

Participação da via alfa-2 adrenérgica no controle da secreção do hormônio do crescimento no período pré-púbere em novilhas da raça Nelore

Participation of the pathway alfa-2: adrenergic in the control of growth hormone secretion in the pre-puberty period of the Nelore heifers

Emiliana de Oliveira Santana BATISTA¹; Daniel CARDOSO²; Guilherme de Paula NOGUEIRA¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba – SP, Brasil

²Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Extremo Oeste, Araçatuba – SP, Brasil

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar a variação na secreção de GH em resposta ao tratamento com clonidina, agonista alfa-2 adrenérgico, no período pré-púbere de novilhas da raça Nelore, e desta forma obter informações neuroendócrinas envolvidas no processo de maturação sexual destes animais. A administração de clonidina (10 µg/kg, I.V., amostras 15 min por 4 h) foi feita nas novilhas aos oito (n = 4), 12 (n = 5) e 15 meses de idade (n = 4). A concentração de GH foi quantificada por radioimunoensaio (sensibilidade = 0,25 ng/mL, CV = 16%). Aos oito meses, a administração do estimulador alfa-2 adrenérgico aumentou a concentração de GH, área total de picos, área total de secreção de GH e amplitude do maior pico e reduziu o tempo para aparecimento de pico (P < 0,05). A administração de clonidina aumentou a concentração de GH aos 15 meses, e aos 12 meses, em intervalos restritos (P < 0,05). O uso da clonidina estimulou a secreção de GH em novilhas Nelore pré-púberes. Este efeito foi mais evidente nas novilhas aos oito meses, comparado aos 12 e 15 meses de idade.

Palavras-chave: Nelore. Pré-puberdade. GH. Clonidina.

Abstract

This study investigated GH secretion after clonidine (alpha-2 adrenergic agonist) treatment in pre-pubertal Nelore heifers. Clonidine (10 mg/kg, IV, 15 min samples for 4 h) was administered in the same Nelore heifers at eight (n = 4), 12 (n = 5) and 15 (n = 4) months of age. The GH concentration was measured by radioimmunoassay (sensitivity = 0.25 ng/mL, CV = 16%). At eight months, clonidine increased GH average concentration, total area of peaks, the total area of GH secretion and increased peak amplitude and reduced time to onset of peak (P < 0.05). At 15 months, the administration of clonidine increased the GH average concentration and at 12 months the increased occurred only in restricted intervals (P < 0.05). Clonidine injection stimulated GH secretion in prepubertal heifers and this effect was more evident in Nelore heifers at eight months compared to 12 and 15 months of age.

Keywords: Nelore. Prepubertal. GH. Clonidine.

Introdução

A idade, a puberdade, raça e composição genética são características importantes que influenciam um sistema de produção¹. Sabe-se que o início da puberdade está fisiologicamente ligado à nutrição e à condição corporal, embora se desconheça a maneira exata como essa ligação ocorre². O hormônio do crescimento (GH), por ser um hormônio metabólico e ter papel fundamental nas diferentes fases de crescimento³, provavelmente possa estar envolvido.

Em novilhas imunizadas para hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), foi observa-

da uma redução na concentração de GH e atraso na puberdade⁴. Mudanças na concentração e amplitude

Correspondência para:

Guilherme de Paula Nogueira
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária
Laboratório de Endocrinologia Animal
Departamento de Apoio e Produção Animal (DAPSA)
Rua Clóvis Pestana, 793. Bairro: Dona Amélia,
CEP: 16050-680, Araçatuba – S.P.
e-mail: gpn@fmva.unesp.br, emilianamili@hotmail.com,
danielcardoso@apta.sp.gov.br

Recebido: 18/02/2011

Aprovado: 10/08/2011

de pulsos de GH foram observadas no período pré-púbere de novilhas⁵, búfalas⁶ e ratas⁷, sugerindo que este hormônio tenha um papel no desenvolvimento pubertal nestes animais.

Durante a maturação sexual na novilha, ocorrem alterações nas respostas a neurotransmissores excitatórios e inibitórios, relacionadas com a idade e com a disponibilidade de energia no meio interno⁸. Entre os sistemas neuroendócrinos que envolvem a ação de neurotransmissores sobre a secreção de GH, a participação do sistema adrenérgico controlando a secreção deste hormônio tem sido relatada em bovinos^{9,10,11}. Há evidências, que a indução alfa-2-adrenérgica regule a secreção de GH por 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 média¹².

Para testar em novilhas da raça Nelore, a hipótese de que a secreção de GH é estimulada pelo sistema alfa-2-adrenérgico, verificou-se a secreção de GH em resposta a administração de clonidina (agonista alfa-2-adrenérgico) no período pré-púbere desses animais.

Material e Método

Foram utilizadas dez novilhas da raça Nelore, oriundas de um rebanho comercial. Aos seis meses, pós-desmame, estas foram levadas para o Campus da faculdade 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 clonidina (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US, C7897) – um agonista específico de receptor -2-adrenérgico – foi utilizada na dose de 10 µg/kg, por via intravenosa. A coleta de sangue foi realizada por um período de 4 h pós-tratamento e uma hora antes deste, em intervalos de 15 min⁹, aos oito, 12 e 15 meses de idade.

No dia anterior à administração da clonidina, a jugular das novilhas foi canulada, para permitir a coleta seriada de amostras de sangue. 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*.

O sangue coletado foi depositado em tubos de vidro (10 mL) contendo 200 µl de EDTA a 10%. Os tubos foram então transportados em caixas de isopor refrigeradas até o laboratório, centrifugados a 3000 x g por 15 minutos, a 4 °C. Posteriormente, o plasma de cada amostra foi transferido, com auxílio de pipetas Pasteur descartáveis, para os respectivos microtubos graduados (Scientific Specialties Inc) de 2 mL de capacidade. Os microtubos contendo plasma foram acondicionados a -20 °C até a realização do radioimunoensaio (RIA), para a dosagem de GH.

As novilhas (n = 10) foram distribuídas em dois grupos com cinco animais cada: Grupo Controle - novilhas que receberam solução salina 0,9% e Grupo Clonidina - novilhas que receberam 10 µg/kg de clonidina. Alguns grupos ficaram com número menor de animais devido a problemas com obstrução da cânula: oito meses – grupo clonidina (n = 4), grupo controle (n = 4); 12 meses – grupo clonidina (n = 4), grupo solução salina (n = 5), 15 meses – grupo clonidina (n = 5), grupo solução salina (n = 4).

O RIA para GH bovino foi realizado de acordo com o protocolo e reagentes fornecidos 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). O coeficiente de variação intraensaio e interensaio e a sensibilidade dos ensaios ficou em 15%, 17% (15 ng/mL) e 0,25 ng/mL, respectivamente. A porcentagem de ligação variou de 25 a 30%.

Para identificação dos picos, área de secreção de GH, 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 pós-

-tratamento (ng/mL) foi a média dos valores do período pós-infusão. Os picos foram identificados como aumento maior que duas vezes o coeficiente de variação intraensaio envolvendo pelo menos três pontos consecutivos das dosagens. O programa calculou a área sob a curva e 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 de Duncan, no nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A concentração média de GH pós-infusão de clonidina aos oito 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 $2,66 \pm 0,86$ ng/mL; $13,03 \pm 1,08$ vs $3,13 \pm 1,28$ ng/mL; $9,53 \pm 1,99$ vs $2,76 \pm 1,34$ ng/mL; $9,35 \pm 2,95$ vs $2,16 \pm 1,34$ ng/mL; $P < 0,05$, Figura 1).

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

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 (Figura 1).

A comparação dos valores médios da concentração de GH durante todo período de coleta entre o grupo Clonidina e o grupo Controle mostrou que o grupo Clonidina possuía maior concentração aos oito meses

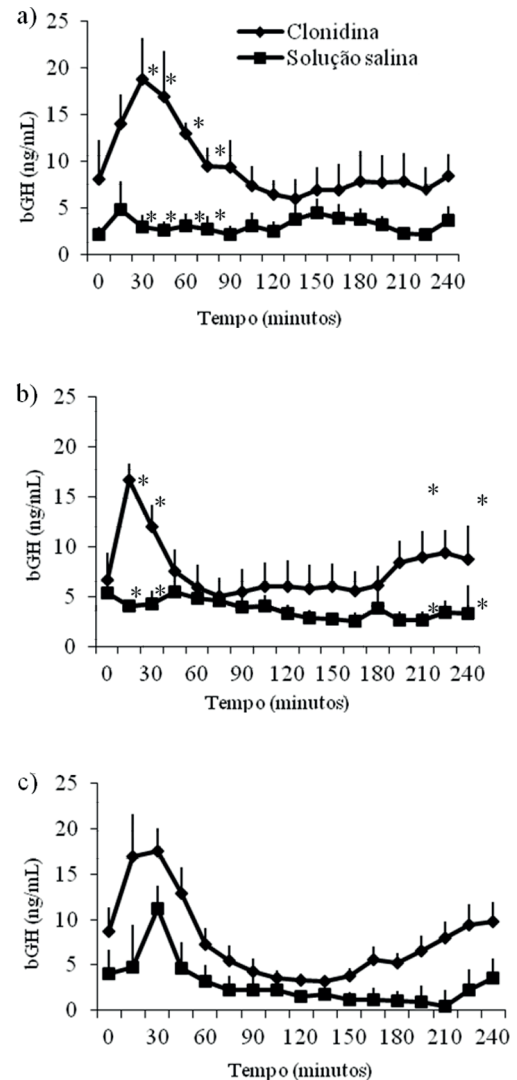


Figura 1 - Variação na concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados, média \pm EPM) de novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$, IV) ou solução salina 0,9%: a) aos oito meses; b) aos 12 meses e c) aos 15 meses. * Sinaliza diferença estatística ($P < 0,05$) pelo Teste de Duncan

($9,63 \pm 0,79$ 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; $P = 0,1245$; Figura 2).

Aos 15 meses de idade, embora não tenha sido encontrada diferença na concentração de GH entre grupo Clonidina e grupo Controle em intervalos es-

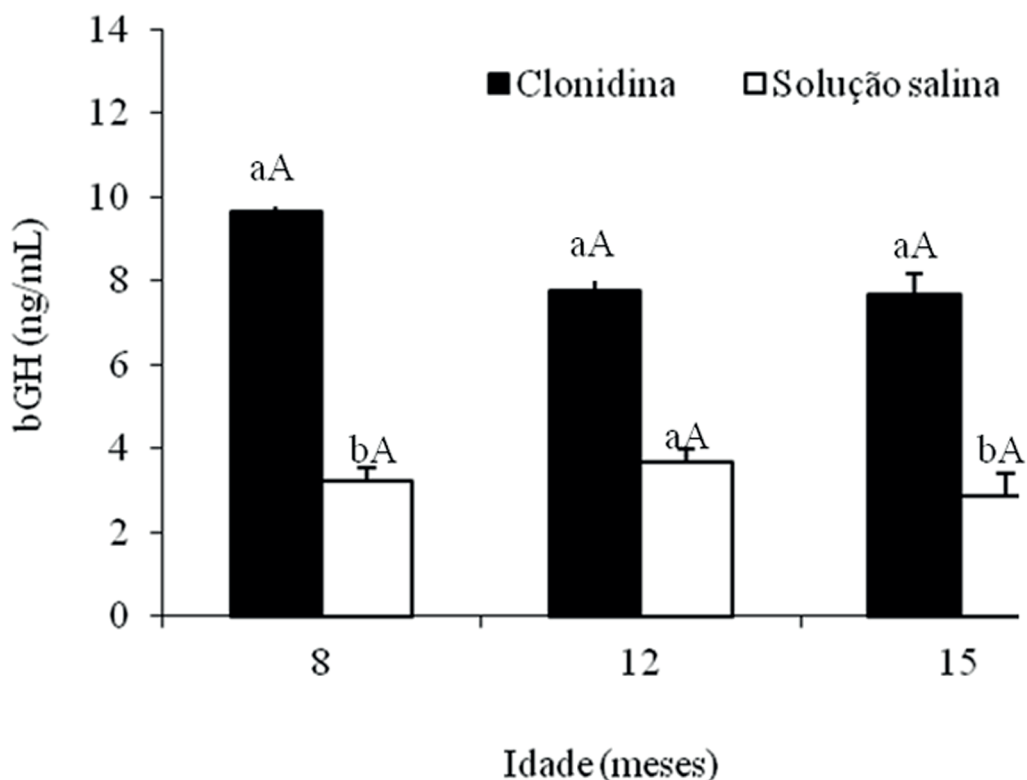


Figura 2 - Concentração média de GH (ng/mL, valores não transformados, Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.) ou solução salina aos oito, 12 e 15 meses. Letras maiúsculas diferentes sinalizam diferença entre os meses de um mesmo grupo, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes sinalizam diferença entre os grupos dentro de um mês, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)

pecíficos (Figura 1), 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 mg/mL), 30 (17,52 \pm 2,98 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; $P = 0,5269$; Figura 2).

O grupo Clonidina aos oito meses apresentou maior área total de picos (425,6 \pm 89,41 vs 139,4 \pm 31,27 ng/mL (min), $P = 0,0390$; Figura 3), quando comparado ao grupo controle e maior área total de secreção de

GH (866,1 \pm 172,61 vs 344,5 \pm 99,09 ng/mL (min), $P = 0,0485$; Figura 3).

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

Em relação ao tempo para aparecimento do primeiro pico, o grupo Clonidina aos oito meses apresentou um menor tempo para aparecimento de pico comparado ao grupo Controle (26 \pm 7 vs 145 \pm 5,2 minutos, $P = 0,0424$, Figura 3). Quanto ao número de picos não foi observada diferença entre os grupos nos períodos avaliados ($P > 0,05$; Figura 4).

No presente estudo, o estímulo alfa-2-adrenérgico sobre a concentração de GH foi predominantemente

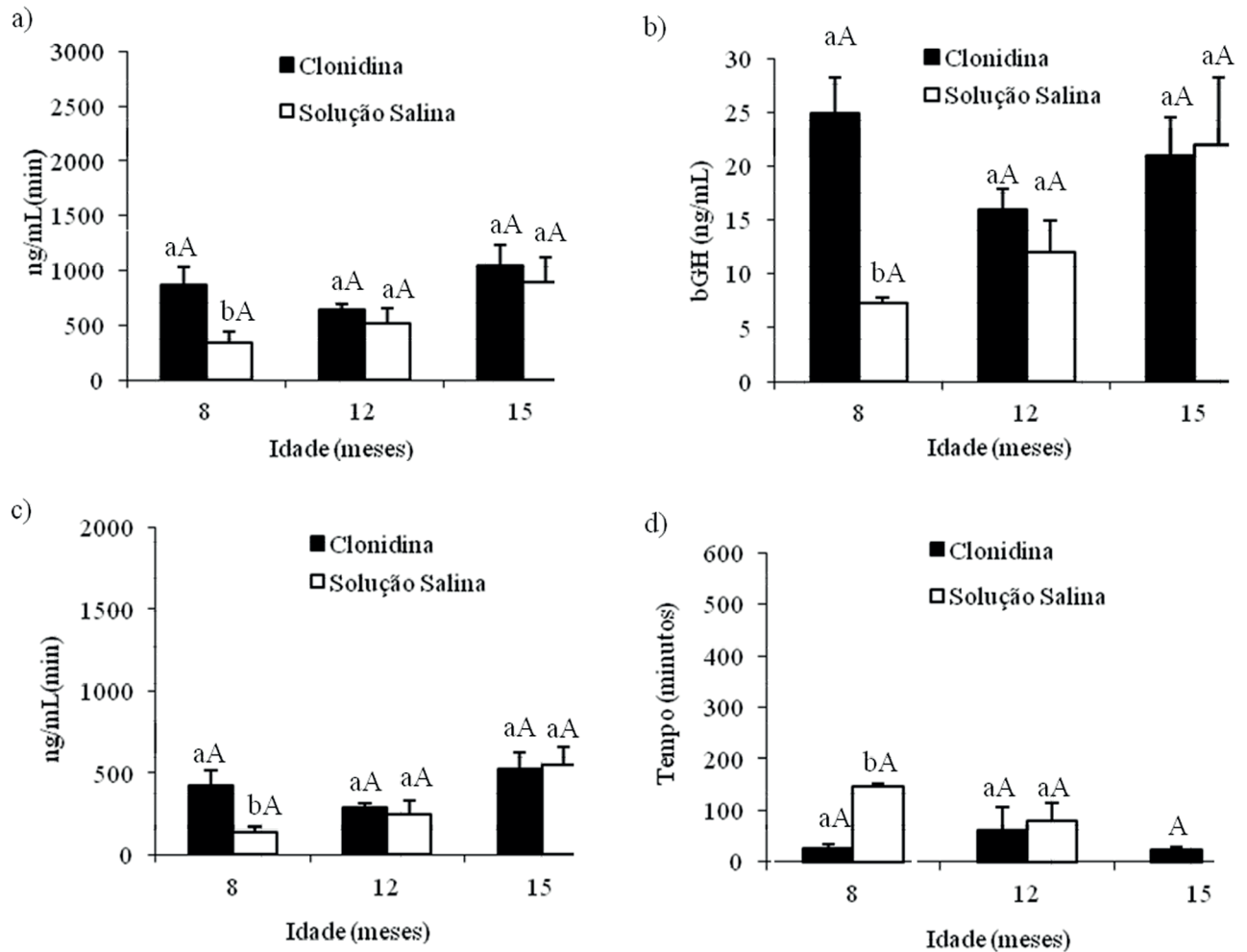


Figura 3 - (a) Área total de secreção de GH [ng/mL(min); média ± EPM], (b) amplitude máxima de picos de secreção de GH [ng/mL; média ± EPM], (c) área total de picos de secreção de GH [ng/mL (min); média ± EPM], (d) tempo para ocorrência do primeiro pico (min; média ± EPM); valores não transformados, em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 µg/kg, I.V.) ou solução salina 0,9% aos oito, 12 e 15 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 ($P < 0,05$)

estimulatório aos oito, 12 e 15 meses de idade em novilhas Nelore.

A clonidina estimulou a secreção de GH em ratos¹³ e em bezerros¹⁰. Em bovinos, foi observado que o estímulo da secreção de GH via receptores alfa-2-adrenérgico ocorreu por um aumento na liberação de GHRH, sem afetar a liberação de somatostatina¹⁴.

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 oito meses. Nas novilhas aos 12 me-

ses, foi observada essa diferença aos 15, 30, 210 e 240 min. (Figura 1). 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 holandesas⁹.

Embora aos 15 meses de idade, não tenha sido observada diferença na concentração de GH entre os grupos Clonidina e Controle dentro dos intervalos de tempo (com 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

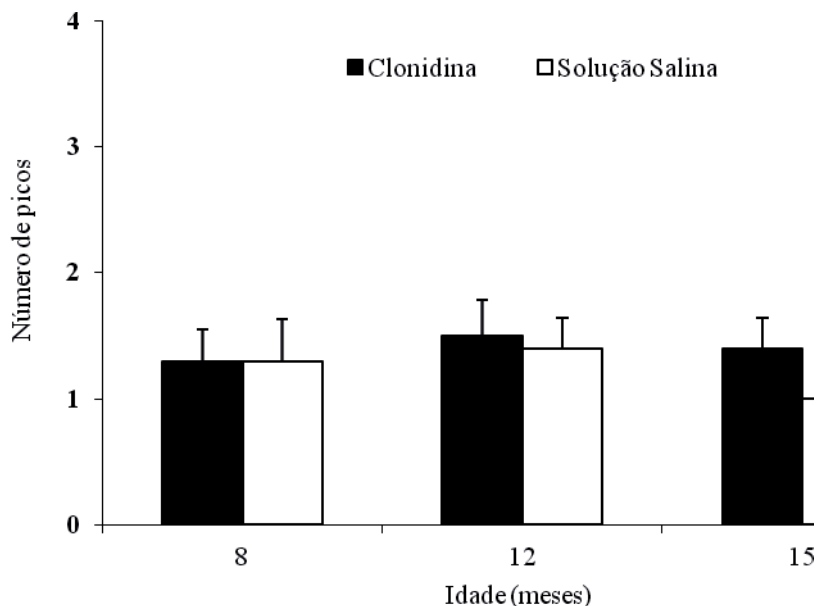


Figura 4 - Número de picos de secreção de GH (valores não transformados, Média \pm EPM) em novilhas Nelore pré-púberes que receberam clonidina (10 μ g/kg, I.V.) ou solução salina 0,9% aos oito, 12 e 15 meses

promoveu um aumento na concentração de GH assim como observado aos oito e 12 meses.

A meia-vida da clonidina está em torno de 12 h. 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 consequência da secreção de hormônio armazenado em grânulos. E o aumento de 210 e 240 min pode ser resultado da síntese de nova proteína, provocando um padrão bifásico de liberação de GH. Os neurotransmissores além de regular a secreção de GH podem também regular a expressão de mRNA para GH e desta forma afetar síntese do hormônio¹⁵.

Bezerros hipoglicêmicos responderam mais à clonidina (aumentando a concentração de GH) que bezerros recém-alimentados¹⁰. Estudos com agonistas e antagonistas sugerem que os receptores alfa-2-adrenérgicos sejam mais importantes na liberação de GH durante a hipoglicemia¹⁶. 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 de clonidina aumentou a concentração de GH nos períodos avaliados.

Nas novilhas Nelore, a média de tempo necessário para aparecimento de pico foi de 32 min., após a aplicação da clonidina (10 μ g/kg, I.V.), porém 54% dos animais apresentaram um pico nos primeiros 15 min após clonidina. Foi observado que a infusão 20 μ g/kg, I.V. de clonidina aumentou a concentração de GH após 10 min¹¹, próximo do momento encontrado nas novilhas Nelore neste estudo.

Foi observado aumento na área total de picos e na área de secreção de GH aos oito 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 oito 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 comparada 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 oito meses de idade aumentou a concentração de GH aos oito meses e 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.

O uso de clonidina (agonista alfa-2-adrenérgico) estimulou a secreção de GH em novilhas Nelore pré-púberes. Este efeito foi mais evidente nas novilhas mais novas (oito meses) quando comparado as mais velhas (12 e 15 meses de idade), sugerindo uma variação temporal do sistema alfa - 2 - adrenérgico na regulação de secreção de GH.

Referências

- CARDOSO, D.; PEIRÓ, J. R.; NOGUEIRA, G. P. Concentração de LH em novilhas da raça Nelore da desmama à primeira ovulação. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1277-1284, 2009.
- CHEUNG, C. C.; THORNTON, J. E.; KUJIPER, 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, n. 2, p. 855-858, 1997.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. **Harper: bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 1990. 798 p.
- 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, n. 12, p.4914-4924, 1991.
- 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, n. 8, p.2390-2405, 1995.
- HALDAR, A.; PRAKASH, B. S. Peripheral patterns of growth hormone, luteinizing hormone, and progesterone before, at, and after puberty in buffalo heifer. *Endocrine Research*, v. 31, n. 4, p. 295-306, 2005.
- OJEDA, S. R.; JAMESON, H. E. Developmental patterns of plasma pituitary growth hormone (GH) in the female rat. *Endocrinology*, v. 100, n. 3, p. 881-889, 1977.
- 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, n. 3/4, p.259-270, 2003.
- 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. 146, n. 2, p. 271-277, 1995.
- 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, n. 3, p. 318-322, 1993.
- GOREWIT, R. C. Pituitary thyroid and adrenal response to clonidine in dairy cattle. *Journal of Endocrinology and Investigation*, v. 4, n. 2, p. 135-139, 1981.
- 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, n. 2, p. 65-87, 2001.
- WILLOUGHBY, J. O.; CHAPMAN, I. M.; KAPOOR, R. Local hypothalamic adrenoreceptor activation in rat: alpha 1 inhibits and alpha 2 stimulates growth hormone secretion. *Neuroendocrinology*, v. 57, n. 4, p. 687-692, 1993.
- 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. Alfa - 2 - adrenergic receptor regulation. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 14, n. 5, p. 334-348, 1997.
- 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, n. 1, p. 26-33, 1994.
- TATÁR, 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, n. 3, p. 275-280, 1984.