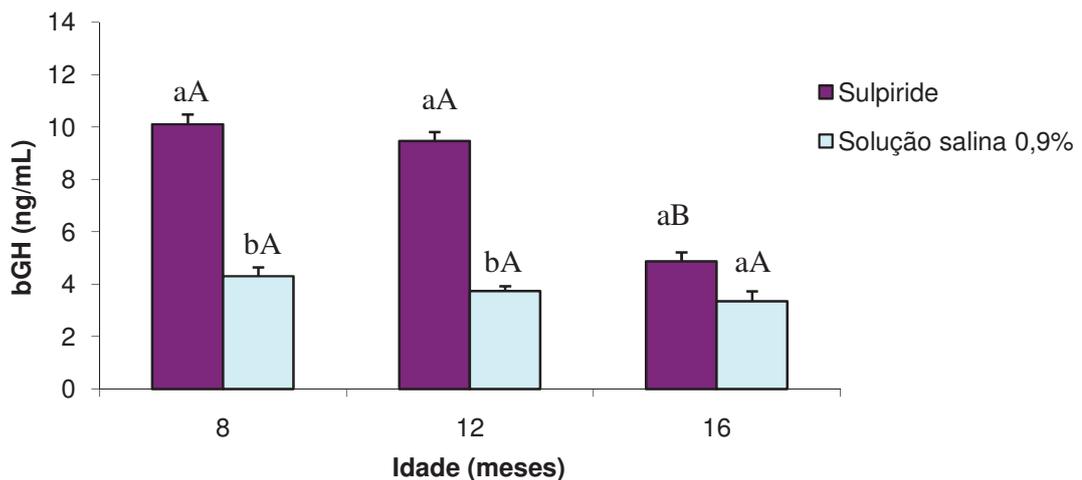
O sulpiride, antagonista de receptor (D_2) dopaminérgico (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US, S8010), foi administrado aos 8, 12 e 16 meses de idade, na dosagem de 0,59 mg/kg, por via subcutânea, com intervalo entre coletas de 15 minutos por 10 horas após o tratamento (HONARAMOOZ et al., 2000). As amostras de sangue (10 mL) eram acondicionadas em tubos de ensaio contendo 200 μ l de EDTA. Os tubos de ensaio contendo as amostras de sangue foram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos. O plasma obtido pós-centrifugação foi colocado em microtubo de 1,5 mL e acondicionado em freezer a -20°C , para posterior quantificação hormonal.

8.2 RESULTADOS

A concentração média de GH aos 8 ($10,10 \pm 0,38$ ng/mL vs $4,3 \pm 0,34$ ng/mL; $P < 0,05$) e 12 meses de idade ($9,46 \pm 0,35$ ng/mL vs $3,74 \pm 0,19$ ng/mL; $P < 0,05$) foi maior no grupo Sulpiride quando comparado ao grupo Controle. Aos 16

meses de idade não foi observada diferença na concentração média de GH entre os grupos ($4,87 \pm 0,35$ vs $3,35 \pm 0,27$ ng/mL; $P > 0,05$; Fig. 7).

Nas novilhas do grupo Sulpiride a concentração média de GH foi maior aos 8 e 12 meses quando comparado aos 16 meses de idade ($10,10 \pm 0,38$ ng/mL vs $9,46 \pm 0,35$ ng/mL vs $4,87 \pm 0,35$ ng/mL). O mesmo não foi observado no grupo Controle nos mesmos períodos ($4,3 \pm 0,34$ vs $3,74 \pm 0,19$ vs $3,35 \pm 0,38$ ng/mL; Fig.7).

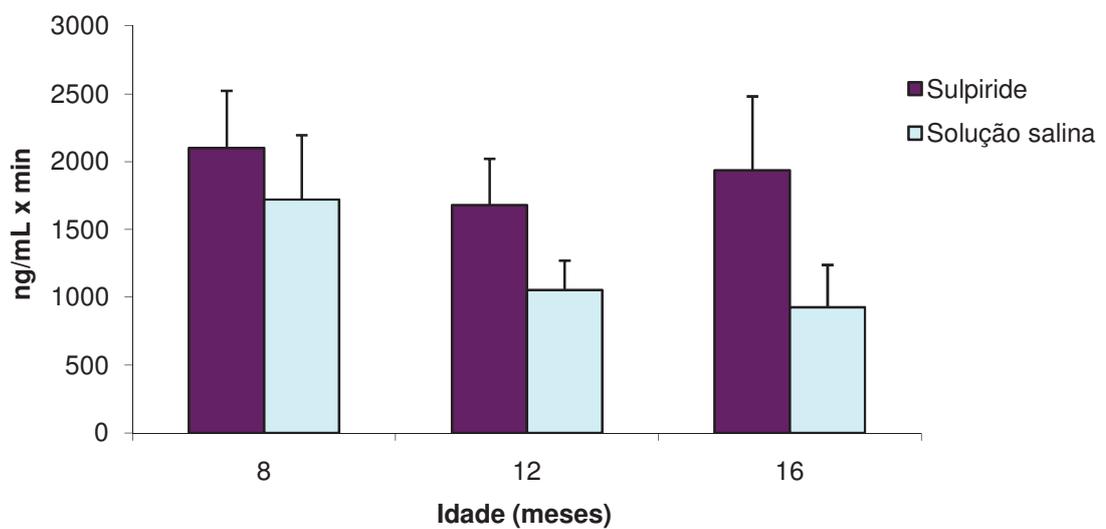


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses em um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 7 – Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) pós tratamento em novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses ($n = 5$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$) ou solução salina a 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$).

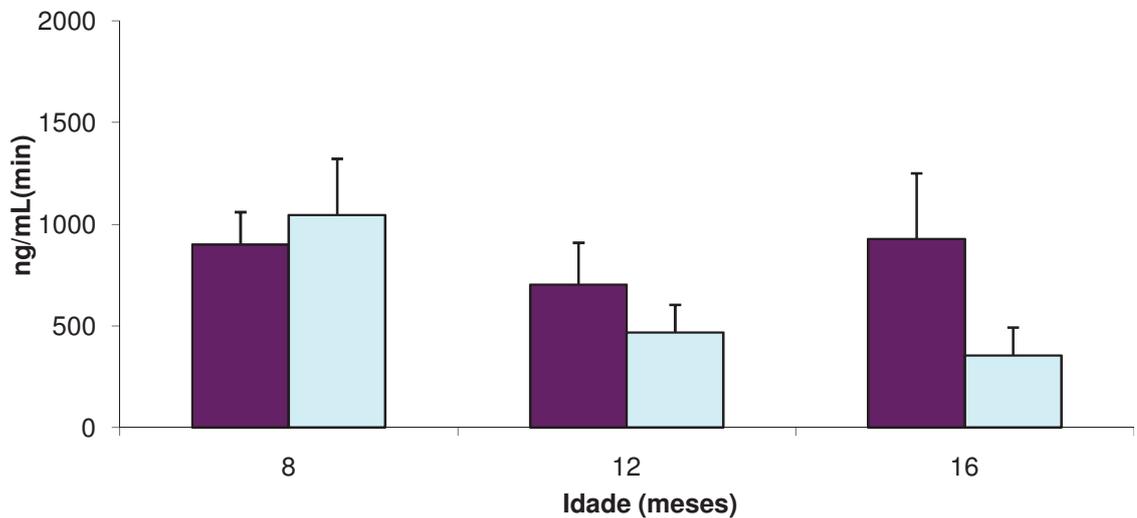
Em relação à área total de secreção (Fig. 8) área total de picos (Fig. 9), amplitude máxima dos picos (Fig.11), não houve diferença entre os grupos nos períodos avaliados.



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 8 – Área total de secreção de GH ((ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$) ou solução salina a 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$).



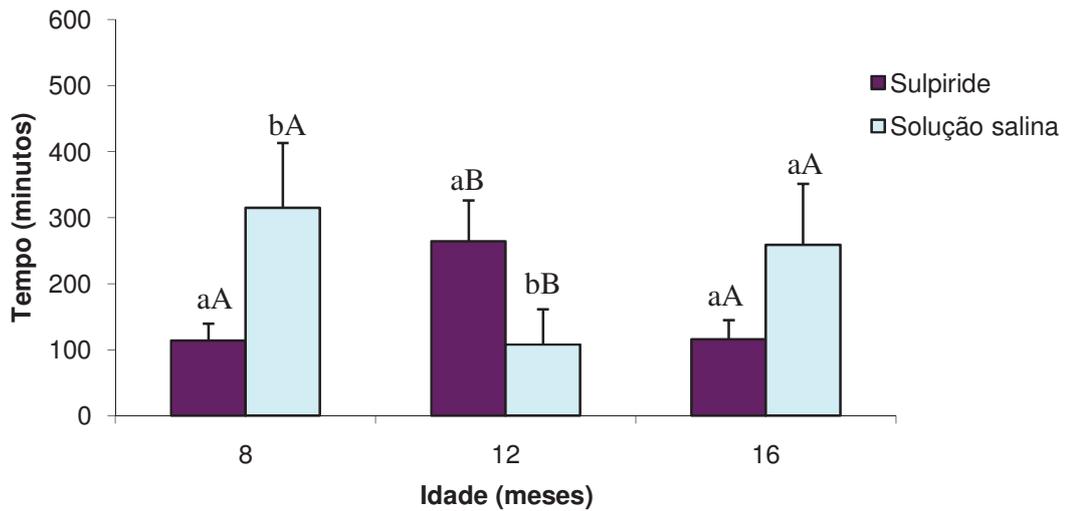
Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 9 – Área total de picos de GH (ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM em novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$) ou solução salina a 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$).

O grupo Sulpiride aos 8 meses de idade apresentou um menor tempo para aparecimento do primeiro pico que o grupo controle ($114 \pm 25,8$ min vs $315 \pm 98,36$ min, $P < 0,05$), aos 12 meses o grupo Sulpiride apresentou um maior tempo em relação ao grupo controle ($264 \pm 62,4$ min vs $108 \pm 53,3$ min, $P < 0,05$) e aos 16 meses não foi observada diferença entre os grupos. Dentro do grupo Sulpiride, as novilhas aos 12 meses apresentaram maior tempo para aparecimento do primeiro pico, comparado aos 8 e 16 meses. Já nos animais do grupo controle aos

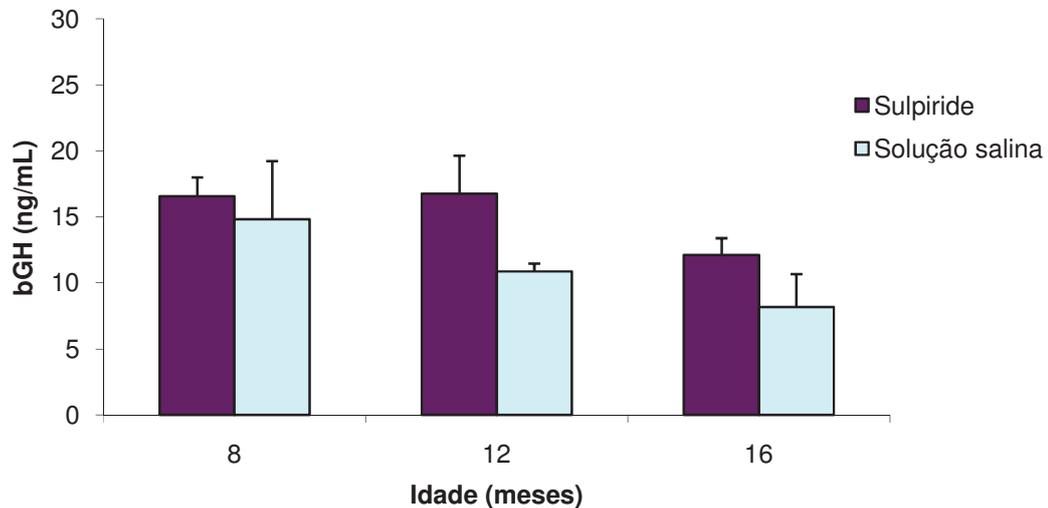
12 meses foi observado um menor tempo para aparecimento do primeiro pico comparado ao grupo aos 8 e 16 meses.



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 10 – Tempo para aparecimento do primeiro pico de secreção de GH (minutos, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$) ou solução salina a 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$).

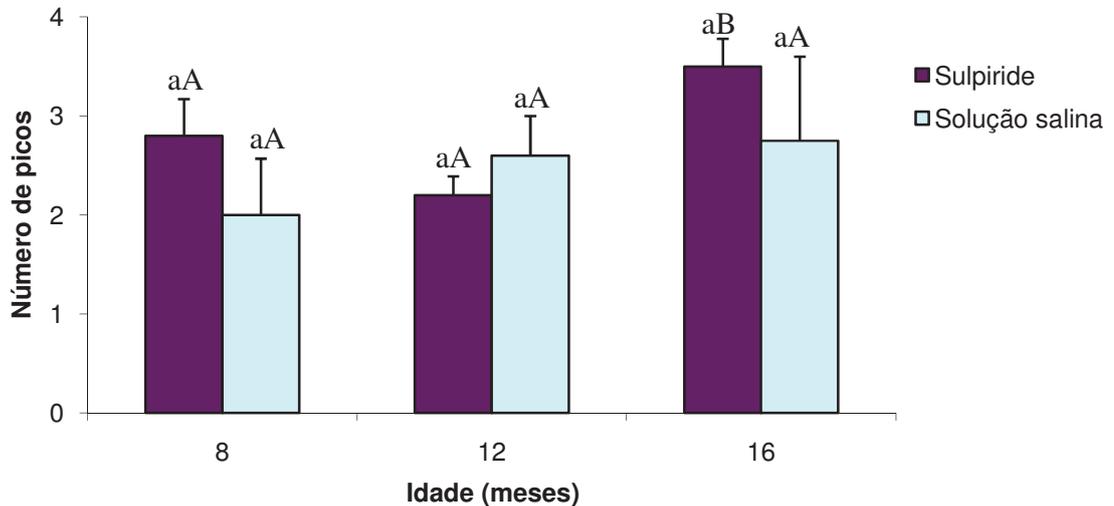


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 11 – Comparação da amplitude máxima dos picos de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) entre novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC aos 8 meses ($n = 5$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$)) ou solução salina a 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$).

Após a administração de sulpiride o número de picos foi maior aos 16 meses de idade ($P < 0,05$), quando comparado aos 8 e 12 meses de idade (Fig.14).



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 12 – Número de picos de secreção de GH (valores não transformados; Média \pm EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes que receberam sulpiride (0,59 mg/kg, SC) aos 8 meses ($n = 5$), 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$) ou solução salina 0,9% aos 8 meses ($n = 4$) 12 meses ($n = 5$) e 16 meses ($n = 4$).

8.3 DISCUSSÃO

No presente estudo, o uso de sulpiride (antagonista de receptor D2 dopaminérgico) promoveu um aumento na concentração média de GH, aos 8 e 12 meses de idade, comparado ao grupo Controle. Esta diferença não foi observada aos 16 meses (Fig.7).

A dopamina inibiu a secreção basal de prolactina e GH em células de adenohipófise de ovinos (RAY et al., 1986). As vias dopaminérgicas estão

envolvidas na regulação da secreção hipotalâmica de somatostatina em ratos (CHIHARA et al., 1979, KITAJIMA et al., 1989), provavelmente aumentando a secreção de somatostatina no núcleo periventricular (McMAHON et al., 1998). O mesmo efeito com um agonista dopaminérgico foi observado em bovinos diminuindo a liberação de GHRH, mas o bloqueio de receptores D2 não interferiu na liberação de somatostatina ou GHRH (WEST et al., 1997).

Os receptores D2, ou auto-receptores, são de 5 a 10 vezes mais sensíveis ao efeito da dopamina do que receptores pós-sinápticos em modelos bioquímicos. Em baixas doses, os efeitos de agentes dopaminérgicos mediados por auto-receptores foram predominantes, resultando em uma diminuição da função dopaminérgica, enquanto que em altas doses ocorreu também a estimulação pós-sináptica aumentando a função dopaminérgica (INEC, 2010).

Conforme a dose utilizada o sulpiride bloqueia tanto receptores D2 pré-sinápticos, como receptores pós-sinápticos (VASCONCELOS, 2007) e o haloperidol, usado no experimento de West et al. (1997), referido acima, age somente em receptores pós-sinápticos. Desta forma, é possível que exista uma variação na sensibilidade maior dos receptores pré-sinápticos à dopamina nos períodos avaliados (8 e 12 meses, em relação aos 16 meses de idade), fazendo com que o a redução da ação dopaminérgica através do uso do sulpiride promovesse o aumento na concentração do GH observado. Dados sugerem uma variação idade-dependente na densidade de receptores D1 e D2 em várias regiões cerebrais (SCHAMBRA et al., 1994). Os *slices* hipotalâmicos utilizados no

experimento de West et al., 1997, foram obtidos de cérebros de bovinos com mais de 12 meses de idade e no presente experimento com novilhas Nelore foi observado que a concentração média de GH pós-tratamento com sulpiride aumentou apenas em período igual ou menor a 12 meses de idade comparada ao grupo controle. Aos 16 meses, não foi observada diferença na concentração de GH entre o grupo Sulpiride e grupo Controle.

Além da possível variação da sensibilidade dos receptores, há dados que mostram uma variação na concentração de dopamina em relação à idade dos animais, o que também pode ter influenciado na ação do sulpiride. Em bovinos machos a concentração de dopamina aumentou na área pré-óptica do hipotálamo da quinta para a décima semana de idade (RODRIGUEZ et al., 1993) e na eminência média dos 8 aos 12 meses de idade (DEAVER et al., 1988).

O uso de um antagonista dopaminérgico aos 8 meses reduziu o tempo para o primeiro pico, no entanto aos 12 meses aumentou o tempo para aparecimento do primeiro pico em relação ao grupo controle. Aos 8 meses, a diminuição do tempo necessário para aparecimento do primeiro pico de secreção de GH sugere um possível aumento na frequência de pulsos de secreção que não foi constatada no número de picos. No entanto, essa redução no tempo para o primeiro pico nos mostra que o sistema dopaminérgico aos 8 meses exercia sua ação inibitória sobre a secreção de GH tanto diminuindo sua concentração, como bloqueando o aparecimento do primeiro pico.

Aos 12 meses era esperado que o tempo para o primeiro pico também fosse menor para o grupo Sulpiride que o grupo controle, já que neste período foi observada uma maior concentração de GH com o uso do antagonista dopaminérgico, entretanto o tempo para aparecimento do primeiro pico foi maior no grupo Sulpiride. Os mecanismos de controle da secreção de GH envolvem tanto o GHRH que tem ação estimulatória sobre a secreção deste hormônio, quanto a somatostatina que tem ação inibitória. Com a maturação do eixo hipotálamo-hipófise provavelmente ocorre mudança no padrão do controle da secreção por isso há possível alternância de efeitos da dopamina.

O hormônio do crescimento é secretado em pulsos. O padrão de secreção pode variar dependendo do sexo, espécie e fotoperíodo (GAHETE et al., 2009). Apesar da pulsatilidade ser controlada pelo hipotálamo, cultura de somatotrófos, também apresentam secreção de GH púlsatil, como uma propriedade inerente dos somatotrófos (HASSAN et al., 1994).

No presente estudo com novilhas Nelore, foi observado um aumento no número de picos aos 16 meses de idade no grupo Sulpiride comparado ao grupo Controle. A secreção episódica de GH pode ser alterada por diversos fatores do SNC, da hipófise ou fatores periféricos (McMAHON et al., 2001). Embora a somatostatina e o GHRH são os principais moduladores da secreção de GH, outros neuropeptídeos, neurotransmissores e neurohormônios alteram a secreção de GH indiretamente agindo sobre a somatostatina e/ou hormônio liberador do hormônio do crescimento (McMAHON et al., 2001).

O aumento no número de picos observado nos animais aos 16 meses pode ser conseqüência da aproximação da maturação do eixo hipotálamo-hipófise em relação aos animais aos 8 e 12 meses. Um aumento na concentração de GH anterior a puberdade, altas concentrações na puberdade e um declínio pós-puberdade foram observados em novilhas búfalas (HALDAR e PRAKASH et al., 2006). No entanto, não foi observado um aumento no número de picos no grupo Controle de novilhas Nelore, o que nos sugere que o bloqueio da ação dopaminérgica neste período, com o uso do sulpiride é que permitiu um maior número de picos. Desta forma, o uso de um antagonista dopaminérgico sugere que a dopamina tem efeito inibitório sobre a secreção de GH, que ficou evidente em diferentes formas: Aos 8 e 12 meses de idade houve aumento na concentração média de GH e aos 16 meses aumento no número de picos de secreção de GH.

8.4 CONCLUSÕES

Aceitamos a hipótese de que a dopamina exerce ação inibitória sobre a secreção de GH em novilhas Nelore pré-púberes, sendo esta mais evidente aos 8 e 12 meses de idade e com menor intensidade aos 16 meses. Com o uso do sulpiride, um antagonista dopaminérgico (inibe receptores D2) foi observado um aumento na concentração de GH aos 8 e 12 meses de idade e um aumento do número de picos de secreção de GH aos 16 meses.

9 EXPERIMENTO 3: ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADRENÉRGICO, NA SECREÇÃO DE GH, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

9.1 MATERIAL E MÉTODOS

9.1.2 Animais e manejo

Foram utilizadas 10 novilhas da raça Nelore, oriundas de um rebanho comercial. Após o desmame das novilhas, aos seis meses de idade, estas foram levadas para o Campus do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, localizado na cidade de Araçatuba, SP. As novilhas foram mantidas em piquetes de capim Tanzânia recebendo suplementação com bagaço de cana hidrolisado, ração concentrada (milho, soja e núcleo) e tendo livre acesso a sal mineral e água. A variação no peso foi acompanhada quinzenalmente, utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

9.1.3 Administração de clonidina e coleta de amostras de sangue

A clonidina (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US, C7897) é um agonista específico de receptor α -2-adrenérgico e foi usada na dosagem de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por via intravenosa, e o sangue coletado a cada 15 minutos por 4 horas, de acordo com Borromeo et al. (1995), aos 8, 12 e 15 meses de idade. As amostras de

sangue (10 mL) eram acondicionadas em tubos de ensaio contendo 200 µl de EDTA. Os tubos de ensaio contendo as amostras de sangue eram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos. O plasma obtido pós-centrifugação era colocado em microtubo de 1,5 mL e acondicionado em freezer a -20°C , para posterior quantificação hormonal.

9.1.4 Delineamento Experimental

As novilhas (n=10) foram divididas em 2 grupos com 5 animais cada: Grupo Controle: novilhas que receberam solução salina 0,9%, Grupo Clonidina: novilhas que receberam clonidina (10 µg/kg, Apêndice A). Alguns animais se machucaram durante o experimento deixando alguns grupos com um número menor de animais. O grupo Clonidina com quatro, quatro e cinco novilhas e o grupo Controle com quatro, cinco e quatro animais respectivamente, aos 8, 12 e 15 meses de idade.

9.2 RESULTADOS

A concentração média de GH pós-infusão de clonidina aos 8 meses de idade foi maior aos 30 min, permanecendo elevada até 90 min. comparado ao grupo Controle no mesmo período ($18,76 \pm 4,48$ vs $2,97 \pm 1,29$ ng/mL; $16,89 \pm$

4,91 vs 2,66 ± 0,86 ng/mL; 13,03 ± 1,08 vs 3,13 ± 1,28 ng/mL; 9,53 ± 1,99 vs 2,76 ± 1,34 ng/mL; 9,35 ± 2,95 vs 2,16 ± 1,34 ng/mL; P < 0,05, Fig. 13).

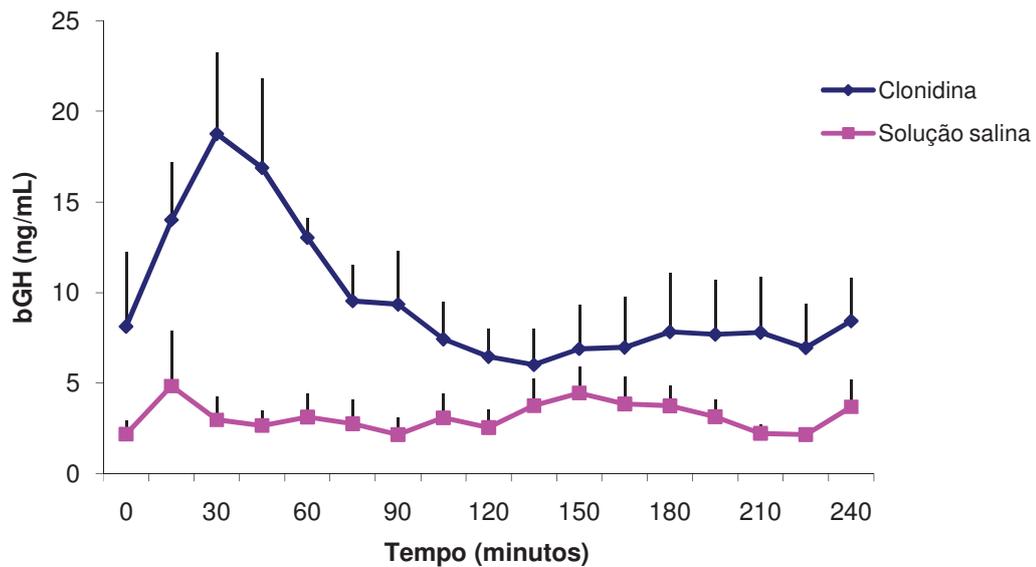


Figura 13 – Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados, média ± EPM) de novilhas Nelore que receberam clonidina (10 µg/kg, IV) ou solução salina 0,9% aos 8 meses com n = 4.

Aos 12 meses de idade, a concentração média no grupo Clonidina foi maior que no grupo Controle aos 15 min., 30 min., 210 min. e 240 min (16,68 ± 1,64 vs 4,05 ± 0,71 ng/mL; 12,02 ± 2,15 vs 4,31 ± 1,34 ng/mL; 8,94 ± 2,66 vs 2,67 ± 0,86 ng/mL; 8,74 ± 3,46 vs 3,33 ± 2,88 ng/mL; P < 0,05, Fig. 14).

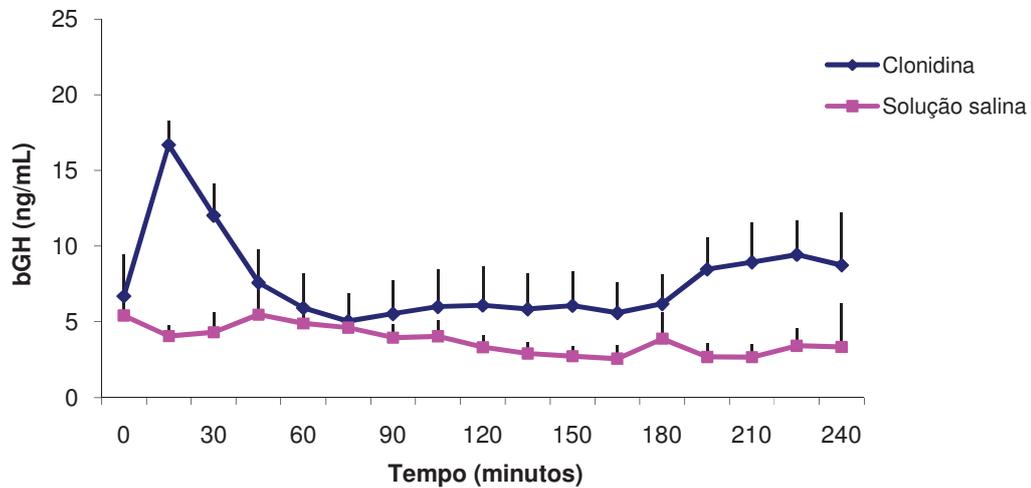


Figura 14 – Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados, média \pm EPM) de novilhas Nelore aos 12 meses que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.), n = 4 ou solução salina 0,9%, com n = 5.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na concentração de GH nas coletas aos 15 meses de idade entre o grupo Clonidina e o Controle (Fig.15).

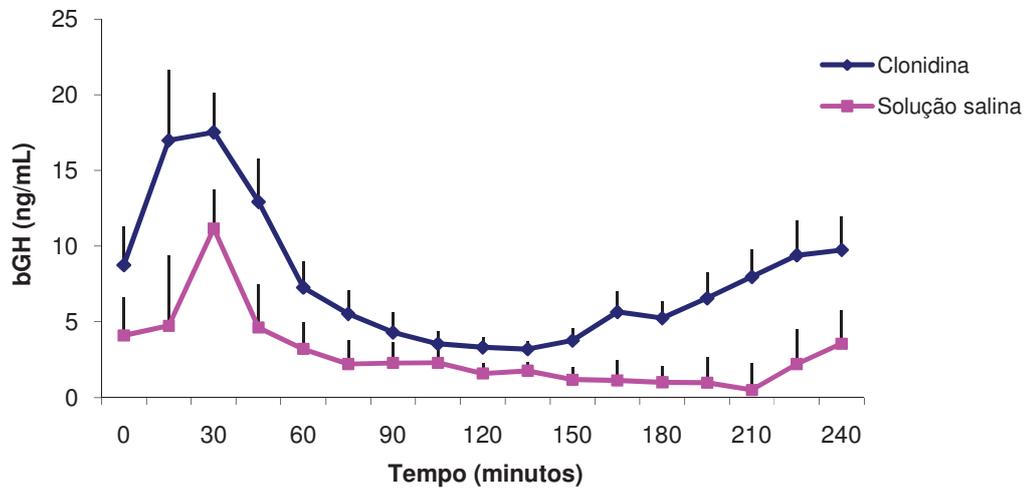
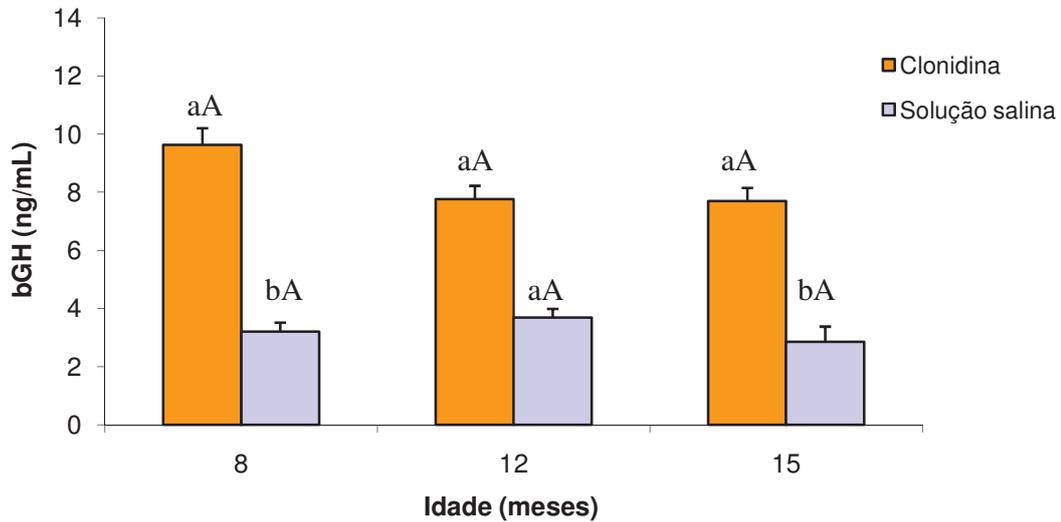


Figura 15 – Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados, média \pm EPM) de novilhas Nelore aos 15 meses que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.), n = 5 ou solução salina 0,9% com n = 4.

A comparação dos valores médios da concentração de GH entre o grupo Clonidina e o grupo Controle mostrou que o grupo Clonidina possuía maior concentração aos 8 meses (9,63 \pm 0,79 vs 3,20 \pm 0,32 ng/mL; P=0,0436) e aos 15 meses de idade (7,69 \pm 0,68 vs 2,85 \pm 0,53 ng/mL; P = 0,0255). Porém não houve diferença entre os grupos aos 12 meses de idade (7,76 \pm 0,60 vs 3,69 \pm 0,30 ng/mL; P = 0,1245; Fig. 16).



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

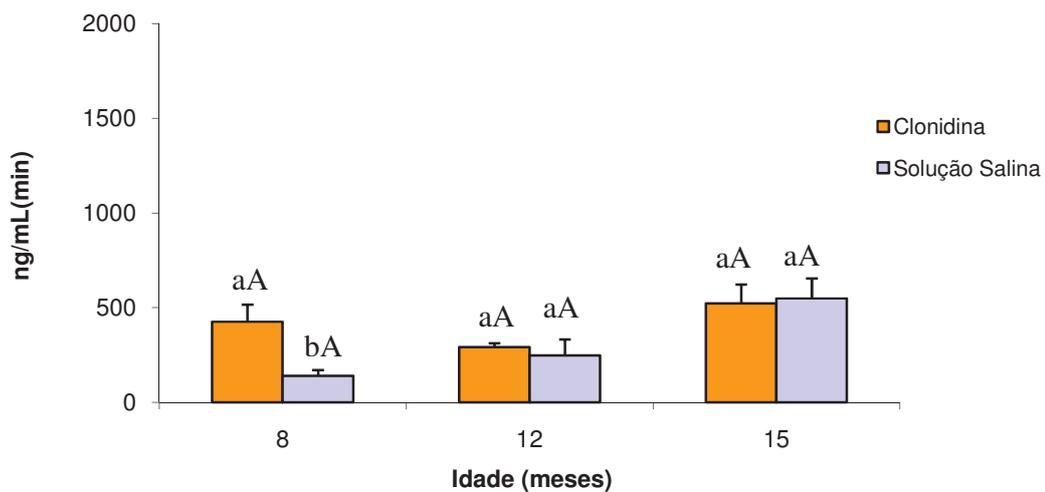
Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 16 – Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados, Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 4$) e 15 meses ($n = 5$) ou solução salina aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 15 meses ($n = 4$).

Aos 15 meses de idade embora não tenha sido encontrada diferença na concentração de GH entre o grupo Clonidina e o grupo Controle em intervalos específicos, foi observada diferença entre os intervalos de tempo dentro do grupo Clonidina aos 15 meses, com concentrações mais elevadas de GH nos intervalos de 15 ($16,98 \pm 4,63$ ng/ mL), 30 ($17,52 \pm 2,58$ ng/mL) e 45 min. ($12,92 \pm 2,86$ ng/mL).

No 8^o, 12^o, 15^o mês de idade, não houve diferença na concentração média de GH ($P > 0,05$) dentro do grupo Clonidina ($9,63 \pm 3,15$ vs $7,76 \pm 2,4$ vs $7,69 \pm 2,70$ ng/mL; $P = 0,8721$), o mesmo aconteceu no grupo Controle ($3,20 \pm 1,27$; $3,69 \pm 1,16$; $2,85 \pm 2,08$ ng/mL; $P = 0,5269$; Fig.16).

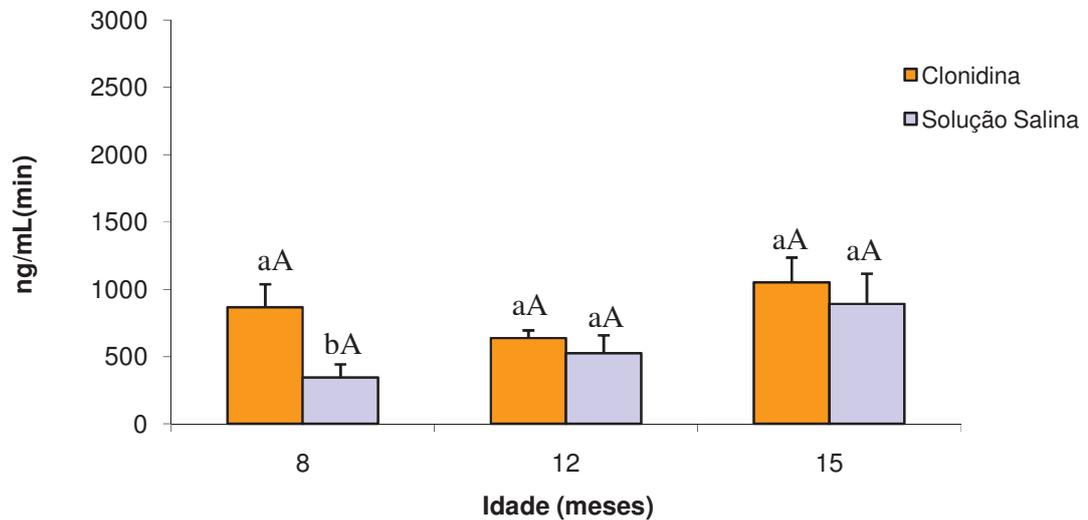
O grupo Clonidina aos 8 meses apresentou maior área total de picos ($425,6 \pm 89,41$ vs $139,4 \pm 31,27$ (ng/mL)min, $P = 0,0390$; Fig.17), quando comparado ao grupo Controle e maior área de secreção ($866,1 \pm 172,61$ vs $344,5 \pm 99,09$ (ng/mL)min, $P = 0,0485$; Fig. 18).



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 17 – Área total de picos de GH (ng/mL)min, valores não transformados ; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$, IV) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 4$) e 15 meses ($n = 5$) e solução salina 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 15 meses ($n = 4$).

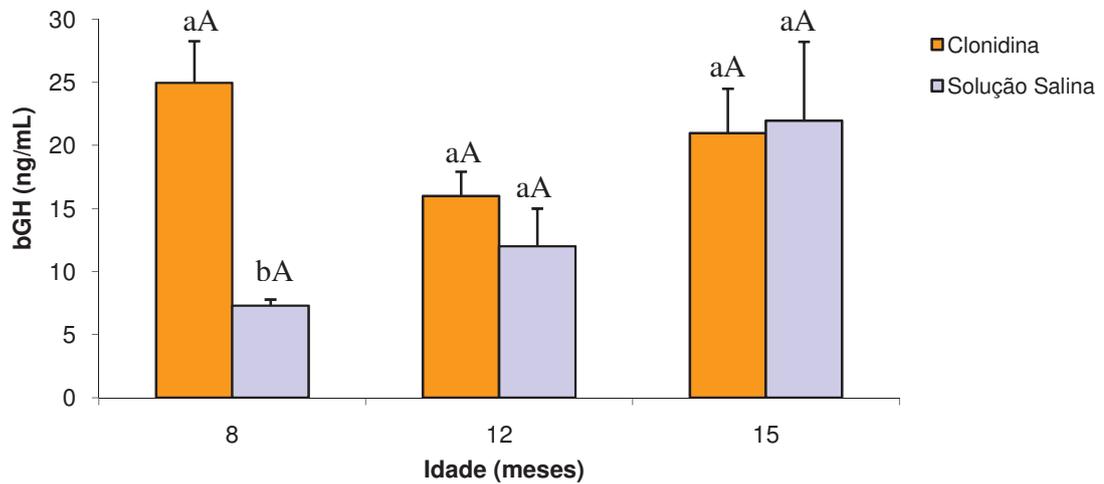


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 18 – Área total de secreção de GH (ng/mL)min, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 4$) e 15 meses ($n = 5$) e solução salina 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 15 meses ($n = 4$).

A amplitude máxima do maior pico, foi mais elevada no grupo Clonidina aos 8 meses, quando comparado ao grupo controle ($24,83 \pm 3,2$ vs $7,29 \pm 0,49$ ng/mL; $P = 0,0009$; Fig. 19).

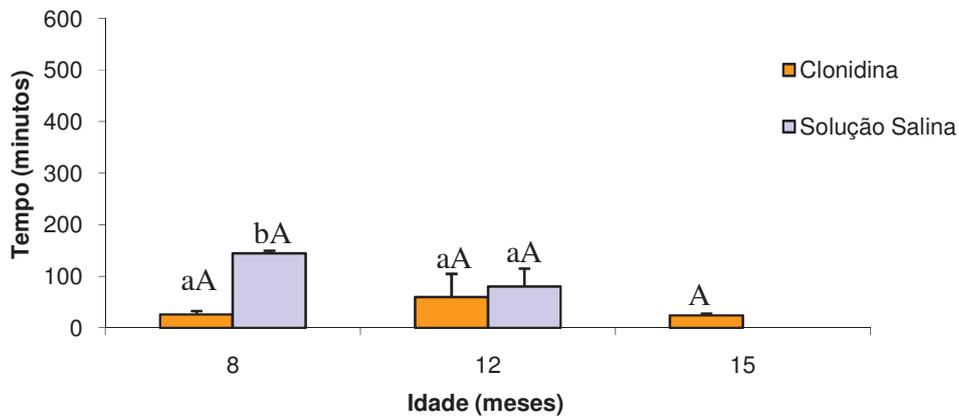


Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 19 – Amplitude máxima de picos de GH (ng/mL, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 4$) e 15 meses ($n = 5$) e solução salina 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 15 meses ($n = 4$).

Em relação ao tempo para aparecimento de pico, o grupo Clonidina aos 8 meses apresentou um menor tempo para o aparecimento de pico comparado ao grupo Controle (26 ± 7 vs $145 \pm 5,2$ minutos; $P = 0,0424$; Fig.20).



Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Figura 20 – Tempo para aparecimento do primeiro pico de GH (minutos, valores não transformados; Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, I.V.) aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 4$) e 15 meses ($n = 5$) e solução salina 0,9% aos 8 meses ($n = 4$), 12 meses ($n = 5$) e 15 meses ($n = 4$).

9.3 DISCUSSÃO

No presente estudo, o estímulo alfa2-adrenérgico sobre a concentração de GH foi predominantemente estimulatório aos 8, 12 e 15 meses de idade em novilhas Nelore.

Há evidências que a indução alfa-2-adrenérgica na secreção de GH ocorra devido a um mecanismo duplo envolvendo inibição de neurônios de somatostatina no núcleo periventricular (PeVn) e estímulo direto na liberação de GHRH de terminais axônicos na eminência média (McMAHON et al., 2001).

A clonidina estimulou a secreção de GH em ratos (WILLOUGHBY et al., 1993) e em bezerros (GAYNOR et al., 1993); nos bovinos o estímulo da secreção de GH via receptores alfa 2 – adrenérgico ocorre por um aumento na liberação de GHRH, sem afetar a liberação de somatostatina (West et al., 1997). Mas há relatos da ação indireta da clonidina inibindo a secreção da somatostatina sem agir nos neurônios secretores de GHRH (McMahon et al., 2001).

No período pós-aplicação do agonista alfa-2-adrenérgico, a concentração média de GH foi maior aos 30 min, permanecendo elevada até os 90 min para as novilhas aos 8 meses (Fig.13) e aos 15, 30, 210 e 240 min., para os animais aos 12 meses (Fig.14). Os resultados com as novilhas Nelore coincidem com o aumento observado na concentração de GH entre 15 a 60 min pós-administração de clonidina, em vacas holandesas (BORRROMEO et al., 1995).

Embora aos 15 meses de idade, não tenha sido observada diferença na concentração média de GH entre os grupos Clonidina e Controle dentro dos intervalos de tempo (como os observados aos 8 e 12 meses), foi verificado aumento na concentração de GH dentro do grupo Clonidina dos 15 aos 45 min, sugerindo que nas novilhas Nelore aos 15 meses de idade a clonidina promoveu um aumento na concentração de GH assim como observado aos 8 e 12 meses.

Podemos considerar que aos 12 meses de idade o aumento na concentração de GH observado entre 15 e 30 min em resposta à clonidina, pode ser conseqüência da secreção de hormônio armazenado em grânulos. E o aumento aos 210 e 240 min pode ser resultado da síntese de nova proteína,

provocando em um padrão bifásico de liberação de GH. A meia-vida da conidina está em torno de 12 h. Os neurotransmissores além de regular a secreção de GH podem também regular a expressão de mRNA para GH e desta forma afetar a síntese do hormônio (SOYOOLA et al., 1994).

Bezerros hipoglicêmicos responderam mais (aumentando a concentração de GH) a clonidina que bezerros recém alimentados (GAYNOR et al., 1993). Estudos com agonistas e antagonistas sugerem que os receptores alfa 2-adrenérgicos sejam importantes na liberação de GH durante a hipoglicemia (TATAR & VIGAS, 1984).

No presente experimento, as novilhas Nelore receberam alimento volumoso e água a vontade durante o período da coleta seriada de sangue e mesmo assim a administração da clonidina aumentou a concentração de GH nos períodos avaliados. Nas novilhas Nelore, a média do tempo necessário para o aparecimento de pico foi de 32 min. após a aplicação da clonidina (10 µg/kg, I.V.), porém 54% dos animais apresentaram um pico nos primeiros 15 min após a clonidina., comparada a utilizada no estudo no estudo citado. Foi observado que a infusão 20 µg/kg, I.V de clonidina aumentou a concentração de GH após 10 min (Gorewit et al. 1981) próximo do momento encontrado nas novilhas Nelore.

Foi observado um aumento na área total de picos (Fig.17) e na área de secreção de GH (Fig.18) aos 8 meses de idade entre animais Clonidina, comparado aos animais Controle, mas não foi observada diferença entre os grupos nas outras idades. Este aumento na área de secreção de GH,

provavelmente deve-se ao fato de que nos animais aos 8 meses de idade além de ter sido observada uma maior concentração de GH em intervalos restritos, também foi encontrada uma maior concentração média total no grupo Clonidina comparado ao grupo Controle. A maior amplitude máxima de picos provocou como consequência a maior área total de picos encontrada neste período.

O estímulo alfa 2 - adrenérgico aos 8 meses de idade aumentou a concentração de GH e aos 12 e 15 meses de idade também interferiu na área de secreção, área total de picos, amplitude máxima de picos e tempo para aparecimento de pico de GH. Era esperado no grupo Clonidina um aumento na frequência de picos, pois o primeiro pico ocorreu em um menor tempo ($P = 0,0424$) comparado aos animais controle. No entanto, como o grupo Clonidina apresentou uma maior amplitude de picos, com maior área de secreção de GH provavelmente isto comprometeu o aumento no número de picos.

9.4 CONCLUSÕES

O uso da clonidina, um agonista alfa 2 – adrenérgico estimulou a secreção de GH em novilhas Nelore pré-púberes. Este efeito foi mais evidente nas novilhas aos 8 meses quando comparado com os 12 e 15 meses de idade.

10 CONCLUSÕES FINAIS

Ao longo da maturação do sistema hipotálamo-hipófise (GH) nas novilhas Nelore houve um aumento da atividade inibitória gabaérgica aos 10, 14 e 17 meses de idade, sendo mais evidente nos 10 meses de idade. A dopamina também inibiu a secreção de GH aos 8 e 12 meses de idade, com um declínio da inibição aos 16 meses. O sistema alfa 2 – adrenérgico atuou estimulou a secreção de GH aos 8, 12 e 15 meses de idade, sendo mais ativo aos 8 e 15 meses.

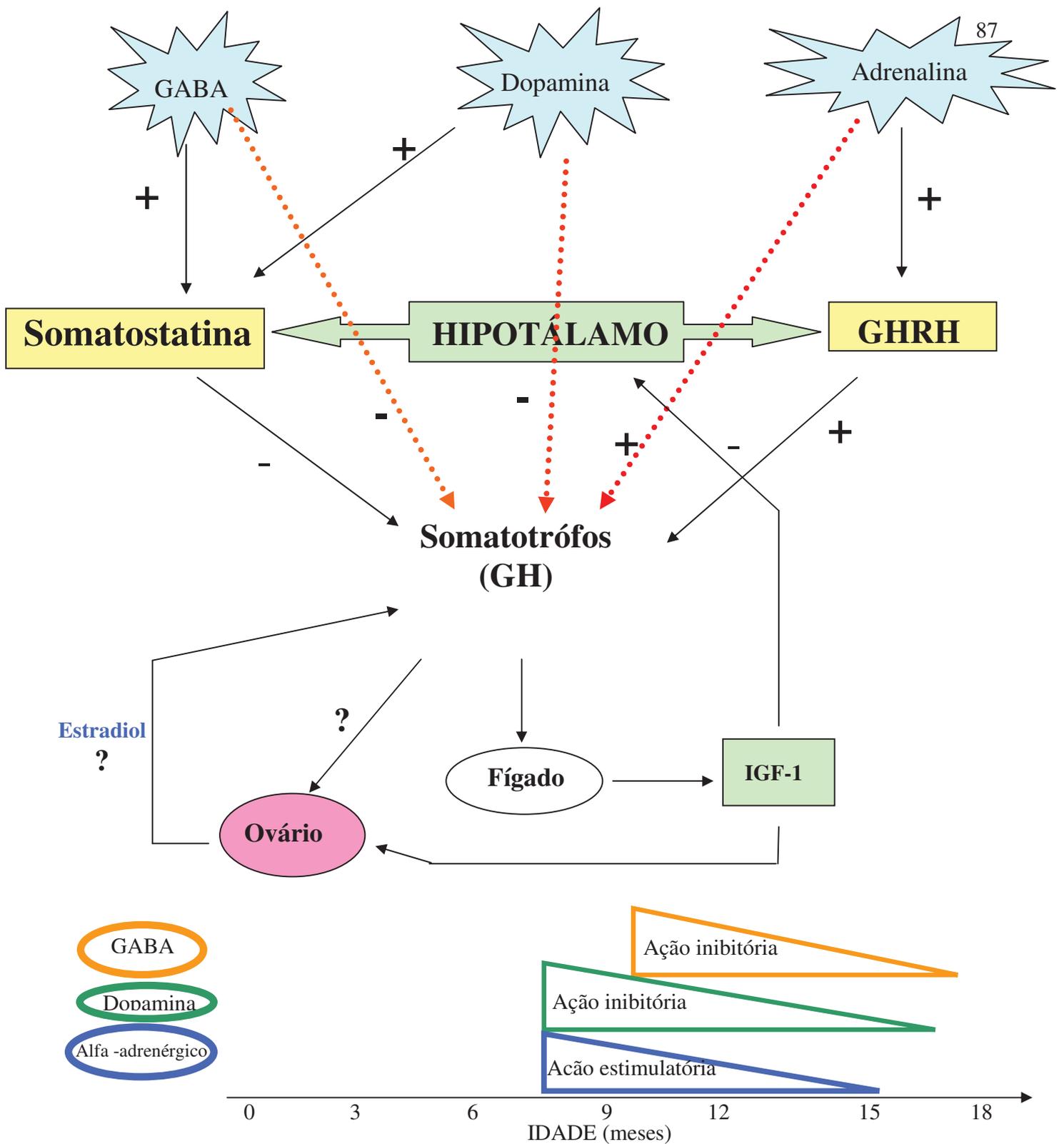


Figura 21 – Esquema da possível ação dos neurotransmissores na regulação da secreção de GH, em novilhas da raça Nelore, durante o processo de maturação sexual, (+) feedback positivo, (-) feedback negativo.

REFERÊNCIAS

ACS, Z.; MAKARA, G.B.; STARK, E. Growth hormone secretion of the neonatal rat pituitaries is stimulated by gamma-aminobutyric acid *in vitro*. **Life Science**, v.34, p.1505 – 1511, 1984.

ACS, Z.; SZABÓ, B.; KAPÓCS, G.; MAKARA, G.B. Gamma-aminobutyric acid stimulates pituitary growth hormone secretion in the neonatal rat. A superfusion study. **Endocrinology**, v. 120, p.1790- 1798, 1987.

ADVIS, J. P.; WHITE SMITH, S.; OJEDA, S.R. Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat. **Endocrinology**, v.108, p. 1343 – 1352, 1981.

AGUIAR, A.J.A. Contenção química de equinos e ruminantes. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004, 807 p.

BARTKE, A.; CHANDRASHEKAR, V.; TURYN, D.; STEGER, R.W.; DEBELJUK, L.; WINTERS, T.A.; MATTISON, J.A.; DANILOVICH, N.; CROSON, W.; WERSING, D.R.; KOPOCHICK, J. Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.113-123, 1999.

BORROMEO, V.; BERRINI, A; MOLLER, F.; SECCHI, C. Inverse control of growth hormone and prolactin secretion in clonidine-stimulated dairy cattle. **Journal of Endocrinology**, v.2, p. 271-277,1995.

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

CATALDI, M.; MAGNAN, E.; GUILLAUME, V.; DUTOUR, A.; CONTE-DEVOLX, B.; LOMBARDI, G.; OLIVER, C. Relationship between hypophyseal portal GHRH and somatostatin and peripheral GH levels in the conscious sheep. **Journal of Endocrinology Investigation**, v.17, p.717-722, 1994.

CHAGAS, L.M.; BASS, J.J.; BLACHE, D.; BURKE, C.R.; KAY, J.K.; LINDSAY, D.R.; LUCY, M.C.; MARTIN, G.B.; MEIER, S.; RHODES, F.M.; ROCHE, J.R.; THATCHER, W. W.; WEBB, R. Invited Review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.90, p. 4022 – 4032, 2007.

CHASE, C.C.; KIRBY, Jr.C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T. A.; LUCY, M. C. Patterns of ovarian growth and development in the cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 212-219, 1998.

CHEUNG, C.C.; THORNTON, J.E.; KUIJPER, J.L.; WEIGLE, D.S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology**, v.138, p.855-858, 1997.

CHIHARA, K.; ARIMURA, A. SCHALLY, A.V. Effect of intraventricular injection of dopamine, norepinephrine, acetylcholine, and 5 – Hydroxytryptamine on immunoreactive somatostatin release into rat hypophyseal portal blood. **Endocrinology**, v.104, p.1656-1662, 1979.

COOPER, J.R. BLOOM, F.E., ROTH, R.H. **The biochemical basis of neuropharmacology**, v.7, 1996.

DAVIS, S.L.; OHLSON, D.L.; KLINDT, J.; ANFINSON, M.S. Episodic growth hormone secretory patterns in sheep: relationship to gonadal steroid hormones. **The American Journal of Physiology**, v.233, p.519-523, 1977.

DEAVER, D.R.; BRYAN, K.A. Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, 1999.

DIAZ-TORGA, G.S.; MEJA, M.E.; GONZALES-IGLESIAS, A.; FORMIA, N.; BEA-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.M. **Theriogenology**, v.56, p.111-112, 2000.

DUTOUR, A.; BRIARD, N.; GUILLAUME, V.; MAGNAN, E.; CATALDI, M.; SAUZE, N.; OLIVER, C. Another view of GH neuroregulation: lessons from the sheep. **European Journal of Endocrinology**, v.136, p.553-565, 1997.

ECKERY, D.C.; MOLLER, C.L.; NETT, T.M.; SAWYER, H.R. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.57, p.507-513, 1997.

ERICKSON, G.F.; GARZO, V.G.; MAGOTTIN, D.A. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinological Metabolism**, v. 69, p.716–724, 1989.

FOORSYTH, I.A. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. **Experimetal and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.102, p.244-251, 1994.

FUKAMACHI, S. e MEYER, A. Evolution of receptors for growth hormone and somatolactin in fish and land vertebrates: lessons from the lungfish and sturgeon orthologues. **Journal of molecular evolution**, v.65, p.359-372, 2007.

GAHETE, M.D.; DURÁN-PRADO, M.; LUQUE, R.M.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.J.; QUINTERO, A.; GUTIERREZ-PASCUAL; E.; CÓRDOBA-CHÁCON, J.; MALÁGON, M.M.; GRACIA-NAVARRO, F.; CASTAÑO, J.P. **Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology**, v.1163, p. 137-153, 2009.

GAMEL-DIDELON, K.; KUNZ, L.; FOHR, K.J.; GRATZL, M.; MAYERHOFER, A. Molecular and physiological evidence for functional gama-aminobutyric acid (GABA) – C receptors in growth hormone-secreting cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20192-20195, 2003.

GAYNOR, P.J.; CHAPIN, L.T.; LOOKINGLAND, K.J.; TUCKER, H.A. Alpha 2-adrenergic receptor-mediated regulation of growth hormone secretion in meal-fed Holstein steers. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 204, p.318-322, 1993.

GLUCKMAN, P.D. The ontogenesis of GABA mediated inhibition of growth hormone release in the sheep. **Journal Development Physiology**, v.4, p.227-236, 1982.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian function in heifers: Follicular Populations and Peripheral Hormones. **Biology of Reproduction**, v.45, p.941-949, 1991.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 247-254, 1993.

GONG, J.G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.229-241, 2002.

GOREWIT, R.C. Pituitary thyroid and adrenal response to clonidine in dairy cattle. **Journal of Endocrinology and Investigation**, v.4, p. 135-139, 1981.

GRIGSBY, M.E.; TRENKLE, A. Plasma growth hormone, insulin, glucocorticoids and thyroids hormones in large, medium and small breeds of steers with and without an estradiol implant. **Domestic Animal Endocrinology**, v.3, p.261-267, 1986.

HALDAR, A. e PRAKASH, B.S. Peripheral patterns of growth hormone, luteinizing hormone, and progesterone before, at, and after puberty in bufallo heifer. **Endocrine Research**, v.31, p. 295-306, 2005.

HALDAR, A. e PRAKASH, B.S. Growth hormone-releasing factor (GRF) induced growth hormone advances puberty in female buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v.92, p. 254-267, 2006.

HALL, J.B.; SHILLO, K.K.; FITZGERALD, B.P.; BRADLEY, N.W. Effects of recombinant bovine somatotropin and dietary energy intake on growth, secretion of luteinizing hormone, follicular development, and onset of puberty in beef heifer. **Journal of Animal Science**, v.72, p.709-718, 1994.

HARVEY, S. e HULL, K.L. Growth hormone: a paracrine growth factor? **Endocrine**, v.7, p.267-279, 1997.

HASSAN, H.A.; MERKEL, R.A. Perifusion model system to culture bovine hypothalamic slices in series with dispersed anterior pituitary cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v.30, p.435-442, 1994.

HISTÓRIA do zebuino no Brasil. ABCZ. Disponível em: [HTTP: www.abcz.org.br/site/abcz/historico.php](http://www.abcz.org.br/site/abcz/historico.php)>. Acesso em 10 de janeiro de 2011.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N.C. Opioidergic, dopaminergic and adrenergic regulation of LH secretion in pre-pubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.119, p. 207-215, 2000.

IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico Social. Grupo de Estudos de Políticas Agroindustriais. GEPA/UFSCAR. **Instituto Brasileiro da Qualidade e Produtividade no Paraná/IBPQ**. Análise da competitividade da cadeia agroindustrial da carne bovina no estado do Paraná. Curitiba: IPARDES, 2002. 255p.

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.372-377, 1998.

IGBAL, J.; KUROSE, Y.; CANNY, B.; CLARKE, I.J. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. **Endocrinology**, v.147, p.510-519, 2005.

INEC, Instituto de Neurociências e Comportamento. **Aspectos Neuroquímicos da Dopamina**. In: Papel funcional da Interação Dopamina e Óxido Nítrico no Sistema Nervoso, [2010?].Disponível em: [http://www.inec-usp.org/cursos/cursol/aspectos_neuroqu%EDmicos_dopamina.htm](http://www.inec.usp.org/cursos/cursol/aspectos_neuroqu%EDmicos_dopamina.htm). Acesso em: 10 jan. 2011.

JUENGEL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; HEATH, D.A.; LUN, S.; WAKWFIELD, S.J.; McNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p. 1-10, 1995.

JIA, X.C.; KALMIJIN, J.; HSUEH, A.J. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.18, p. 1401-1409, 1986.

KATO, T.; SHIMOKAWA, N.; HIRAI, T.; YOSHIHAMA, .; KAWAI, H.; HATTORI, M.A.; EZASHI, T.; SHIMOGORI, Y.; WAKABAYASHI, K. Porcine growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in bacterial and mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1048, p.290-293, 1990.

KAWAUCHI, H. Evolutionary aspects of pituitary hormones. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v.62, p.139-155, 1989.

KENNEDY, S.R.; THOMPSON Jr., D.L.; PRUETT, H.E.; BURNS, P.J.; DEGHENGI, R. Growth hormone response to a novel growth hormone-releasing tripeptide in horses: interaction with gonadotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and sulpiride. **Journal of Animal Science**, v.80, p.744-750, 2002.

KIRBY, C.J.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained – release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.273-285, 1996.

KITAJAMA, N.; CHIHARA, K., ABE, H.; OKIMURA, Y.; FUJI, Y.; SATO, M.; SHAKUTSUI, S. WATANABE, M.; FUJITA, T. Effects of dopamine on immunoreactive growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion from rat hypothalamic slices perfused *in vitro*. **Endocrinology**, v.124, p.69-76, 1989.

KOLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.59, p.836-842,1998.

KRACIER, J.; SHEPPARD, M.S.; LUKE, J.; LUSSIER, B.; MOOR, B.C.; COWAN, J.S. Effect of withdrawal of somatostatin and growth hormone (GH)-releasing factor on GH release *in vitro*. **Endocrinology**, v.122, p/ 1810-1816,1988.

LAL, S.; TOLIS, G.; MARTIN, S.B.; BROWN, G.M.; GUYDA, H. Effect of clonidine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone,

and thyroid-stimulating hormone in the serum of normal men. **Journal of Clinical Endocrinol and Metabolism**, v.41, p. 872-832, 1975.

LANDEFELD, T.D.; SUTTIE, J.M. Changes in messenger ribonucleic acid concentrations and plasma levels of growth hormone during the ovine estrous cycle and in response to exogenous estradiol. **Endocrinology**, v.125, p. 1474-1477, 1989.

LANGHOUT, D.J.; SPICER, L.J.; GEISERT, R.D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: Effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, and protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3321-3334, 1991.

LESHIN, L.S.; KRAELING, R.R., KISER, T.E. Immunocytochemical localization of the catecholamine-synthesizing enzymes, tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase, in the hypothalamus of cattle. **Journal Chemistry Neuroanat**, v.9, p.175-194, 1995.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicles from immature male mice. **Endocrinology**, v.139, p.2342-2347, 1998.

LUCY, M.C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproductive Domestic Animal**, v.2, p.31-39, 1994.

MARTIN, J.B.; DURAND, D.; GURD, W.; FAILLE, G.; AUDET, J.; BRAZEAU, P. Neuropharmacological regulation of episodic growth hormone and prolactin secretion in the rat. **Endocrinology**, v.102, p.106-113, 1988.

MAURAS, N.; ROGOL, A.D.; VELDHUIS, J.D. Increased hGH production rate after low-dose estrogen therapy in prepubertal girls with Turner`s syndrome. **Pediatric Research**, v. 28, p. 626 – 630,1989.

MAKAREVICH, A.V.; SIROTKIN, A.V. The involvement of the GH/IGF-1 axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.197-207, 1997.

McANDREWS, J.M.; STROUD, C.M.; MacDONALD, R.D.; HYMER, W.C.; DEEVER, D.R. Age-related changes in the secretion of growth hormone in vivo and in vitro in infantile and prepubertal Holstein bull calves. **Journal Endocrinology**, v.139, p.307-315, 1993.

McMAHON, C.D.; CHAPIN, L.T.; LOOKINGLAND, K.J.; TUCKER, H.A. Stimulation of dopamine D1 receptors increases activity of periventricular somatostatin neurons and suppresses concentrations of growth hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, p. 257-265, 1998.

McMAHON, C.D.; RADCLIFF, R.P.; LOOKINGLAND, K.J.; TUCKER, H.A. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.20, p.65-87, 2001.

McSHANE, T.M.; SCHILLO, K.K.; BOLING, J.A.; BRADLEY, N.W.; HALL, J.B. Effects of recombinant DNA-derived somatotropin and dietary energy intake on

development of beef heifer: I. Growth and puberty. **Journal of Animal Science**, v. 67, p.2230-2236, 1989.

MILLER, W.L.; MARTIAL, J.A.; BAXTER, J.D. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.7521-7524,1980.

MOALLEM, U.; DAHL, G.E.; DUFFEY, E.K.; CAPUCO, A.V.; ERDMAN, R.A. Bovine somatotropin and Rumen-Undegradable protein effects on skeletal growth in prepubertal dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 3881- 3888, 2004.

MOREIRA, P.S.A.; SILVEIRA, A.C.; ARRIGONI, M.; COSTA, C.; CHARDULO, L.A . L., FURLAN, L.R.; PAI, V.D. Efeito da somatotropina na hipertrofia das fibras musculares esqueléticas e precocidade reprodutiva de novilhas Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.1853-1860, 2000.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. Harper: Bioquímica, 6 ed., 798 p., 1990.

MURAKAMI, Y.; KATO, Y.; KOSHIYAMA, H.; INOUE, T. ISHIKAWA, Y.; IMURA, H. Involvement of alpha-adrenergic and gabaergic mechanisms in growth hormone secretion induced by central somatostatin in rats. **Brain Research**, v. 407, p.405-408, 1987.

NOGUEIRA, G.P. Puberdade e maturidade sexual de novilhas *bos indicus*. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada), p.180 –190, 2006.

OJEDA, S. R. e JAMESON, H.E. Developmental patterns of plasma pituitary growth hormone (GH) in the female rat. **Endocrinology**, v.100, p. 881- 889,1977.

OJEDA, S.R.; ADVIS, J.P.; ANDREWS, W.W. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. **Federation Proceedings**, v.39, p. 2365-2371,1980.

PARLOW, A F. Bovine growth hormone radioimmunoassay (bGH RIA). **National Hormone & Peptide Program**. National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases. Harbor – University of California Los Angeles, CA, Torrance. 2007.

PATTERSON, D.J.; WOOD, S.L.; RANDLE, R.F. Procedimentos que dão suporte ao manejo reprodutivo de novilhas de corte de reposição. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2006, Uberlândia. **Curso...** Uberlândia: [s.n.], 2006, p.106-127.

PESSUTI, O; MEZZADRI,F.P.; Atualidade e perspectivas da pecuária paranaense. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais....**Londrina: [s.n.], 2004. p.21-27, 2004.

PRODUÇÃO pecuária municipal 2006. IBGE. Disponível em: < HTTP: www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1053>. Acesso em: 10 de janeiro de 2011.

RADCLIFF, R.P., VANDEHAAR,M.J.; CHAPIN, L.T.; PILBEAM,T.E.; BEEDE,D.K., STANISIEWSKI,E.P.; TUCKER, H.A. Effects of diet and injection of bovine somatotropin on prepubertal growth and first-lactation milk yields of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.23-29, 2000.

RAMALEY, J.A.; PHARES, C.K. Delay of puberty onset in females due to suppression of growth hormone. **Endocrinology**, v. 106, p. 1989 - 1993, 1980.

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; HONARAMOZ, 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.

RAY, K.P.; GOMM, J.J.; LAW, G.J.; SIGOURNAY, C.; WALLIS, M. Dopamine and somatostatin inhibit forskolin-stimulated prolactin and growth hormone secretion but not stimulated cyclic AMP levels in sheep anterior pituitary cell cultures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.45, p.175-182, 1986.

RODRÍGUEZ, R.E., BENSON, B.; DUNN, A.N.; WISE, M.E. Age-related changes in biogenic amines, opiate, and steroid receptors in the pre-pubertal bull calf. **Biology of Reproduction**, v. 48, p.371 - 378, 1993.

SALANCINSKI, P.R.; MCLEAN, C.; SYKES, J.E.; CLEMENT-JONES, V.V. LOWRY, P.J. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3,6-diphenyl glycoluril (Iodogen). **Analytical Biochemistry**, v.117, p. 136-146, 1981

SANGIAH, S.; BOROWITZ, J.L.; YIM, G.K.W. Action of GABA, picrotoxin and bicuculline on adrenal medulla. **European Journal of Pharmacology**, v.27, p.130-135, 1974.

SCANLAN, N.; DUFOURNY, L.; SKINNER, D.C. Somatostatin-14 neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with estrogen receptor alpha and somatostatin-28 (1-12) immunoreactivity, and activation in response to estradiol. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1318-1324, 2003.

SCHAMBRA, U.B.; DUNCAN, G.E.; BREESE, G.R.; FORNARETTO, M.G.; CARON, M.G.; FREMEAU Jr., R.T. Ontogeny of D1 and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. **Neuroscience**, v.62, p. 65-85, 1994.

SCHEM, S.R.; DEEVER, D.R.; GRIEL, L.C., MULLER, D. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 815 – 821, 1990.

SHARARA, F.I.; GIUDICE, L.C. Role of growth hormone in ovarian physiology and onset of puberty. **Journal of Society Gynecologic Investigation**, v.4, 1997.

SIMPSON, R.B.; ARMSTRONG, J.D.; HARVEY, R.W.; MILLER, D.C.; HEIMER, E.P.; CAMPBELL, R.M. Effect of active immunization against growth hormone-releasing factor on growth and onset of puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4914-4924, 1991.

SOTO-OTERO, R.; MENDEZ-ALVAREZ, E.; SIERRA-PAREDES, G.; GALAN-VALIENTE, J.; AGUILAR-VEIGA, E.; SIERRA-MARCUÑO, G. Simultaneous determination of the two components of picrotoxin in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with application to a pharmacokinetic study in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.7, p.369-375, 1988.

SOYOOLA, E.O.; BURGESS, M.F.; BIRD, R.C.; KEMPPAINEN, R.J.; WILLIAMS, J.C.; SARTIN, J.L. Neurotransmitter receptor agonists regulate growth hormone gene expression in cultured ovine pituitary cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 207, p. 26 – 33, 1994.

SPENCER, G.S.; BERRY, C.J.; BASS, J.J. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in sheep. VII. Effects of GABA. **Regulatory Peptides**, v. 52, p.181-186, 1994.

STANKO, R.L.; ARMSTRONG, J.D.; COHICK, W.S.; HARVEY, R.W.; SIMPSON, R.B.; HARTNELL, G.F.; HEIMER, E.P.; CAMPBELL, R.M. Effect of daily replacement therapy with recombinant bovine somatotropin on somatotropin, insulin-like growth factor I, and onset of puberty in beef heifer immunized against growth hormone-releasing factor. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1786-1795, 1994.

SUTTIE, J.M.; KOSTYO, J.L.; EBLING, F.J.; WOOD, R.I.; BUCHOLTZ, D.C.; SKOTTNER, A.; ADEL, T.E.; TOWNS, R.J.; FOSTER, D.L. Metabolic interfaces between growth and reproduction. IV. Chronic pulsatile administration of growth hormone and the timing of puberty in the female sheep. **Endocrinology**, v.129, p. 2024-2032, 1991.

TATAR, P.; VIGAS, M. Role of alpha 1 and alpha 2 adrenergic receptors in the growth hormone and prolactin response to insulin-induced hypoglycemia in man. **Neuroendocrinology**, v.39, p.275-280, 1984.

THOMPSON, D.L.; RAHMANIAN, M.S.; DEPEW, C.L.; BURLEIGH, DE SOUZA, C.J., COLBORN, D.R. Growth hormone in mares and stallions: pulsatile secretion, response to growth hormone-releasing hormone, and effects of exercise, sexual stimulation, and pharmacological agents, v. 85, p. 2873 – 2881, 1992.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, N.M.; SALES, G.T.M.; PATROCÍNIO, M.C.A.; OLIVEIRA, G.R.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Efeitos da sulpirida sobre a

densidade de receptores dopaminérgicos D2 – símile em corpo estriado de ratos jovens e velhos. jovens e velhos. *Pesquisa Médica*, v.1, p. 15 - 20, 2007.

WARWICK, J. M.; WALLIS, O.C.; WALLIS, M. Cloning, sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNA for ovine pregrowth hormone, **Biochima et Biophysica Acta** v. 1008, p.247-250, 1989.

WEST, C.R.; GAYNOR, P.J.; LOOKINGLAND, K.J.; TUCKER, H.A. Regulation of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from perfused, bovine hypothalamic slices. I. Alfa2-adrenergic receptor regulation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.14, p.334 –348, 1997.

WHEATON, J.E.; AL-RAHEEM, S.N.; MASSRI, Y.G.; MARCEK, J.M. Twenty-four-hour growth hormone profiles in Angus steers. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1267-1272, 1986.

WILLOUGHBY, J.O.; CHAPMAN, I.M.; KAPOOR, R. Local hypothalamic adrenoceptor activation in rat: alpha 1 inhibits and alpha 2 stimulates growth hormone secretion. **Neuroendocrinology**, v. 57, p.687-692, 1993.

WILSON, M.E.; GORDON, T.P.; RUDMAN, C.G.; TANNER, J.M. Effects of growth hormone on the tempo of sexual maturation in female rhesus monkeys. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.68, p.29-38, 1989.

YANG, S.N.; LU,F.; WU, J.N.; LIU, D.D.; HSIEH, W.Y. Activation of gonadotropin-releasing hormone receptors induces a long-term enhancement of excitatory postsynaptic currents mediated by ionotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v.260, p.33-36, 1999.

YELICH, J.V.; WETTEMANN, R.P.; DOLEZAL, H.G.; LUSBY, K.S.; BISHOP, D.K.; SPICER, L.J. Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, p.2390-2405, 1995.

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

ZEEV, B. Growth hormone – A Gonadotropin? Its role in ovulation induction. **Journal of in vitro fertilization and embryo transfer**, v. 8, 1991.

APÊNDICE

