DANIEL DE JESUS CARDOSO DE OLIVEIRA

**Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na
puberdade de novilhas da raça Nelore**

São Paulo

2006

DANIEL DE JESUS CARDOSO DE OLIVEIRA

Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas da raça Nelore

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1781
FMVZ

Oliveira, Daniel de Jesus Cardoso de
Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas da
raça Nelore / Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira. – São Paulo: D. J. C.
Oliveira, 2006.
188 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira.

1. Nelore. 2. LH. 3. Puberdade. 4. GABA. 5. Dopamina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do tratamento com neurotransmissores na secreção de LH em novilhas nelore pré-púberes", Protocolo nº451/2004, utilizando 18 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effect of neurotransmitters treatment on LH secretion in pre-pubertal Nelore heifers", protocol number 451/2004, utilizing 18 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 29 de julho de 2004

Prof.^a Dr.^a Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Daniel de Jesus Cardoso de

Título: Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas da
raça Nelore

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Este trabalho foi desenvolvido nas seguintes instituições:

- ✓ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP);
- ✓ Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Araçatuba;

Dedico este trabalho

**À minha esposa Maria Fernanda, pela paciência,
compreensão, amor e carinho;**

**Aos meus pais Francisco e Dalva,
alicerces da minha vida;**

Ao meu orientador científico

Guilherme de Paula Nogueira,

Exemplo de profissionalismo, dedicação e integridade.

Um amigo.

Um amigo é uma pessoa com a qual se pode pensar em voz alta

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, SP, dando-me a oportunidade de crescimento pessoal e profissional;
- ✓ Ao Prof. Dr. José Antônio Visintin, ter me aceito inicialmente como seu orientado;
- ✓ À Agropecuária CFM, pela venda dos animais;
- ✓ Sr. Hodney, por compreender a necessidade do experimento, disponibilizando animais para venda;
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Juliana Regente Peiró, pela amizade, capacidade e dedicação em contribuir com a ovariectomia das novilhas utilizadas no experimento;
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Venturoli Perri, pela contribuição nas análises estatísticas;
- ✓ Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, por possibilitar meu estágio docência referente ao programa PAE;
- ✓ Ao amigo e companheiro Fabio Ferreira Guerra, exemplo de humildade e companheirismo;
- ✓ Ao amigo Gustavo Arbex Avelar (Turco), por ter sempre me incentivado a fazer o doutorado;
- ✓ Nelcio Antonio Tonizza, por ter me acolhido em sua república e se tornado um grande amigo;
- ✓ À Harumi, pela amizade e eficiência em sempre resolver os problemas burocráticos relacionados à pós-graduação e desenvolver seu trabalho de forma tão competente;
- ✓ À todos os funcionários e professores do VRA;
- ✓ À Dezanir, por ter contribuído nas análises laboratoriais;
- ✓ Fernando (confinamento), Lucas, Gian e Javan, pela ajuda no manejo e coleta de material dos animais;
- ✓ Natália e Maria Paula, companheiras de laboratório;
- ✓ Ao Eng. Agr. Nelson Bortoletto, diretor do Pólo Regional de Desenvolvimento do Noroeste Paulista, Apta, Votuporanga, SP, por ter me

liberado uma vez por semana para que minha tese de doutorado fosse concluída;

- ✓ À minha irmã Conceição e meu cunhado Christian por me hospedarem em sua residência;
- ✓ Giane, Solidete, Fabiana Maldonado, Fabiana Garcia e Rogério por contribuírem com sugestões e correções na elaboração da tese;
- ✓ Aos amigos Sérgio (Índio), Marcos (Bunda), Zanon e Torres, companheiros de república;
- ✓ Ao Prof. Geraldo Pinto, pela correção ortográfica;
- ✓ CAPES, pela bolsa de estudo;

Muito obrigado.

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.

Não só na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

Os donos do futuro, as pessoas que valem a pena, são aquelas que olham para frente. Sabem que o pior da vida não é ser infeliz, pois ainda é possível lutar, ter um sonho e esperá-lo um dia realizá-lo. O pior da vida é ser acomodado, é nunca ter perdido uma batalha impossível, é nunca ter arriscado nem ousado.

Roberto Shinyashiki

RESUMO

OLIVEIRA, D. J. C. **Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas da raça Nelore**. [Neuroendocrine mechanisms evolved in Nellore Heifer's puberty]. 2006. 188 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O presente trabalho teve por objetivo investigar a variação na secreção de LH em resposta ao tratamento com neurotransmissores, na presença ou não de esteróides gonadais e desta forma gerar informações sobre os mecanismos neuroendócrinos envolvidos na maturação sexual de novilhas da raça Nelore. A concentração de LH foi quantificada por radioimunoensaio e as novilhas ovariectomizadas (OVX) apresentaram maior concentração basal de LH ($P \leq 0,05$), que as novilhas inteiras (INT). A administração de um antagonista gabaérgico (picROTOXINA, 0,18 mg/kg, iv, amostras 15 min por 10 h) aos 8, 10, 14 e 17 meses de idade, aumentou ($P \leq 0,05$) a concentração média e área total de secreção de LH nas novilhas INT tratadas aos 14 meses, a área total dos picos e área do maior pico de secreção de LH foi maior ($P \leq 0,05$) nas novilhas OVX aos 14 e 17 meses de idade. A administração de um antagonista dopaminérgico (sulpiride, 0,59 mg/kg, sc, amostras 15 min por 10 h) aos 8, 12 e 16 meses de idade diminuiu ($P \leq 0,05$) a secreção de LH (concentração média, área total, área total dos picos e área do maior pico secreção de LH) nas novilhas OVX aos 8 meses de idade. A administração de um estimulador alfa-adrenérgico (clonidina, 10 µg/kg, iv, amostras 15 min por 4 h) aos 8, 12 e 15 meses de idade, diminuiu ($P \leq 0,05$) o número de picos nas novilhas OVX com 8 meses de idade. A administração do 17β-estradiol (2 µg/kg, iv, amostra 15 min por 3 h, 1 h por 7 h e 3 h por 22 h) aos 10, 13 e 17 meses de idade diminuiu a diferença ($P \geq 0,05$) entre os grupos OVX e INT em relação ao número de picos, área total de picos, área do maior pico e tempo necessário para acontecer o maior pico. Foi avaliada a secreção de LH da desmama à primeira ovulação em novilhas INT e OVX. A concentração de LH aumentou durante a maturação sexual, tanto nas novilhas INT quanto nas OVX. O número de picos de secreção de LH e amplitude máxima de secreção de LH foi maior ($P \leq 0,05$) nas novilhas OVX com o aproximar da primeira ovulação. Os resultados indicam uma diminuição da sensibilidade do hipotálamo aos esteróides gonadais durante o processo de maturação sexual nas novilhas da raça Nelore e a participação

alternada de neurotransmissores, inibindo e estimulando a secreção de LH. Concluimos que, em novilhas pré-púberes da raça Nelore o desenvolvimento da retroalimentação positiva aos esteróides gonadais no hipotálamo foi importante para aumentar a secreção de LH antes da primeira ovulação, com a participação de neurotransmissores estimulando ou inibindo a secreção de LH.

Palavras-chave: Nelore, LH, Puberdade, GABA, Dopamina.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D. J. C. **Neuroendocrine mechanisms evolved in Nelore Heifer's puberty.** [Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas da raça Nelore]. 2006. 188 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The variation on LH secretion after neurotransmitter administration, on the presence or absence of gonadal steroid, was investigated, generating information about the mechanisms evolved on sexual maturation in Nelore heifers. LH concentration was quantified by RIA. As expected ovariectomized heifers higher basal LH concentration ($P \leq 0,05$) than intact heifers. The picrotoxin administration (GABA antagonist, 0,18 mg/kg, iv, samples 15 min for 10 h) at 8, 10, 14 and 17 months of age increased ($P \leq 0,05$) average concentration and total secretion area on intact treated heifers at 14 months and peak total area and area of highest peak on ovariectomized heifers at 14 and 17 months of age. The dopaminergic antagonist (sulpiride, 0.59 mg/kg, sc, sample 15 min for 10 h) administrated at 8, 12 and 16 months of age decreased ($P \leq 0,05$) LH secretion (average levels, total peak area and area of the highest secretion peak) on ovariectomized heifers at 8 months of age. The administration of an alfa-adrenérgic stimulatory (clonidine 10 μ g/kg, iv, samples 15 min for 4 h) at 8, 12 and 15 months of age decreased ($P \leq 0,05$) decreased the number of peaks at 8 months of age. 17 β -estradiol administration (2 μ g/kg, iv, samples every 15 min for 3 h, every 1 h for 7 h and every 3 h for 22 h) decreased the differences between ovariectomized and intact heifers on number of peaks, total peak area, highest peak area and time to highest peak occurrence. The LH secretion from weaning to first ovulation in non treated intact and ovariectomized heifers was also evaluated. LH concentration increase during sexual maturation in both ovariectomized and intact heifers. The number of peaks, and maximum LH secretion amplitude was higher in ovariectomized heifer closest to first ovulation, when compared to intact heifers. The results suggested a decrease on hypothalamus sensitivity to gonadal steroid during the sexual maturation in Nelore heifer associated with neurotransmitter participation either stimulating or inhibiting LH secretion. It was possible to conclude that the decrease of negative feedback associated with the increase on positive feedback of gonadal steroids over hypothalamus was necessary

to increase LH secretion before first ovulation, that was associated with neurotransmitter participation on LH secretion.

Key words: Puberty, Nellore, Heifer, LH, GABA, Dopamine, Adrenergic, Estradiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos neuroendócrinos modulando a secreção de GnRH no hipotálamo na novilhas.....	40
Figura 2 -	Momento antecedendo o início da cirurgia. Bezerra em decúbito lateral direito.....	52
Figura 3 -	Incisão da pele no sentido dorso-ventral.....	53
Figura 4 -	Hemorragias subcutâneas pinçadas.....	53
Figura 5 -	Procedimento de localização do útero e ovários.....	54
Figura 6 -	Incisão lateral acompanhada da retirada ovariana.....	54
Figura 7 -	Ovários retirados após a cirurgia.....	55
Figura 8 -	Sutura da musculatura.....	55
Figura 9 -	Punção da veia jugular e inserção da cânula de silicone no interior da agulha 12 GA.....	56
Figura 10 -	Bolsa de curvim com finalidade de proteger a cânula.....	57
Figura 11 -	Coleta sangüínea enquanto o animal estava se alimentando.....	59
Figura 12 -	Delineamento de aplicação dos tratamentos e do período de coleta de amostras durante o experimento 1.....	67
Figura 13 -	Concentração de LH (Média $\pm$ EPM) de amostras colhidas a cada 15 min por 10 hs pós-aplicação de solução salina a 0,9% (inteiras – IS) e picrotoxina (inteiras – IP e ovariectomizadas – OvP) em novilhas pré-púberes da raça Nelore em diferentes idades.....	70
Figura 14 -	Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n= 4; 3; 4; 4) que receberam solução salina 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg de picrotoxina em diferentes idades.....	71

Figura 15 -	Área total de secreção LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg de picrotoxina em diferentes idades.....	72
Figura 16 -	Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg de picrotoxina em diferentes idades.....	73
Figura 17 -	Número de picos de secreção de LH (valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina em diferentes idades.....	74
Figura 18 -	Área do maior pico de secreção de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina em diferentes idades.....	75
Figura 19 -	Amplitude máxima dos picos de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina em diferentes idades.....	76
Figura 20 -	Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina em diferentes idades.....	77
Figura 21 -	Delineamento de aplicação dos tratamentos utilizados no experimento 2.....	85

Figura 22 -	Médias e erro padrão da média da concentração de LH de amostras colhidas a cada 15 min por 10 h pós-aplicação do Sulpiride em dois grupos de novilhas (inteiras – IS e ovariectomizadas - OvSS) e solução salina a 0,9% (inteiras – IS), com 8, 12 e 16 meses de idade.....	88
Figura 23 -	Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média± EPM) pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	89
Figura 24 -	Área total da concentração de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média ± EPM) em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	90
Figura 25 -	Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média ± EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	91
Figura 26 -	Número de picos de secreção de LH (ng/mL, valores não transformados; Média ± EPM) no período pós-tratamento em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	93
Figura 27 -	Área do maior pico de secreção de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média ± EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	94
Figura 28 -	Amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média ± EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	95
Figura 29 -	Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de LH (min, valores não transformados; Média ± EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride em diferentes idades.....	96

Figura 30 -	Delineamento de aplicação dos tratamentos utilizados no experimento 3.....	104
Figura 31 -	Concentração de LH (Média $\pm$ EPM) de amostras colhidas a cada 15 min por 4 h pós-aplicação da solução salina a 0,9% (inteiras salina - IS) e da Clonidina a 10 μ g/kg em dois grupos de novilhas (inteiras – ICL e ovariectomizadas - Ov - OvCL) aos 8, 12 e 15 meses de idade. A seta indica o momento da aplicação da salina ou clonidina.....	107
Figura 32 -	Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades.....	108
Figura 33 -	Área total de secreção de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) de novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades.....	109
Figura 34 -	Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades.....	111
Figura 35 -	Número de picos de secreção de LH (valores não transformados; Mediana) no período pós-tratamento em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades.....	112
Figura 36 -	Área do maior pico de secreção LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Neloire pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades.....	113
Figura 37 -	Amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades.....	114

Figura 38 -	Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina em diferentes idades..	115
Figura 39 -	Delineamento com o tratamento e a freqüência de coleta das amostras de sangue utilizadas no experimento 4.....	122
Figura 40 -	Concentração de LH (média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (I; n=5) e ovariectomizadas (Ov; n=5), após a administração do 17 β -estradiol aos 10, 13 e 17 meses de idade...	125
Figura 41 -	Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	126
Figura 42 -	Área total de secreção de H (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	127
Figura 43 -	Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n= 5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	128
Figura 44 -	Número de picos de secreção LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	129
Figura 45 -	Área do maior pico de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	130
Figura 46 -	Variação na amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	131

Figura 47 -	Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol em diferentes idades.....	132
Figura 48 -	Variação na concentração de LH plasmática (média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes Inteiras (n=10) e Ovariectomizadas (n=5) até o 19º mês de idade. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas. As amostras foram colhidas a cada 4 dias e os valores após a primeira ovulação foram excluídos.....	141
Figura 49 -	Número de picos de secreção LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina 0,9% em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.....	143
Figura 50 -	Número de picos de secreção LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes ovariectomizadas (OvS; n=5) que receberam salina 0,9% em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.....	144
Figura 51 -	Variação na amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina 0,9% em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.....	145
Figura 52 -	Variação na amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Neloires pré-púberes ovariectomizadas (OvS; n=5) que receberam salina 0,9% em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.....	146
Figura 53 -	Número de novilhas inteiras (n=10) que ovularam em função da idade. A idade a primeira ovulação foi determinada em função da concentração plasmática de progesterona (acima de 1 ng/mL). Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.....	147
Figura 54 -	Desenho esquemático dos sinais neuronais regulando a secreção de GnRH em novilhas da raça Nelore durante o processo de maturação sexual.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constante para cálculo da taxa metabólica basal (MEC).....	61
Tabela 2 -	Comparação da concentração de LH (ng/ml) entre novilhas Nelore pré-púberes Inteiras (n=10) e Ovariectomizadas (n=5). As amostras foram colhidas a cada 4 dias, os valores agrupados e comparados entre os meses de idade. Os dados após a primeira ovulação não foram considerados.....	142

LISTA DE ABREVIATURAS

GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
E ₂	17β-estradiol
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
SNC	Sistema Nervoso Central
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
GABA _A	Tipo de receptor (A) que o GABA irá atuar
GABA _B	Tipo de receptor (B) que o GABA irá atuar
Min	Minutos
Hs	horas
SID	Uma única aplicação
12 GA	12 Gauge
NaCl 0,9%	Cloreto de Sódio a 0,9%
MEC	Taxa metabólica basal
SMEC	Custo energético específico mínimo
K	Constante
IS	Novilhas inteiras que receberam salina 0,9%
IP	Novilhas inteiras que receberam picrotoxina
OvP	Novilhas ovariectomizadas que receberam picrotoxina
ISS	Novilhas inteiras que receberam dopamina
OvSS	Novilhas ovariectomizadas que receberam dopamina
ICI	Novilhas inteiras que receberam clonidina
OvCI	Novilhas ovariectomizadas que receberam clonidina
IE	Novilhas inteiras que receberam 17β-estradiol
OvE	Novilhas ovariectomizadas que receberam 17β-estradiol
LC	Locus ceruleus
GH	Hormônio do crescimento
PRL	Prolactina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	REBANHO BRASILEIRO.....	32
2.1.1	Produtividade das fêmeas	32
2.1.2	Efeito do cruzamento	33
2.2	FISIOLOGIA NEUROENDÓCRINA DA PUBERDADE.....	34
2.2.1	Secreção de gonadotrofinas durante a puberdade	35
2.2.2	Mecanismos neuroendócrinos de contenção da atividade gonadal	36
2.2.3	Mecanismos neuroendócrinos de secreção de gonadotrofinas	37
2.2.4	Sistemas gabaérgico, dopaminérgico e alfa-adrenérgico	38
2.3	PUBERDADE EM NOVILHAS ZEBU.....	41
2.3.1	Aspectos fisiológicos	41
2.3.2	Nutrição e manejo	42
2.4	CONCLUSÕES.....	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4	HIPÓTESE	47
5	MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1	GENERALIDADES.....	50
5.1.1	Ovariectomia	50
5.1.2.	Canulação da veia jugular	56
5.2	SISTEMA ALOMÉTRICO PARA TRANSPOSIÇÃO DE DOSES...	59
5.2.1	Uso, características e definições	60

5.2.2	Utilidades.....	61
5.2.3	Fórmulas.....	61
5.2.4	Detalhes importantes.....	62
5.3	RADIOIMUNOENSAIO PARA GONADOTROFINAS.....	63
5.4	IDENTIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	63
6	EXPERIMENTO 1: ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO NO BLOQUEIO DA SECREÇÃO DE LH EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES.....	65
6.1	JUSTIFICATIVA.....	65
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
6.2.1	Animais e manejo.....	65
6.2.2	Ovariectomia e canulação.....	66
6.2.3	Administração de neurotransmissor e coleta de sangue.....	66
6.2.4	Delineamento Experimental.....	67
6.2.5	Radioimunoensaio para gonadotrofinas e coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH.....	68
6.2.5	Identificação das variáveis estudadas e análise estatística....	68
6.3	RESULTADOS.....	69
6.4	DISCUSSÃO.....	77
6.5	CONCLUSÕES.....	82
7	EXPERIMENTO 2: ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NO BLOQUEIO DA SECREÇÃO DE LH EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES.....	83
7.1	JUSTIFICATIVA.....	83
7.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
7.2.1	Animais e manejo.....	84
7.2.2	Ovariectomia e canulação.....	84
7.2.3	Delineamento Experimental.....	84

7.2.4	Administração de neurotransmissor e coleta de material.....	85
7.2.5	Radioimunoensaio para gonadotrofinas e coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH.....	86
7.2.6	Identificação das variáveis estudadas e análise estatísticas..	86
7.3	RESULTADOS.....	87
7.4	DISCUSSÃO.....	96
7.5	CONCLUSÕES.....	100
8	EXPERIMENTO 3: ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADRENÉRGICO NA SECREÇÃO DE LH EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES.....	102
8.1	JUSTIFICATIVA.....	102
8.2	MATERIAL E MÉTODO.....	103
8.2.1	Animais e manejo.....	103
8.2.2	Ovariectomia e canulação.....	103
8.2.3	Administração de neurotransmissor e coleta de material.....	104
8.2.4	Delineamento Experimental.....	104
8.2.5	Radioimunoensaio para gonadotrofinas, coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH.....	105
8.2.6	Identificação das variáveis estudadas e análise estatística....	105
8.3	RESULTADOS.....	106
8.4	DISCUSSÃO.....	115
8.5	CONCLUSÕES.....	119
9	EXPERIMENTO 4: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LH AO LONGO DO TEMPO EM NOVILHAS NELORES PRÉ-PÚBERES APÓS O TRATAMENTO COM O 17β-ESTRADIOL..	120
9.1	JUSTIFICATIVA.....	120
9.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	121
9.2.1	Animais e manejo.....	121

9.2.2	Ovariectomia e canulação.....	121
9.2.3	Administração de neurotransmissor e coleta de material.....	121
9.2.4	Delineamento Experimental.....	122
9.2.5	Radioimunoensaio para gonadotrofinas, coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH.....	123
9.2.6	Identificação das variáveis estudadas e análise estatística....	123
9.3	RESULTADOS.....	124
9.4	DISCUSSÃO.....	132
9.5	CONCLUSÕES.....	136
10	EXPERIMENTO 5: Concentração de LH da desmama a primeira ovulação.....	137
10.1	JUSTIFICATIVA.....	137
10.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	138
10.2.1	Animais e manejo.....	138
10.2.2	Ovariectomia e canulação.....	138
10.2.3	Delineamento Experimental.....	139
10.2.3.1	Coleta a cada 4 dias.....	139
10.2.3.2	Coleta seriada a cada 15 minutos.....	139
10.2.4	Radioimunoensaio para gonadotrofinas e coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH.....	139
10.2.5	Identificação das variáveis estudadas e análise estatística....	140
10.3	RESULTADOS.....	140
10.4	DISCUSSÃO.....	147
10.5	CONCLUSÕES.....	150
11	CONCLUSÕES FINAIS.....	151
	REFERÊNCIAS.....	154
	APÊNDICE.....	174

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com 165 milhões de cabeças, destacando-se não somente pelo tamanho do rebanho, mas também, pelo potencial de crescimento. As exportações de carne bovina brasileira apresentaram de 2000 a 2004, aumento de 194% nos volumes, embarcando em 2004 1,630 milhões de toneladas (equivalente carcaça), acompanhado do aumento da demanda mundial de 5,8 para 6,3 milhões de toneladas (ANUALPEC, 2005). Com estes resultados o Brasil tornou-se o maior exportador mundial de carne bovina, superando a Austrália. Analisando o passado, o presente e as novas tendências de mercado, podemos observar que o Brasil possui os principais componentes para competir internacionalmente entre eles o baixo custo de produção e o domínio tecnológico do processo. A principal raça bovina de corte criada no Brasil é a Nelore, correspondendo a 70% do rebanho brasileiro, podendo ser mantida a pasto com baixo custo de produção. Com o avanço tecnológico e o crescimento no mercado mundial de carne, novas exigências estão surgindo, tais como: melhor qualidade dos produtos e maior segurança alimentar através de certificações sanitárias e de rastreabilidade (PESSUTI; MEZZADRI, 2003).

Apesar dos números e das boas perspectivas, a produtividade do rebanho brasileiro, quando comparada a de países de clima temperado, fica aquém do desejado. A intervenção de componentes políticos, socioeconômicos e culturais, de forma isolada ou em conjunto, contribuem para o baixo desempenho econômico da pecuária bovina brasileira (PEREIRA, 2000). Fatores como forragens de baixa qualidade, alta incidência de doenças infecciosas, parasitárias e nutricionais, insuficiência de programas de melhoramento genético e sistema fundiário ultrapassado, contribuem para os baixos índices de produtividade (VIANA, 1999). A falha na reprodução é um dos fatores mais importantes que limita o desempenho da pecuária de corte brasileira (SILVA, 2005). O baixo índice de desfrute do rebanho brasileiro, nos últimos anos, é resultado principalmente da elevada idade ao primeiro parto e baixa taxa de prenhez das matrizes (ANUALPEC, 2005).

O melhoramento genético, baseado na seleção de indivíduos com maior desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, produção leiteira, melhor conversão alimentar e precocidade sexual, possibilita o aumento da produtividade,

tanto de carne quanto de leite. Assim, a eficiente multiplicação de animais superiores proporciona maior retorno econômico da atividade pecuária. No entanto, a multiplicação e distribuição desse material genético somente são possíveis, com adequado, manejo sem o comprometimento da eficiência reprodutiva do rebanho (PINEDA, 2003).

A produção de um número maior de bezerros pode ser considerada como o primeiro passo para o aumento da produção de carne. Fatores como idade elevada ao abate e parto tardio contribuem para o baixo desfrute da bovinocultura de corte no Brasil, tornando a fase de recria mais extensa e o sistema como um todo menos produtivo. Melhorias na produtividade dependem de uma rápida substituição do rebanho por animais que expressem um melhor potencial genético, decisão que irá afetar a produtividade futura do rebanho. Em alguns países que empregam técnicas de manejo seletivo há mais tempo, as novilhas de corte e leite têm a primeira cria aos 2 anos de idade (WOLFE et al., 1990). A idade a puberdade, raça e composição genética são características importantes que irão influenciar a produtividade.

Para os programas de produção de novilhas de reposição é importante conhecer os processos fisiológicos que determinam o início da primeira ovulação (PATTERSON et al., 2006). Melhorias genéticas visando a redução da idade à puberdade contribuem para um aumento na vida reprodutiva do animal e conseqüentemente a produção de um maior número de bezerros, com benefícios para toda a cadeia produtiva.

Após o nascimento das bezerras, as concentrações séricas do hormônio luteinizante (LH) diminuem. A partir da 10^a semana de vida, estendendo-se até a 22^a semana, observa-se um aumento gradativo na secreção de LH, sucedido por um decréscimo na secreção de LH, caracterizando-se uma segunda fase de contenção da atividade gonadal. Na fase que antecede a puberdade, o aumento na secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) desencadeia um novo aumento na liberação de LH, restabelecendo a atividade gonadal e dando início ao período de maturidade sexual (EVANS et al., 1992).

Existem diversas hipóteses procurando descrever os fatores responsáveis pelo bloqueio da atividade gonadal nos bovinos, após o nascimento. A “Hipótese Gonadostática” preconiza a existência de uma excessiva retroalimentação negativa exercida pelos esteróides gonadais, no hipotálamo, com o poder de diminuir a atividade secretória de hormônios gonadotróficos, principalmente o LH. Com o

decorrer da idade, a sensibilidade diminui devido a uma redução do número de receptores para estradiol no hipotálamo, desencadeando aumento na secreção de GnRH e o surgimento de uma onda de crescimento folicular que culmina com uma ovulação, estabelecendo o período de maturidade sexual (KINDER et al., 1987). Outra hipótese considerada para explicar a contenção da atividade gonadal é a “Central ou Neuronal”. Experimentos utilizando primatas recém-nascidos castrados cirurgicamente e humanos agonadaís evidenciaram esta teoria, na qual a gonadotrofina liberada após o nascimento foi suprimida no período infantil, voltando a aumentar próximo à puberdade. (TERASAWA; FERNANDES, 2001).

Em novilhas pré-púberes, os mecanismos neuroendócrinos que controlam a concentração circulante de LH foram pouco estudados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REBANHO BRASILEIRO

O Brasil possui um rebanho aproximado de 165 milhões de bovinos, sendo que, o Zebu, bovino de origem indiana (*Bos indicus*) puro ou mestiço, corresponde a 70% destes animais. A capacidade do zebu em resistir a altas temperaturas e umidade, características de regiões tropicais e subtropicais, está associada ao acúmulo de gordura localizado no cupim, conferindo maior capacidade de transpiração e dissipação de calor (CARTWRIGHT, 1980), associada à habilidade de digerir forragens de baixa qualidade (RAJARATNE et al., 1983). Estes fatores fizeram do Zebu um animal capaz de se adaptar a sistemas extensivos de manejo e criação, encontrados em regiões de clima tropical; no entanto, a maior tolerância do Zebu em relação à pressão ambiental, resultou em decréscimo na produtividade e na precocidade sexual. Nos países sul americanos a primeira ovulação nas fêmeas zebuínas ocorre entre 22 e 36 meses de idade e a primeira cria entre 44 e 48 meses (PEREIRA, 2000; SILVA; PEREIRA, 1986; SOUZA et al., 1995). Em decorrência de tais fatores, a redução na idade à primeira ovulação e na primeira cria, tem sido alcançada por meio de cruzamentos e melhoramento genético.

2.1.1 Produtividade das fêmeas

Quando fêmeas com genótipos diferentes são colocadas sobre um mesmo ambiente de clima tropical ou subtropical, o desempenho produtivo do Zebu (*Bos indicus*) é superior à raças de origem européia como o *Bos taurus* (BÓ et al., 2003). Entretanto, a amamentação nas vacas zebuínas resulta em um efeito negativo sobre a atividade reprodutiva da fêmea, uma vez que, por meio de mecanismos neurais (envolvendo a prolactina), tem-se um decréscimo na secreção de GnRH (ORIHUELA, 1990). Este efeito depende da frequência ou da duração do estímulo da mamada dentro de um período de 24 horas (MCNEILLY, 1980). Rodrigues e Segura (1995) mostraram que a restrição da mamada por 60 minutos após o nascimento do bezerro (30 a 60 dias), proporciona aumento na frequência de LH e

aumento da taxa de gestação. A interação social também afeta a reprodução no Zebu, uma vez que a presença de touros reduziu o intervalo entre partos (BELOSO et al., 1997).

A menor taxa de fertilidade no período pós-parto na vaca Zebu deve-se a influência de diversos fatores como: aspectos nutricionais, características genéticas e sistema de gerenciamento das propriedades (BAÇA et al., 1998; PEREIRA, 2000). O manejo extensivo aplicado ao Zebu, embora de baixo custo, pode, na maioria das vezes, diminuir a eficiência reprodutiva (NEINDRE et al., 1996), conseqüência da reduzida ingestão de alimentos, o que resulta em insuficientes níveis circulantes de LH, com falhas na maturação do folículo dominante e na ovulação, resultando em menor taxa de fertilidade (RHODES et al., 1996).

2.1.2 Efeito do cruzamento

O cruzamento entre raças, bastante utilizado no Brasil nos últimos anos, apresenta a capacidade de incorporar genes inerentes ao Zebu, como o da adaptação ambiental, à melhor produtividade do *Bos taurus* (NEGUSSIE et al., 1999), permitindo exibir um alto grau de vigor híbrido.

Almejando explorar características que melhorassem a produtividade do rebanho, os nortes americanos produziram uma raça sintética conhecida como Brahman, Zebu constituído por uma mistura de raças (Guzerá, Nelore e Gir) com uma pequena contribuição genética de raças européias (CARTWRIGHT, 1980; SANDERS, 1980).

O efeito aditivo do cruzamento entre raças pode ser visto na idade da primeira ovulação, que decresceu de 22 para 15 meses de idade em fêmeas Zebu cruzadas com machos *Bos taurus* (GALINA; ARTHUR, 1989). Na América do Sul, mesmo em animais considerados Zebus puros, identificou-se a presença de DNA mitocondrial de *Bos taurus* (MEIRELLES et al., 1999), não sendo possível dizer quando esta contribuição genética foi introduzida.

Animais cruzados ($\frac{1}{2}$ sangue Chianina-Zebu) mostraram precocidade e maior potencial de crescimento, quando comparados a animais $\frac{3}{4}$ Zebu-Chianina (SILVA; PEREIRA, 1986). O aumento da proporção de genes *Bos indicus* foi acompanhado

por um decréscimo na taxa de nascimento em novilhas criadas em clima subtropical (ROCHA; LOBATO, 2002). Na Argentina, fêmeas *Bos taurus* submetidas a cruzamentos com machos *Bos indicus* mostraram-se mais precoces em relação à puberdade, quando comparadas a raças taurinas puras (MEZZADRA et al., 1993). Estudando o comportamento reprodutivo de novilhas cruzadas, Garcia et al. (2002) concluíram que o início da primeira ovulação está associado ao peso corporal e à concentração de leptina circulante, que aumenta no período próximo à primeira ovulação. A puberdade precoce em animais oriundos de cruzamentos entre o Zebu e *Bos taurus* pode ser atribuída à heterose entre as raças (MARSON et al., 2001). Sob o ponto de vista nutricional, o cruzamento do Zebu com raças taurinas aumenta a demanda protéico-energética, podendo limitar a produtividade. A idade da primeira ovulação em animais oriundos de cruzamento entre raças (5/8 Charolês e 3/8 Zebu) e alimentados com forragens de baixa qualidade foi a mesma, quando comparado a fêmeas Zebu mantidas sob o mesmo regime alimentar (ALENCAR et al., 1987).

O cruzamento entre raças (Red Angus e Simental x Nelore) pode refletir-se em maior taxa de natalidade, quando comparado a outros cruzamentos (Marchigiana ou Guzerá x Nelore), resultante do efeito aditivo dos genes *Bos indicus* combinados a genes de *Bos taurus* (PEROTTO et al., 2001). O cruzamento Charolês e Nelore resultou em uma heterose de -12,8 para idade e peso na puberdade, quando comparado com as respectivas raças puras (RESTLE et al., 1999). O cruzamento entre raças constitui uma ferramenta para diminuir a idade na primeira ovulação.

2.2 FISIOLOGIA NEUROENDÓCRINA DA PUBERDADE

Em bovino a pouca quantidade de estradiol (E_2) secretada pelos folículos ovarianos, após o nascimento, é suficiente para a supressão na secreção pulsátil de LH. No período pós-natal de bezerros (machos), a secreção de LH está associada ao aumento da frequência de pulsos de GnRH (RODRIGUES; WISE, 1989). De acordo com Day et al. (1984), a ovariectomia de novilhas pré-púberes aumenta a frequência e amplitude dos picos de secreção de LH. Quando fêmeas ovariectomizadas receberam a administração parenteral de E_2 , a frequência pulsátil

de LH foi suprimida. O tratamento crônico com doses exógenas de E_2 , no início do período pré-púbere, pode contribuir para desensibilizar o hipotálamo e levar a uma puberdade precoce (SCHOPPEE et al., 1995). A sensibilidade ao E_2 é maior no período pré-púbere (KINDER et al., 1987), podendo ser controlada por neurônios localizados na área pré-óptica medial do hipotálamo (DOCKE et al., 1984), sensibilidade que pode ser aumentada expondo os neurônios ao E_2 .

2.2.1 Secreção de gonadotrofinas durante a puberdade

O início da secreção de gonadotrofinas não está bem esclarecido. Há dois padrões de secreção de gonadotrofinas, um tônico e outro cíclico (REITER; GRUMBACH, 1982). O padrão tônico ou basal é regulado por um mecanismo de retroalimentação negativa. O aumento na concentração circulante de esteróides sexuais resultam em diminuição na secreção das gonadotrofinas. O padrão de secreção cíclico envolve, além da retroalimentação negativa, um mecanismo de retroalimentação positiva. Em determinada fase do ciclo o aumento da concentração circulante de estrógenos pode estimular a liberação pulsátil de LH e FSH.

O início do segundo aumento da secreção de gonadotrofinas, no período pós-natal, reflete um início da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Próximo à primeira ovulação ocorre um aumento na frequência de pulsos de LH, consequência da diminuição da sensibilidade do hipotálamo à retroalimentação negativa exercida pelo E_2 (EVANS et al., 1992; HONARAMOOZ, 1999; KINDER et al., 1995; MELVIN, 1999; SCHAMS, 1981). A concentração sérica de FSH permanece relativamente estável no período que antecede a ovulação (EVANS et al., 1994). No período peri-pubertal (30 a 80 dias antes da primeira ovulação), o aumento da frequência dos picos de secreção de LH resulta em crescimento dos folículos antrais e aumento da produção de estradiol. Em novilhas, a concentração plasmática de E_2 permanece baixa até um mês antes da puberdade, quando aumenta gradualmente até o momento da primeira ovulação (NAKADA et al., 2000).

A administração de um agonista de GnRH com finalidade de suprimir o crescimento folicular em fêmeas bovinas com 8 a 12 semanas de idade, não influenciou o início da primeira ovulação (EVANS; RAWLINGS, 1994). A modificação

no plano nutricional pode influenciar o processo de maturação sexual, culminando com aumento da frequência de pulsos de LH e tamanho máximo dos folículos no período pré-pubertal (DAY et al., 1987).

2.2.2 Mecanismos neuroendócrinos de contenção da atividade gonadal

Duas hipóteses foram propostas objetivando compreender os mecanismos fisiológicos de contenção da atividade gonadal que antecedem a primeira ovulação. A primeira, comumente chamada de hipótese “gonadostática” e proposta por Dora e Hohlweg e Dohrn¹ (1932 apud OJEDA; URBANSKI, 1994, p.388), descreve a ocorrência de uma dessensibilização do hipotálamo aos esteróides gonadais, com diminuição do número de receptores para estradiol, durante a maturação sexual, permitindo o aumento da secreção de gonadotrofinas. Esta teoria foi descrita também para ovinos (FOSTER; RYAN, 1979), bovinos (RODRIGUES et al., 2002), mas não se aplica a primatas (RAPISARDA et al., 1983).

A segunda hipótese para o início da primeira ovulação, conhecida como “central”, envolve a presença de neurotransmissores com capacidade de inibir a secreção de gonadotrofinas, independente da ação dos esteróides gonadostáticos. O conceito de que determinada área do sistema nervosa central (SNC) controla a maturação sexual foi descrito por Donavan e Van der Werff² (1956 apud OJEDA; URBANSKI, 1994, p. 389). Estes autores demonstraram que lesões no hipotálamo de ratas resultaram em puberdade precoce. A hipótese “central” foi confirmada em primatas gonadectomizados e humanos com agenesia gonadal, onde a secreção de gonadotrofinas manteve-se elevada durante o período neonatal, sendo posteriormente suprimida até o início da primeira ovulação (TERASAWA; FERNANDES, 2001).

¹HOHLWEG, W.; DOHRN, M. Über die Beziehungen Zwischen Hypophysenvorderlappen und Keimdrüsen. Klin Wochenschr, v. 11, p. 233-235, 1932.

²DONAVAN, B. T.; VAN DER WERFF, J. J. B. Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions. Nature, v. 178, p. 745, 1956.

2.2.3 Mecanismos neuroendócrinos de secreção de gonadotrofinas

Nas últimas décadas, as buscas para compreender os mecanismos de interação entre o sistema neural e endócrino trouxeram significativos progressos. No controle da secreção e da pulsatilidade de GnRH podemos envolver os neurotransmissores, estimulatórios como os aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato), neuropeptídeo Y, noraepinefrina, noradrenalina e ácido aspártico e neurotransmissores inibitórios como o GABA, dopamina, opióides endógenos e endorfinas. Há uma série de evidências de que o GABA, predominantemente através de receptores GABA_A, atue inibindo a liberação de GnRH. Interações entre os sistemas adrenérgico, opioidérgico e serotoninérgico no controle da secreção de GnRH foram demonstradas em ratas (SCACCHI et al., 1998; SULLIVAN; MOENTER, 2005), primatas (TERASAWA, 1998), bovinos (CHANDOLIA et al., 1997; HONARAMOOZ et al., 2000) e ovinos (TORTONESE, 1999).

O glutamato é um dos aminoácidos excitatórios que estimula a secreção de gonadotrofinas (BRANN, 1995). Por outro lado, estudos *in vivo* consideraram que o GABA desempenha função inibitória na secreção de gonadotrofinas.

A infusão de GABA em regiões hipotalâmicas contendo neurônios de GnRH inibiu a pulsatilidade de LH em ratas ovariectomizadas (CARBONE et al., 2002). A injeção intracerebroventricular do GABA tanto reduziu a concentração sanguínea (LAMBERTS et al., 1983) quanto inibiu a pulsatilidade de LH em ratas ovariectomizadas (CARBONE et al., 2002). Em ovelhas tratadas com E₂, durante o anestro sazonal, a injeção do baclofen (antagonista GABA_B) sensibilizou a área pré-óptica hipotalâmica (POA) aumentando a concentração basal de LH (SCOTT; CLARKE, 1993). O tratamento com o ácido aminoacético (bloqueador da degradação do GABA) inibiu a secreção pulsátil de LH em ratas (FLUGGE et al., 1986).

Nos bovinos, após o nascimento, a ação dos opióides endógenos pode inibir a secreção de LH (HONARAMOOZ et al., 2000), efeito que diminui antes da primeira ovulação (WOLFE et al., 1992). Em novilhas, os mecanismos de contenção da secreção de LH podem estar relacionados com o sistema dopaminérgico, e a partir da 20ª semana de idade, o sistema α -adrenérgico estimula a secreção de LH, determinando o momento da primeira ovulação (HONARAMOOZ et al., 2000).

A secreção de LH, em resposta à administração de NMDA (N-metyl-d-aspartato, receptor de glutamato) em novilhas *Bos taurus*, aumentou da 4^a para 36^a semana de idade, resposta que pode ter sido mediada pela presença de óxido nítrico (HONARAMOOZ et al., 1999).

2.2.4 Sistemas gabaérgico, dopaminérgico e alfa-adrenérgico

A ação do sistema gabaérgico sobre a secreção de gonadotrofinas em ratas impúberes e fêmeas adultas é diferente (CARBONE et al., 2002). De acordo com Moguilevsky (1991) em ratas pré-púberes (12 a 18 dias de idade), o GABA estimulou, enquanto que, em ratas peripúberes (30 dias de idade) o GABA inibiu a secreção de gonadotrofinas. O efeito estimulatório do GABA em ratas com 15 dias de idade está relacionado a um aumento da liberação hipotalâmica de glutamato e aspartato (CARBONE et al., 2002). A ação do GABA sobre a secreção de gonadotrofinas durante a maturação sexual de ratas parece estar relacionado a modificações ontogênicas na composição e na propriedade dos receptores gabaérgicos (CARBONE et al., 2002).

Segundo Honaramooz et al. (2000), em novilhas, o aumento da secreção de LH está relacionado à diminuição da retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de GnRH, associado ao aumento da atividade de neurotransmissores excitatórios, com capacidade de estimular a secreção de LH.

A maioria dos trabalhos envolvendo o sistema dopaminérgico foi realizada com ovelhas (CHOMICKA, 1992; DAILEY et al., 1987; GALLEGOS-SANCHEZ et al., 1998). Porém, em algumas espécies, a interpretação dos resultados é dependente do agente farmacológico usado, taxa de administração, dose usada e da dinâmica folicular no momento da aplicação (DEAVER; DAILY, 1982).

A utilização de um antagonista da dopamina em bezerros da raça Hereford com 24 meses de idade diminuiu a amplitude dos picos de secreção de LH (CHANDOLIA et al., 1997). Segundo Meyer e Goodman (1985) o anestro sazonal em ovelhas é resultado da interação dos esteróides gonadais com mecanismos neurais inibitórios. A administração de um antagonista de receptores D₂ de dopamina (pimozide), durante o anestro sazonal, em ovelhas ovariectomizadas, não aumentou a frequência pulsátil de secreção de LH; porém, em associação com um implante de estradiol, aumentou a frequência pulsátil de LH, sugerindo que neurônios

dopaminérgicos e o estradiol, em determinada época do ano, estão envolvidos no processo de secreção de GnRH. Jackson³ (1977 apud DEEVER; DAILEY, 1982, p. 624) relatou que o pimozide bloqueou a liberação de LH induzida pelo 17 β -estradiol, em ovelhas ovariectomizadas. A administração do sulpiride (antagonista dopaminérgico de receptores D₂) em ovinos aumentou a secreção de LH durante o período de dias curtos, mas ficou inalterada durante a estação do ano, com a presença de dias longos (TORTONESE, 1999). A influência do fotoperíodo, sobre o ciclo reprodutivo, pode modular inter-relações entre a dopamina e opióides endógenos (TORTONESE, 1999). Em eqüinos a utilização do sulpiride, durante a fase anovulatória (inverno), não alterou o número de folículos e a concentração plasmática de LH e FSH, mas aumentou a concentração plasmática de prolactina (DONADEU, 2002).

Em ovelhas, durante a fase pré-púbere, o efeito inibitório da dopamina foi mais evidente entre 17 e 22 semanas de idade (BRANGO et al., 1990). O hipotálamo não apresenta um sistema noradrenérgico intrínseco, mas é rico em vesículas pré-sinápticas contendo adrenalina ou noradrenalina. A região do *Locus ceruleus* faz sinapses com neurônios produtores de GnRH, sendo uma importante fonte de noradrenalina. Em ratas ovariectomizadas lesões no *Locus ceruleus* bloquearam a onda pré-ovulatória de LH e conseqüentemente a ovulação, decrescendo a concentração plasmática de LH (ANSELMO-FRANCI et al., 1999). Estudos *in vivo* com ratas mostraram um efeito estimulatório da noradrenalina sobre a secreção de LH (OJEDA et al., 1992).

Em ruminantes encontram-se poucos dados na literatura relacionando o efeito do sistema adrenérgico sobre a secreção de LH. Em novilhas pré-púberes, a secreção de LH diminuiu, após a administração da noradrenalina (HARDIN; RANDEL, 1983). Segundo Borromeo et al. (1995), 15 a 60 min após a administração da clonidina (estimulador α 2-adrenérgico), em vacas holandesas, houve decréscimo na produção de prolactina e aumento na produção de GH. De acordo com Gorewit (1980), em bovinos, a administração da clonidina resultou em decréscimo da insulina e aumento da glicose sérica. Em outro estudo, Gorewit (1981) obteve pico de GH; 10 minutos pós-infusão da clonidina, a concentração

³JACKSON, G. L. Effect of adrenergic blocking drugs on secretion luteinizing hormone in the ovariectomized ewe. *Biology of Reproduction*, v. 16, p. 543-548, 1977.

sérica de prolactina permaneceu elevada, até atingir a concentração basal máxima 150 minutos pós-infusão; a concentração sérica de cortisol e LH não foi alterada. O autor sugere que somente o GH, em bovinos, parece ser modulado por receptores noradrenérgicos.

Aparentemente, nos bovinos, o mecanismo responsável pela contenção gonadal envolve inibição hipotalâmica, exercida pela excessiva sensibilidade aos esteróides gonadais e interação entre aminoácidos excitatórios e inibitórios como peptídeos, monoaminas e gases difusíveis (Figura 1), mecanismo de bloqueio conhecido como mecanismo de ação central (HORVATH et al., 2001).

Figura 1 - Mecanismos neuroendócrinos modulando a secreção de GnRH no hipotálamo de novilhas.

2.3 PUBERDADE EM NOVILHAS ZEBU

2.3.1 Aspectos fisiológicos

A seleção de novilhas que parem aos dois anos de idade é um importante parâmetro utilizado no melhoramento genético (TRAN et al., 1988). A diferença na idade, à primeira ovulação entre novilhas, é atribuída a fatores genéticos e ambientais incluindo aspectos relacionados à nutrição, doenças, temperatura, umidade relativa do ar e estação de nascimento (PEREIRA, 2000).

De acordo com Rodrigues et al. (2002) a puberdade em novilhas Zebu é mais tardia, quando comparada a novilhas *Bos taurus*. Embora a novilha Zebu atinja a maturidade sexual em idade mais avançada e com maior peso, estes animais apresentam maior longevidade reprodutiva quando comparados aos *Bos taurus* (AROEIRA et al., 1997; CARTWRIGHT, 1980).

Durante a maturação sexual em novilhas *Bos indicus*, foi observado um aumento progressivo na secreção de LH, enquanto que, a secreção de FSH permanece inalterada (NOGUEIRA et al., 2003), mudanças similares às relatadas nas novilhas *Bos taurus* (EVANS et al., 1994).

A dinâmica folicular de novilhas da raça Nelore foi examinada por ultrassonografia dos 8 aos 16 meses de idade e foi observado que a taxa de crescimento folicular (mm/dia) permaneceu constante, porém o folículo dominante apresentou maior diâmetro com o decorrer da idade (DE LUCIA et al., 2002). Durante este estudo foi verificado que 32% das novilhas tornaram-se prenhes aos 15 meses de idade (consideradas precoces) e apresentaram maior diâmetro do folículo dominante aos 12 ($9,6 \pm 1,7$ mm) e aos 14 ($11,1 \pm 1,8$ mm) meses de idade. Este relato está de acordo com os dados de Perry et al. (1991), que observaram em novilhas oriundas de cruzamento *Bos taurus* x *Bos indicus* maior diâmetro folicular aos 11 meses de idade (8,38 mm) quando comparado a novilhas *Bos taurus* x *Bos taurus* (7,62 mm).

Embora o diâmetro folicular tenha sido maior, nas novilhas precoces da raça Nelore, entre 12 e 14 meses de idade, a concentração média de LH no estudo não diferiu entre os grupos, sugerindo uma maior sensibilidade das novilhas precoces ao LH (NOGUEIRA et al., 2003).

Alguns fatores, como idade e reserva corporal de gordura, podem influenciar o início do ciclo estral nos animais pré-púberes. A leptina secretada pelos adipócitos pode ativar mecanismos hipotalâmicos, aumentando o número de picos de secreção de LH (FOSTER; NAGATANI, 1999; GARCIA et al., 2002). Através do uso da bioimpedância elétrica, durante a maturação sexual de novilhas da raça Nelore, foi identificado aumento no número de células (condutividade), mas não na porcentagem de gordura (resistência) com o decorrer da idade (ARAÚJO et al., 2002). Nos zebuínos a distribuição de gordura é diferente de outras raças, o que provavelmente influenciou o resultado de estudos relacionados a bioimpedância.

Em sistemas de criação extensivos existe uma dificuldade para se determinar a idade da primeira ovulação; normalmente utiliza-se a idade da primeira cria. Para bovinos de corte no Brasil, a idade para a primeira cria de 40 meses é atribuída à baixa qualidade das forragens tropicais que contribui para uma inadequada nutrição dos animais (PEREIRA, 2000; SOUZA et al., 1995).

2.3.2 Nutrição e manejo

A deficiência nutricional em novilhas de corte suprime, no hipotálamo, a geração de picos de secreção de GnRH (RAWLINGS et al., 2003; SCHILLO et al., 1992) atrasando a primeira ovulação. Novilha Zebu criada em regiões tropicais e corretamente manejada, sob o ponto de vista nutricional, tornam-se púberes aos 12,3 meses e parem aos 27 meses de idade (FAJERSSON et al., 1991). Novilhas da raça Nelore que foram selecionadas para precocidade e permaneceram sob regime nutricional adequado ovularam com 14 e 15 meses de idade. As dosagens de progesterona mostraram que apesar do primeiro ciclo estral ter sido curto, foi seguido de ciclos estrais regulares, similar ao observado em vacas adultas (NOGUEIRA et al., 2003).

De acordo com Patterson et al. (1992b) o aumento da nutrição da mãe, no período pós-parto, influenciou as bezerras de forma positiva, no crescimento e na idade a primeira ovulação. O aumento da quantidade de proteína ingerida resulta em aumento de peso e decréscimo na idade à puberdade (OYEDIPE et al., 1982). Greer

et al. (1983) demonstraram a ocorrência de ovulação precoce, quando novilhas foram submetidas a alto nível nutricional durante o crescimento.

Em humanos, a puberdade é caracterizada por um período de transição entre a infância e a vida adulta. Nos animais domésticos, porém, antes da primeira ovulação a fêmea é considerada pré-púbere e depois disto ela é considerada adulta.

Novilhas Nelore que se tornaram gestantes após a maturação sexual, com 16 a 18 meses de idade, eram mais pesadas e apresentavam melhor condição corporal (SEMMELMANN et al., 2001). Nos Zebu, a interação genótipo-ambiente tem um efeito significativo no peso da fêmea no período pós-parto e na incidência da primeira ovulação (FERREIRA et al., 2001). Assim, a subnutrição aumenta a idade para a puberdade; conseqüentemente o aumento da produtividade pode ser melhorado introduzindo-se técnicas de manejo nutricional (BERETTA et al., 2001).

Por outro lado, a primeira parição aos dois anos de idade pode prolongar o intervalo entre partos (PATTERSON et al., 1992a). A alta herdabilidade ($0,57 \pm 0,01$), para início da gestação, aos 14 meses, em novilhas da raça Nelore, sugere nas últimas décadas uma falha prévia de seleção, nesta raça, para esta característica (ELER et al., 2002).

A positiva relação observada entre circunferência escrotal e a puberdade precoce de machos (VARGAS et al., 1998) não foi reproduzida utilizando a circunferência ovariana e área pélvica de novilhas (LOBO et al., 2001). O sistema de escore corporal que considera várias características dos órgãos reprodutivos (tamanho e tônus uterino, tamanho dos ovários, crescimento folicular e presença de corpo lúteo), quando usado em novilhas de 2 anos, foi capaz de identificar animais com alta probabilidade de ovulação (FERREIRA et al., 1999). Para que a primeira cria ocorra aos dois anos de idade, é necessário usar uma combinação que envolva o aspecto nutricional, peso ideal e seleção para puberdade precoce (TRAN et al., 1988).

Outros fatores, como mutações de genes relacionados a receptores de LH e seus fenótipos, podem ser determinantes na primeira ovulação de novilhas Zebu, criadas em países de clima temperado (CHENOWETH, 1994; MILAZZOTTO et al., 2002). Embora a puberdade precoce seja geneticamente determinada, não houve associações entre mutações do gene de LHr e seus fenótipos, em novilhas da raça Nelore (MILAZZOTTO et al., 2002). Durante o verão, mesmo em novilhas Zebu adaptadas, foram observadas mudanças na dinâmica folicular, caracterizada por

reduzida taxa de crescimento folicular e aumento na duração do crescimento folicular (GAMA FILHO et al., 2002). De acordo com Wolfenson et al. (2000) toda fêmea deve ser mantida em condições ideais de temperatura, durante o verão, para aumentar a fertilidade. A idade da primeira ovulação pode ser influenciada pela temperatura, afetando a taxa de crescimento folicular, a concentração de LH e prolactina. Embora os bovinos não sejam considerados animais sazonais, um estudo conduzido com *Bos taurus* (SCHILLO et al., 1983) demonstrou que a estação do ano influencia o período de nascimento e a puberdade, influenciando diretamente a idade da primeira ovulação e do parto de novilhas. Quando mantidas em clima subtropical, a taxa de ovulação foi menor em novilhas contendo genes de Zebu, mostrando-se sensíveis ao fotoperíodo, efeito ausente em novilhas *Bos taurus* (MEZZADRA et al., 1993).

2.3 CONCLUSÕES

O estudo da puberdade em bovinos pode ser visto como o resultado de uma série de eventos fisiológicos e comportamentais envolvendo mecanismos endócrinos e neuroendócrinos. Em fêmeas, a maturação dos mecanismos neurais que controlam a pulsatilidade da secreção de GnRH somente está completa, após a primeira ovulação. A diminuição da secreção de GnRH, após o nascimento até a primeira ovulação, é imposta primariamente por mecanismos gonadais e possivelmente extragonadais. Embora os modelos fisiológicos, envolvendo mecanismos de ação central, tentem explicar o processo e o momento do início da primeira ovulação, a identificação e funcionalidade do sistema que controla a geração e a pulsatilidade de GnRH, durante o período pré-puberal permanece pouco compreendido.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Investigar a variação na secreção de LH em resposta a neurotransmissores, na presença ou ausência de esteróides gonadais durante a maturação sexual de novilhas.
- ✓ Gerar informações sobre os mecanismos neuroendócrinos envolvidos na maturação sexual de bezerras da raça Nelore, da desmama até a primeira ovulação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a secreção de LH em resposta à administração da PicROTOXINA (antagonista gabaérgico) em diferentes idades (8, 10, 14 e 17 meses) em novilhas pré-púberes da raça Nelore (*Experimento 1*);
- ✓ mensurar a secreção de LH 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 secreção de LH em resposta à administração da Clonidina (antagonista alfa adrenérgico) em diferentes idades (8, 12 e 15 meses) em novilhas pré-púberes da raça Nelore (*Experimento 3*);
- ✓ caracterizar mudanças ocasionadas pela retroalimentação positiva do 17beta-estradiol, no eixo hipotálamo-hipófise, em novilhas pré-púberes da raça Nelore durante o desenvolvimento sexual (*Experimento 4*);
- ✓ quantificar os níveis plasmáticos de LH durante a maturação sexual, da desmama à primeira ovulação (*Experimento 5*).

4 HIPÓTESE

4 HIPÓTESE

- ✓ A participação de neuormônios, durante a maturação sexual de novilhas da raça Nelore, está associada à variação da retroalimentação negativa dos esteróides gonadais sobre o hipotálamo.
- ✓ Existe um bloqueio central inibindo a secreção de LH e a atividade gonadal associada ao mecanismo gonadostático no período pré-puberal em novilhas Nelore.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E METODOS

5.1 GENERALIDADES

5.1.1 Ovariectomia

O procedimento cirúrgico da ovariectomia foi realizado pela equipe cirúrgica de grandes animais do Hospital Veterinário da Unesp de Araçatuba. Os animais foram mantidos em jejum por 24 horas (hs) de antecedência. Antes do procedimento operatório, utilizou-se o miorelaxante de ação central xilazina na dosagem de 0,2 mg/kg, por via intramuscular (AGUIAR, 2004). Os animais foram colocados em decúbito lateral direito e uma área cirúrgica (flanco direito) de 40 x 40 cm foi tricotomizada (Figura 2). Após o miorelaxamento obtido pela xilazina, foi utilizada anestesia local auxiliar (“L” invertido) na região média da fossa paralombar esquerda, infiltrando-se o tecido subcutâneo e a musculatura (40 ml de lidocaína a 1%, MASSONE, 1988), e logo em seguida preparada para cirurgia asséptica com repetidas escovações cirúrgicas, utilizando-se, para assepsia local, tríplice desinfecção com álcool, iodo-povidine e álcool. Campos estéreis foram usados para cobrir a mesa de instrumental, o paciente e a mesa operatória.

Um bisturi Bard-Parker nº 10 foi usado para incisar a pele (10-15 cm) no sentido dorso-ventral, iniciando-se a 10 cm caudal ao processo paravertebral entre a 5ª e 6ª vértebras lombares e estendendo-se ventralmente por 30 cm (Figura. 3). Hemorragias subcutâneas foram pinçadas com pinças hemostáticas mosquito. Após a contenção das hemorragias as pinças foram colocadas num ângulo de 90° com a pele e deixadas lateralmente à incisão (Figura 4). Após a hemostasia, o tecido subcutâneo foi incisado até a fáscia com outra lâmina nº 24 (com intuito de prevenir a contaminação com os microorganismos da pele). Os músculos abdominais, músculo oblíquo abdominal externo, que é aponeurótico e abaixo deste, o músculo oblíquo abdominal interno, de maior espessura e rico em vasos sangüíneos, foram separados; através de uma tesoura de ponta romba fechada, realizou-se uma perfuração, atravessando estes dois músculos e o músculo transverso do abdômen. O peritônio foi exposto assim que os músculos abdominais foram afastados. Uma

pequena incisão no peritônio foi feita com um movimento penetrante do bisturi, sendo ampliada cranial e caudalmente, com tesoura, à medida que a parede abdominal era separada das vísceras adjacentes. Teve-se início a conduta exploratória de localização do útero e ovário (Figura 5).

O auxiliar afastou o rúmen cranialmente para permitir que o cirurgião pudesse inserir a mão enluvada em forma de concha e para localizar e sentir o útero e os ovários, situados 5 cm cranialmente ao assoalho da pelve (Figura 6). Útero e pedículo ovariano foram ligados com categut cromado nº 2, e as extremidades cortadas. Devido à abertura cirúrgica ser limitada, montou-se o nó duplo de cirurgião fora do campo cirúrgico. Enquanto o auxiliar mantinha o rúmen afastado, foi possível ao cirurgião isolar o ovário esquerdo, envolvê-lo com o nó pré-moldado e cerrá-lo em seguida. O ovário foi removido com o auxílio de uma tesoura de Mayo curva e o pedículo foi inspecionado para se observar a manutenção da ligadura ou possível hemorragia, devido à falha na ligadura. Na ausência de problemas, os fios foram cortados a 1 cm de distância da ligadura. Em seguida, localizou-se o ovário direito e o procedimento foi repetido.

Após a retirada dos ovários (Figura 7), iniciou-se o processo de sutura da musculatura em dois planos (Figura 8). O primeiro plano envolveu o peritônio e o músculo transverso do abdome. O segundo plano envolveu os músculos oblíquos abdominal interno e externo. Ambos os planos foram suturados com categut cromado número 3, no padrão Sultan. O tecido subcutâneo foi aproximado com categut cromado 2-0 agulhado, no padrão Cushing. A pele foi aproximada com um material de sutura inabsorvível (náilon) 0,45 agulhado, no padrão festonado. O tempo médio de cirurgia foi de 40 minutos.

Todos os animais manipulados cirurgicamente receberam antibioticoterapia com oxitetraciclina de longa ação (Terramicina LA), na dose de 20 mg/kg SID a cada 48 horas, num total de 5 aplicações. Foram feitos curativos diários, na ferida cirúrgica, com iodo povidine a 10% BID. Repelente em pó a base de carbamato foi polvilhado sobre o local, para prevenir a instalação de miíases. Os pontos foram removidos no 10º dia do pós-operatório.

Todos animais se recuperaram plenamente e no 10º dia do pós-operatório foi realizada a retirada do material inabsorvível utilizado na aproximação da pele. Em uma das novilhas não foi possível papar o ovário direito, nem visualizá-lo pela ultrassonografia, no momento da cirurgia.

Figura 2 - Momento antecedendo o início da cirurgia. Bezerra em decúbito lateral direito.

Figura 3 - Incisão da pele no sentido dorso-ventral.

Figura 4 - Hemorragias subcutâneas pinçadas.

Figura 5 - Procedimento de localização do útero e ovários.

Figura 6 - Incisão lateral acompanhada da retirada ovariana.

Figura 7 - Ovários retirados após a cirurgia.

Figura 8 - Sutura da musculatura.

5.1.2 Canulação da veia jugular

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

Após a tranquilização com a associação de acepromazina (0,02 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg) por via intramuscular (AGUIAR, 2004), o animal foi imobilizado, tendo seus membros locomotores amarrados e presos com cordas. Foi realizada tricotomia e assepsia no local da punção com álcool iodado. Para a punção da veia 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 um 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 (Figura 9)

Figura 9 - Punção da veia jugular e inserção da cânula de silicone no interior da agulha 12 GA.

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 (40x12mm, com bisel aparado) foi inserida na porção externa da cânula e colada com Araldite® 12 horas (a fim de permitir o acoplamento de uma seringa à cânula) e fechada com um adaptador Luer Lok (B-D®) com látex auto-vedante. Uma solução de citrato de sódio 3,5% (1 ml em solução de NaCl 0,9%) foi injetada no interior da cânula para evitar coagulação do sangue. A parte da cânula que ficou exposta foi colocada dentro de uma pequena bolsa de curvim (couro sintético), também fixada a pele do animal, pós-sutura, com fio de nylon autoclavado. A bolsa (dimensões: 10x10cm) foi fechada por velcro e teve por objetivo proteger a cânula (Figura 10). O sucesso do procedimento consistiu em colar corretamente a cânula de silicone com a agulha 40x12mm (com bisel aparado) e o fechamento 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 de cânula, podendo entupi-la em poucos minutos.

Figura 10 - Bolsa de curvim com finalidade de proteger a cânula.

No dia da coleta, os animais canulados foram levados ao curral onde permaneceram por todo o período da coleta. Cada novilha foi contida por um

cabresto e recebeu alimento volumoso e água à vontade. 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 10ml estéreis, estantes com tubos para amostras, frasco de citrato de sódio 3,5%, tubos, agulhas e adaptadores para tubos Vacutainer (16x 100mm, com heparina sódica; B-D) usados para coletar o sangue caso houvesse algum problema com a cânula; geladeira 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 para coleta das amostras) acoplada à cânula retiravam-se 2 ml de sangue que eram desprezados por conter a solução de citrato que estava no interior da cânula; com a mesma seringa, aspiravam-se 8 ml de sangue, que servia de amostra; com uma seringa de 10 ml (seringa do anticoagulante), injetava-se 1ml de solução de citrato de sódio 3,5% na cânula (Figura 11), 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%) identificado com o número do animal e o número da amostra; agitava-se cuidadosamente o tubo com a amostra para a 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 (Figura 11). Após serem transportadas até o laboratório em caixas de isopor refrigerado, os tubos contendo as amostras, foram colocados na centrífuga. 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 do 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 tubos foram fechados com tampas plásticas, colocados em caixas de papelão identificadas com o número do animal, identificação e data do experimento, e acondicionados a -20° C. As amostras permaneceram armazenadas nestas condições até a realização do radioimunoensaio para dosagem de LH.

Figura 11 - Coleta sangüínea enquanto o animal estava se alimentando.

5.2 SISTEMA ALOMÉTRICO PARA TRANSPOSIÇÃO DE DOSES

5.2.1 Uso, características e definições

No presente experimento, o sistema alométrico foi utilizado para calcular a dose do Picrotoxin para bovinos, transpondo alometricamente da dose para ratos de 1,0 mg/kg (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 para um determinado grupo de animais, a uma temperatura corpórea central 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 um gráfico de massa dos animais x taxa metabólica fornece uma linha reta e a comparação dessas linhas, entre 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 frequência de administração.

Através do cálculo das necessidades energéticas, podemos calcular a alimentação parenteral necessária para a 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 frequência 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

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

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

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

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

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

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

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

$$SMEC \text{ Frequência Controle} = \frac{\text{Frequência}}{SMEC}$$

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

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

$$FREQUÊNCIA \text{ alvo} = \frac{24}{SMEC \text{ frequência alvo}}$$

5.2.4 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 GONADOTROFINAS

Os ensaios para LH bovino foram adaptados dos descritos por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990), realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Para identificação da área total de LH, área total de picos, número de picos, tempo necessário para estimular o maior pico de LH, utilizou-se o programa Prisma (GrafPad Prism versão 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). A concentração média de LH do pós-tratamento (ng/mL) foi calculada através da média dos valores do período pós-infusão da picROTOXINA (0-10 hs). Os picos foram identificados como aumento maior que 2 vezes o coeficiente de variação intra-ensaio envolvendo pelo menos dois pontos. 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 x min). O tempo necessário para o aparecimento do maior pico foi determinado em função do momento (minutos) em que surgiu o maior pico.

EXPERIMENTOS

6 EXPERIMENTO 1: ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO, NO BLOQUEIO DA SECREÇÃO DE LH, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

6.1 JUSTIFICATIVA

Estudos em primatas mostraram que o ácido gama aminobutírico (GABA) desempenha importante função inibitória, na secreção de gonadotrofinas, no período pré-puberal. Mitsushima et al. (1994) concluíram que existe uma maior concentração do GABA no sistema nervoso central (SNC) de primatas pré-púberes, e a utilização de um antagonista do GABA aumentou a liberação de LH. A ação desencadeada pelo GABA sobre a secreção de LH depende do subtipo de receptor ativado. Receptores GABA_A seriam responsáveis por estimular, enquanto receptores GABA_B por inibir a secreção de LH (SCACCHI et al., 1998). Além de primatas (KEEN et al., 1999) a inibição da secreção de LH exercida pelo GABA, no período pré-puberal, foi demonstrada em ratos (BRANN et al., 1990; MORELLO et al., 1989), ovinos (HORVATH et al., 2001; JACKSON; KUEHL, 2004; RECABARREN et al., 2004; SCOTT; CLARKE, 1993; ZAREMBA et al., 2000), mas não encontramos descrição em bovinos pré-púberes.

A hipótese estudada é a de que a secreção de LH (caracterizada pela concentração e área total de secreção de LH, número de picos, área total de pico, área do maior pico, amplitude máxima dos picos e tempo necessário para o aparecimento do maior pico) é inibida pelo GABA, na presença ou não de esteróides gonadais, em novilhas pré-púberes.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Animais e manejo

Foram utilizadas 15 novilhas da raça Nelore, nascidas em março de 2003 e oriundas da Agropecuária CFM, Fazenda São Francisco Magda, SP. Após a desmama aos 6 meses, as novilhas foram trazidas 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).

6.2.2 Ovariectomia e canulação

O procedimento cirúrgico da ovariectomia foi realizado pela equipe cirúrgica de grandes animais do Hospital Veterinário da Unesp de Araçatuba (ver detalhes no item 5.1.1). No dia anterior à administração do sulpiride, cada novilha teve a veia jugular canulada a fim de permitir coleta seriada de amostras de sangue, interferindo o menos possível no bem-estar dos animais (ver detalhes no item 5.1.2).

6.2.3 Administração de neurotransmissor e coleta de sangue

Para a inibição da ação Gabaérgica utilizou-se a picrotoxina (inibidor de receptor GABA_A, Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US), um fármaco que bloqueia a 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, transposta alometricamente da dose de 1,0 mg/kg para ratos (YANG et al., 1999; ver item 5.2). O sangue foi coletado por 1 hora antes da aplicação do fármaco (com o intuito de diminuir o estresse ocasionado pelo início dos trabalhos) e por 10 horas, após a infusão intravenosa da picrotoxina, com intervalos de 15 minutos.

6.2.3 Delineamento Experimental

As 15 novilhas foram divididas em 3 grupos (Figura 12): GRUPO IS: novilhas inteiras que receberam solução salina 0,9%, GRUPO IP: novilhas inteiras que receberam a picrotoxina; GRUPO OvP: novilhas ovariectomizadas tratadas com picrotoxina. Alguns animais se machucaram durante o experimento deixando grupos como o IS com um número menor de animais. O grupo IS com 4, 3, 4 e 4 novilhas respectivamente, aos 8, 10, 14 e 17 meses de idade. Os GRUPOS IP e OvP tiveram sempre 5 novilhas aos 8, 10, 14 e 17 meses de idade.

Figura 12 - Delineamento de aplicação dos tratamentos e do período de coleta de amostras durante o experimento 1.

6.2.4 Radioimunoensaio para gonadotrofinas e coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH

Os ensaios para LH bovino foram adaptados dos descritos por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990), realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba. O coeficiente de variação intra e interensaio e a sensibilidade dos ensaios de LH foram, respectivamente, de 14,96%, 15,14% e 0,04 ng/ml.

6.2.5 Identificação das variáveis estudadas e análise estatística

A concentração média de LH do pós-tratamento (ng/mL) foi calculada através da média dos valores do período (0-10 hs). Para identificação dos picos, área de secreção de LH, frequência e amplitude dos picos de secreção de LH utilizou-se o programa GrafPad Prism versão 3.00 for Windows (ver detalhes no item 5.4).

Os resultados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, 1998). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, no nível de significância de 5%. Antes de cada análise, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem às premissas, foram submetidos a várias transformações na sequência ($\log(X+1)$; logaritmo na base 10 – $\log_{10}X$; Raiz quadrada – $RQ\ X$; Quadrado – X^2), procurando atender à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Para a descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

6.3 RESULTADOS

Na figura 13 está representada a variação na concentração média de LH nas amostras coletadas antes e após a administração da picrotoxina, em diferentes idades.

A concentração média de LH do período pós-tratamento, no grupo de novilhas OvP, foi maior ($P \leq 0,05$) do que os grupos IS e IP aos 8, 10, 14 e 17 meses (Figura 14). Nas novilhas inteiras não houve diferença ($P \geq 0,05$), na concentração de LH, entre os animais que receberam salina ou picrotoxina, em nenhuma das idades estudadas.

Dos 10 aos 17 meses de idade houve aumento de 14%, 17% e 59% na concentração média de LH (quando comparado com o 8º mês de idade), passando de $0,50 \pm 0,09$ para $0,57 \pm 0,03$ ng/ml, de $0,41 \pm 0,04$ para $0,48 \pm 0,03$ ng/ml e de $1,05 \pm 0,28$ para $1,67 \pm 0,15$ ng/ml, para os grupos IS, IP e OvP, respectivamente (Figura 14).

Nas novilhas inteiras que receberam salina não houve diferença ($P \geq 0,05$), na concentração de LH, entre as idades estudadas. Nas novilhas inteiras que receberam a picrotoxina a concentração de LH foi maior aos 14 meses, quando comparada com 8 meses de idade (Figura 14).

Ao considerarmos a média da área total de secreção de LH, não encontramos diferença ($P \geq 0,05$), entre as novilhas do grupo IS, quando comparadas às novilhas do grupo IP. Novilhas ovariectomizadas, com idade igual ou superior a 10 meses, apresentaram maior área total de secreção de LH ($P \leq 0,05$), quando comparadas às novilhas inteiras. Verificou-se nas novilhas inteiras que receberam a picrotoxina um aumento na área total de secreção de LH aos 14 meses de idade, e um decréscimo próximo à puberdade (17 meses; Figura 15).

Figura 13 - Variação na concentração de LH (Média $\pm$ EPM) de amostras colhidas a cada 15 min (1 hora antes) e por 10 hs pós-aplicação de solução salina a 0,9% (inteiras – IS) e picrotoxina (inteiras – IP e ovariectomizadas – OvP) em novilhas pré-púberes da raça Nelore, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 14 - Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n= 4; 3; 4; 4) que receberam solução salina 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg de picrotoxina, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 15 - Área total de secreção LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg de picrotoxina, em diferentes idades.

Dentro dos grupos IS e OvP não houve aumento ($P \geq 0,05$), na área total de picos, em função da idade. Dentro do grupo de novilhas IP identificou-se uma menor área total de picos ($P \geq 0,05$), aos 8 meses, quando comparado, aos 14 meses de idade (Figura 16).

Analisando o número de picos, não houve diferença ($P \geq 0,05$), entre os grupos (Figura 17). No grupo de novilhas ovariectomizadas, com 14 meses, houve uma tendência ($P=0,09$) de maior número de picos, quando comparado aos 8 meses de idade.

A área do maior pico foi maior ($P \leq 0,05$), aos 14 e 17 meses pós-administração da picrotoxina, nas novilhas ovariectomizadas, quando comparado às novilhas inteiras (Figura 18).

A amplitude máxima dos picos de LH, quando comparada dentro de cada grupo, foi maior ($P \leq 0,05$) apenas no grupo OvP, aos 14 meses de idade, apresentando uma menor amplitude que aos 8 e 17 meses (Figura 19).

Aos 10 meses de idade, a administração da picrotoxina nas novilhas inteiras e ovariectomizadas retardou o tempo necessário, para que o maior pico fosse estimulando. Aos 14 e 17 meses de idade o grupo de novilhas inteiras apresentou redução no tempo necessário para que o maior pico fosse estimulado ($P \leq 0,05$) quando comparado aos 10 meses de idade (Figura 20). Não houve diferença ($P \geq 0,05$) ao longo do tempo nas novilhas IS e OvP, no tempo necessário, para o aparecimento do maior pico de LH.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 16 - Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg de picrotoxina, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem entre os grupos pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem dentro de cada grupo pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 17 - Número de picos de secreção de LH (valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 18 - Área do maior pico de secreção de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 19 - Amplitude máxima dos picos de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nellores pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 20 - Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=4) que receberam solução salina 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,18 mg/kg da picrotoxina, em diferentes idades.

6.4 DISCUSSÃO

Testamos em nosso estudo a hipótese que o GABA atua inibindo a liberação de LH em novilhas Nelore pré-púberes, a partir de evidências em ratos (MORELLO et al., 1989; SCACCHI et al., 1988) e primatas (SULLIVAN; MOENTER, 2005; TERASAWA, 1998).

Com o decorrer da idade houve um aumento da concentração média de LH, nas novilhas inteiras tratadas com a picrotoxina, especificamente aos 14 meses de

idade. Variação não observada nas novilhas inteiras tratadas com salina. Em primatas, a administração de um antagonista gabaérgico, no período pré-puberal, aumentou a secreção de LH (AKEMA et al., 1993; MITSUSHIMA et al., 1994; MOGUILEVSKY, 1991). Observamos, também, que nas novilhas ovariectomizadas houve maior concentração média de LH do que nas novilhas inteiras; este efeito pode ser consequência da ausência da retroalimentação negativa do estradiol ou do bloqueio da inibição gabaérgica, uma vez que, a administração de um antagonista gabaérgico tenha aumentado a secreção de LH, em ratas ovariectomizadas (LAMBERTS et al., 1983) e ovelhas adultas (SCOTT; CLARKE, 1993b). Possivelmente houve uma interação entre a estimulação de receptores esteróides e a inibição de receptores para GABA, aos 14 meses de idade. Observamos em outro experimento que as mesmas novilhas responderam positivamente ao 17 β -estradiol a partir dos 8 meses de idade (OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003). Em função do delineamento não foi possível identificar precisamente o efeito predominante.

Durante o anestro sazonal, ovelhas adultas tratadas com estradiol e bicuculina, (antagonista GABA_A) na área pré-óptica do hipotálamo, mostraram resultados variáveis quanto à secreção de LH, e seus efeitos foram influenciados pelo ciclo estral da fêmea (RECABARREN et al., 2004), sugerindo uma participação do estradiol na resposta da inibição do GABA. Em ratas a bicuculina foi inefetiva, tanto para estimular como para inibir a secreção de LH (HERBISON; DYER, 1991; MEYER; GOODMAN, 1986;).

Nas novilhas inteiras que receberam a picrotoxina, observamos aumento na área total de secreção de LH aos 14 meses; o mesmo não ocorreu nas novilhas que receberam salina. Aos 17 meses ocorreu diminuição da área total no grupo IP, evento não observado no grupo IS (Figura 15). Uma possível ação de diferentes tipos de receptores como o GABA_B e uma interação com outros neurotransmissores deve ser considerada. Os dados da literatura são distintos em relação ao modo de ação do GABA sobre a secreção de LH, podendo ser influenciado pelo tipo de receptor estimulado, pela idade, sazonalidade e fase do ciclo estral (SCOTT; CLARKE, 1993). Analisando em conjunto as idades 14 e 17 meses, podemos observar um aumento e uma diminuição na quantidade de LH secretado, quando a ação do GABA é inibida. Nos chama atenção a possibilidade do GABA exercer papel estimulatório e inibitório, sobre a secreção de LH, com o avançar da idade.

Foi demonstrado, em bovinos, uma diminuição da retroalimentação negativa ao estradiol com o aproximar da primeira ovulação. Outra interação que pode ocorrer nesse período é com o aumento da atividade inibitória dos opióides endógenos (HONARAMOOZ et al., 2000). Durante a maturação sexual de novilhas, podem ocorrer períodos de transição entre o predomínio da atividade de neurotransmissores inibitórios. Aos 14 meses de idade, o efeito inibitório do E₂ pode ter diminuído o efeito de opióides endógenos, onde não estão tão presentes, deixando evidente o efeito inibitório do GABA. Aos 17 meses, com o aumento da inibição opioidérgica, o efeito inibitório do GABA fica menos evidente novamente.

A ação da picrotoxina, nas novilhas inteiras e ovariectomizadas, não aumentou a frequência de pulsos de secreção de LH, sugerindo uma indetectável ação GABAérgica sobre a pulsatilidade de secreção de LH, em novilhas da raça Nelore, dos 8 aos 17 meses. Aparentemente a ausência de variação, na frequência de pulsos de secreção de LH, durante a maturação sexual nas novilhas, nos parece contraditório com os achados da literatura, uma vez que, de acordo com Day et al. (2006) o aumento da frequência de pulsos de secreção é um indicador da proximidade da maturidade sexual. A ausência da variação, na frequência de pulsos de secreção de LH, pode ser consequência da diferente metodologia empregada, para identificar os pulsos. A raça Nelore (*Bos indicus*) pode ser mais sensível ao manejo intensivo de coleta de sangue, apresentando diferença no limiar para o estresse, quando comparado a novilhas *Bos taurus*. Em ratas, tanto a estimulação da atividade gabaérgica (CARBONE et al., 2002; FLUGGE et al., 1986; LAMBERTS et al., 1983) quanto a inibição gabaérgica (MORELLO et al., 1989) provocaram inibição da secreção pulsátil de LH. A maioria das evidências sugere que a função inibitória do GABA, na regulação do GnRH/LH, ocorre na área pré-óptica e na região hipotalâmica anterior (DEMLING et al., 1995), regiões responsáveis pela secreção pulsátil de GnRH.

Apesar de não apresentarem variação, na frequência de pulsos de secreção de LH, as novilhas ovariectomizadas apresentaram maior área total de picos de secreção de LH que as novilhas inteiras, semelhante à área total de secreção de LH, evento descrito somente neste grupo de animais. A maior área total dos picos de secreção de LH pode sugerir, nesse período, nas novilhas ovariectomizadas, uma participação do sistema gabaérgico inibindo a secreção de LH, o que pode ser em decorrência da proximidade da primeira ovulação ou de algum fator que esteja

impedindo o início da ciclicidade, como a sazonalidade, quando a ação do GABA pode ficar mais evidente. Estes resultados sugerem que neurônios GABAérgicos podem estar associados aos esteróides gonadais exercendo uma retroalimentação negativa em neurônios produtores de GnRH, de fêmeas da raça Nelore, sexualmente imaturas; no entanto, sem um controle das novilhas ovariectomizadas fica difícil afirmar este fato. Aos 10 meses de idade, ficou evidente que as novilhas inteiras e ovariectomizadas que receberam a picrotoxina demoraram mais tempo para apresentar o maior pico de LH. A inibição gabaérgica diminuiu o tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH, nas novilhas inteiras, aos 14 meses. Ao mesmo tempo em que aumentou a quantidade de LH secretado, observado pelo aumento da concentração e da área total de secreção dos picos de LH, diminuiu o tempo necessário para o aparecimento do maior pico. A área do maior pico foi maior nas novilhas ovariectomizadas aos 14 e 17 meses, se comparado com as novilhas inteiras, podendo ser consequência da falha de supressão da secreção de LH nas ovariectomizadas, resultando em depleção dos grânulos de secreção de LH nos gonadotrofos.

A amplitude máxima dos picos de LH foi maior, nas novilhas ovariectomizadas, aos 10, 14 e 17 meses pós-administração da picrotoxina, quando comparadas com as novilhas inteiras. A maior amplitude de LH, nas novilhas ovariectomizadas, decorreu da ausência da retroalimentação negativa de esteróides gonadais. Nas novilhas inteiras, a retroalimentação negativa do E_2 pode ter diminuído a amplitude máxima dos picos de LH. Como a secreção de LH é reflexo da secreção de GnRH, é provável que a supressão do GnRH aconteça por uma diminuição na frequência dos picos, com pouca influência sobre a amplitude dos picos (DAY et al., 1987), porém observamos que a ovariectomia aumentou a amplitude de picos.

É possível que, em diferentes períodos da maturação sexual, a supressão gonadal central e periférica se alternem em importância. Foi demonstrado que o GABA atua de diferentes formas, na secreção de gonadotrofinas, durante a maturação sexual e na fase adulta em ratas. Há indícios de que as diferenças qualitativas do efeito do GABA, sobre a secreção de gonadotrofinas, possa estar relacionada à variação no tipo de receptor ativado (SZWARCFARB et al., 1994). Em ovelhas ovariectomizadas, Jackson e Kuehl (2004), não verificaram mudanças no padrão de secreção de LH, após aplicação de um antagonista gabaérgico (GABAb), semelhante aos dados obtidos no presente experimento, mas a concentração média

e a amplitude dos picos se elevaram ao se administrar um agonista de GABA_B na região médio-basal do hipotálamo, quando as ovelhas foram tratadas com estradiol.

Durante a maturação sexual, ocorrem modificações no sistema nervoso central, como a diminuição no número de receptores de estradiol localizados no hipotálamo e possivelmente a ativação de neurônios que anteriormente estavam inibidos pelo sistema gabaérgico, permitindo aumento na pulsatilidade de GnRH e LH (CARBONE et al., 2002). Um processo integrado de maturação sexual acontece com uma interação entre diferentes neurotransmissores envolvidos na puberdade (SCACCHI et al., 1998). Interações entre o sistema adrenérgico, opioidérgico e serotoninérgico têm sido demonstradas em ratas (SCACCHI et al., 1998; SULLIVAN; MOENTER, 2005), em primatas (TERASAWA, 1998), bovinos (CHANDOLIA et al., 1997; HONARAMOOZ et al., 2000) e ovinos (TORTONESE, 1999).

Levando em consideração os resultados encontrados, no presente experimento, é possível considerar que com a diminuição da retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de LH, o efeito inibitório do GABA sobre a secreção de LH ficou mais evidente, o que pode ser observado aos 14 meses. Por outro lado, nas novilhas ovariectomizadas a ausência total de inibição gonadal, sobre a secreção de LH, mascarou o efeito inibitório do GABA, por permitir uma elevação muito acentuada da secreção de LH. Houve um aumento na concentração média de LH, nas novilhas inteiras tratadas, com picrotoxina, aos 14 meses de idade. Variação não observada, nas novilhas inteiras, tratadas com salina ou nas novilhas ovariectomizadas, tratadas com a picrotoxina. Possivelmente houve uma interação entre a estimulação de receptores para esteróides e a inibição de receptores para GABA aos 14 meses de idade. Observamos em outro experimento que as novilhas respondem, positivamente, ao estradiol desde o início da maturação sexual.

Estes são os primeiros relatos da possível participação do sistema GABAérgico na inibição da secreção de LH em novilhas Nelore pré-púberes inteiras e ovariectomizadas.

6.5 CONCLUSÕES

Aceitamos a hipótese de que a inibição de receptores gabaérgicos, com a picrotoxina, modifica a secreção de LH, em novilhas Nelore pré-púberes.

- ✓ Houve um aumento da concentração média e na área total de secreção de LH, nas novilhas inteiras tratadas com a picrotoxina, aos 14 meses de idade, quando comparada com os outros meses.
- ✓ A área total dos picos de secreção de LH e área do maior pico de secreção de LH foi maior nas novilhas ovariectomizadas aos 14 e 17 meses de idade.
- ✓ Na presença ou ausência de esteróides gonadais, não houve diferença no número de picos, quando os grupos foram comparados.
- ✓ A amplitude máxima dos picos de LH foi inibida, pelo GABA, aos 10 meses nas novilhas inteiras.
- ✓ O GABA atrasou o aparecimento do maior pico, aos 10 meses de idade, nas novilhas inteiras.

7 EXPERIMENTO 2: ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO, NO BLOQUEIO DA SECREÇÃO DE LH, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

7.1 JUSTIFICATIVA

A atuação do sistema neuronal dopaminérgico, sobre a secreção de LH, foi pouco estudada. Tem sido sugerido que os opióides endógenos, conhecidos inibidores da secreção de LH, agem diretamente ou pela via catecolaminérgica (PRZEKOP; TOMASZEWSKA, 1996).

Meyer e Goodman (1985) demonstraram que, em ovinos, neurônios dopaminérgicos são importantes inibidores da secreção de GnRH, durante o anestro sazonal. Honaramooz et al. (2000), trabalhando com novilhas pré-púberes, concluíram que os efeitos supressivos dos opióides endógenos são exercidos através do bloqueio ou da inibição do sistema estimulatório dopaminérgico.

Em bovinos machos a concentração de dopamina na área pré-óptica do hipotálamo, aumenta da quinta para a décima semana de idade (RODRIGUEZ et al., 1993) e foi demonstrado que a inibição na liberação de LH ocorre, através da inibição dopaminérgica, até as 24 semanas de idade (CHANDOLIA et al., 1997).

A hipótese estudada é a de que a secreção de LH (área total de LH, número de picos, área total de pico, área do maior pico, tempo necessário para o aparecimento do maior pico e amplitude máxima dos picos) é inibida, pela dopamina, na presença ou não de esteróides gonadais, durante a fase pré-púbere, em novilhas da raça Nelore.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Animais e manejo

Foram utilizadas 15 novilhas da raça Nelore, nascidas em março de 2003 e oriundas da Agropecuária CFM, Fazenda São Francisco Magda, SP. Após serem desmamadas aos 6 meses, as novilhas foram trazidas 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. O ganho de peso foi acompanhado quinzenalmente utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

7.2.2 Ovariectomia e canulação

A ovariectomia foi realizada pela equipe cirúrgica de grandes animais do Hospital Veterinário da Unesp de Araçatuba (ver detalhes no item 5.1.1). No dia anterior à administração do sulpiride, cada novilha teve a veia jugular canulada, a fim de permitir coleta seriada de amostras de sangue, interferindo o menos possível no bem-estar dos animais (ver detalhes no item 5.1.2).

7.2.3 Delineamento Experimental.

As novilhas (n=15) foram divididas em 3 grupos com 5 animais cada: GRUPO IS: novilhas inteiras que receberam solução salina 0,9%, Grupo ISS (novilhas inteiras) e Grupo OvSS (novilhas ovariectomizadas), ambas tratadas com o sulpiride (Figura 21).

Figura 21 - Delineamento de aplicação dos tratamentos utilizados no experimento 2. Ver detalhes no texto.

7.2.4 Administração de neurotransmissor e coleta de material

O sulpiride, antagonista de receptor (D_2) dopaminérgico (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US), 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 aos 8, 12 e 16 meses de idade (HONARAMOOZ et al., 2000).

7.2.5 Radioimunoensaio para gonadotrofinas e coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH

Os ensaios para LH bovino foram adaptados dos descritos por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990), realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba. O coeficiente de variação intra e interensaio e a sensibilidade dos ensaios de LH, para o sulpiride, foram respectivamente de 11,86%; 15,51% e 0,039 ng/ml.

7.2.6 Identificação das variáveis estudadas e análise estatística

A concentração média de LH (mg/ml), no período pós-tratamento, foi calculada através da média dos valores do período pós-infusão do sulpiride (0-10 hs). Para identificação dos picos, área de secreção de LH, frequência e amplitude dos picos de secreção de LH utilizou-se o programa GrafPad Prism versão 3.00 for Windows (ver detalhes no item 5.4).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas, empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan no nível de significância de 5%. Antes de cada análise, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem às premissas, foram submetidos a várias transformações na seqüência ($\log(X+1)$; logaritmo na base 10 – $\log_{10}X$; Raiz quadrada – $RQ\ X$; Quadrado – X^2), procurando atender à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Para a descrição dos resultados, foram empregados às médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

7.3 RESULTADOS

Observamos nas novilhas ovariectomizadas um aparente aumento ($P \leq 0.05$), na concentração de LH, aos 12 e 16 meses de idade, em relação aos 8 meses (Figura 22).

A concentração média de LH, pós-administração do sulpiride, foi menor ($P \leq 0.05$) no grupo de novilhas IS e ISS aos 12 e 16 meses de idade, quando comparada ao grupo de novilhas ovariectomizadas. Aos 8 meses de idade a concentração média de LH foi menor ($P \leq 0.05$) nas novilhas inteiras que receberam o sulpiride, quando comparada aos outros meses (Figura 23).

Nas novilhas ovariectomizadas (OvSS) a área total da concentração de LH foi maior ($P \leq 0,05$), aos 12 e 16 meses, quando comparada ao grupo IS e ISS, variação semelhante à concentração média de LH. Aos 8 meses de idade não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os grupos de novilhas (Figura 24), uma vez que, a área total da concentração de LH, no grupo das novilhas ovariectomizadas, foi menor ($P \leq 0,05$) aos 8 do que aos 12 e 16 meses de idade.

A área total dos picos de secreção de LH foi menor ($P \leq 0,05$), aos 12 e 16 meses de idade, nas novilhas inteiras, quando comparados às novilhas ovariectomizadas. Aos 8 meses não houve ($P \geq 0,05$) diferença entre os grupos. Nas novilhas ovariectomizadas a área total de pico de secreção de LH, nas novilhas ovariectomizadas, foi maior aos 12 e 16 meses, em relação aos 8 meses de idade (Figura 25).

Figura 22 - Médias e erro padrão da média da concentração de LH de amostras colhidas a cada 15 min por 10 h pós-aplicação do Sulpiride em dois grupos de novilhas (inteiras – IS e ovariectomizadas - OvSS) e solução salina a 0,9% (inteiras – IS), com 8, 12 e 16 meses de idade.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 23 - Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 24 - Área total da concentração de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 25 - Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) no número de picos da secreção de LH aos 8, 12 e 16 meses de idade, quando as novilhas inteiras e ovariectomizadas que receberam o sulpiride foram comparadas ao grupo de novilhas que recebeu salina. O número de picos de secreção de LH aumentou ($P \leq 0,05$) no grupo IS, em função da idade (Figura 26).

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os grupos, na área do maior pico, aos 8 meses de idade. Aos 12 e 16 meses a área do maior pico foi maior ($P \leq 0,05$) nas

novilhas ovariectomizadas que receberam o sulpiride, se comparadas às inteiras que receberam o sulpiride ou salina. No grupo de novilhas ovariectomizadas, houve crescimento ($P \leq 0,05$) na área do maior pico de LH, em função da idade (Figura 27).

A amplitude máxima dos picos de LH foi maior ($P \leq 0,05$), nas novilhas ovariectomizadas, aos 12 e 16 meses de idade. Aos 8 meses de idade, não houve diferença ($P \geq 0,05$) quando os grupos foram comparados. Nas novilhas ovariectomizadas que receberam o sulpiride houve um aumento ($P \leq 0,05$) na amplitude LH, a partir dos 12 meses, quando comparado aos 8 de idade (Figura 28).

O tratamento com sulpiride, aos 16 meses de idade, diminuiu o tempo necessário para o aparecimento do maior pico, tanto nas novilhas inteiras quanto nas ovariectomizadas, se comparadas às novilhas que receberam salina. Aos 8 e 12 meses de idade não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os grupos. Ao analisarmos dentro de cada grupo observamos nas novilhas que receberam o sulpiride um menor tempo ($P \leq 0,05$) aos 16 meses quando comparado aos 8 e 12 meses de idade. Aos 16 meses de idade o grupo de novilhas IS e OvSS apresentaram menor tempo ($P \leq 0,05$) para que o maior pico fosse estimulado (Figura 29).

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 26 - Número de picos de secreção de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 27 - Área do maior pico de secreção de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 28 - Amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (IP; n=5) e ovariectomizadas (OvP; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 29 - Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ISS; n=5) e ovariectomizadas (OvSS; n=5) que receberam 0,57 mg/kg do sulpiride, em diferentes idades.

7.4 DISCUSSÃO

A modulação da dopamina, sobre a liberação de GnRH, ocorreu na eminência média, pela existência de sinapses entre neurônios produtores de dopamina e neurônios produtores de GnRH (KULJIS; ADVIS, 1989).

A administração do sulpiride nas novilhas inteiras não interferiu na concentração média de LH aos 12 e 16 meses, porém, aos 8 meses, houve uma menor concentração de LH, quando comparado ao grupo de novilhas ovariectomizadas. Porém, na ausência do estradiol, a concentração média de LH foi maior nas novilhas ovariectomizadas ($0,92 \pm 0,23$; $1,67 \pm 0,40$; $2,04 \pm 0,21$ ng/ml) que

nas novilhas inteiras que receberam salina ($0,50 \pm 0,09$; $0,58 \pm 0,07$; $0,51 \pm 0,05$ ng/ml) e inteiras que receberam o sulpiride ($0,40 \pm 0,04$; $0,51 \pm 0,05$; $0,52 \pm 0,03$ ng/ml), respectivamente aos 8, 12 e 16 meses de idade. A administração de um antagonista da dopamina diminuiu a secreção de LH, nas novilhas inteiras, aos 8 meses, quando comparada com os outros meses e aboliu a diferença entre novilhas ovariectomizadas e inteiras aos 8 meses, quando ambas foram tratadas com sulpiride. Convém observar que a diferença entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas ficou mais evidente aos 12 e 16 meses de idade, provavelmente consequência do estresse a que as novilhas foram expostas durante o primeiro protocolo de coleta e ainda recebendo um inibidor de dopamina, o que pode ter aumentado a resposta a prolactina (JONATHAN; HNASKO, 2006), inibindo a secreção de LH, nas novilhas ovariectomizadas. Honaramooz et al. (2000), também não encontraram aumento na secreção de LH em novilhas inteiras (do 1º ao 9º mês de idade após a administração do sulpiride); por outro lado, em ovinos machos, a administração do sulpiride aumentou a secreção de LH durante períodos de dias longos, mas não alterou a concentração plasmática durante períodos de dias curtos (TORTONESE; LINCOLN, 1994).

A área total de secreção de LH teve um comportamento semelhante à concentração média de LH. A maior área de concentração de LH, nas novilhas ovariectomizadas, foi provavelmente resultado da ausência da retroalimentação negativa exercida pelo estradiol, mas este efeito não ficou evidente, aos 8 meses de idade, quando as novilhas ovariectomizadas foram tratadas com sulpiride. Apesar de aparentemente não influenciar a secreção de LH em novilhas, o sistema dopaminérgico exerceu inibição, na secreção de LH, em vários estudos com ovelhas (CURLEWIS et al., 1991; MEYER; GOODMAN, 1995; TORTONESE, 1999; TORTONESE; LINCOLN, 1994). A maioria dos trabalhos abordando o efeito dopaminérgico, em fêmeas de ruminantes, foram conduzidos com ovelhas, e os resultados variaram em função da estação do ano, dose administrada e fase do ciclo estral (CHOMICKA, 1992; DAILEY et al., 1987; GALLEGOS-SANCHES et al., 1998).

Apesar das novilhas ovariectomizadas, normalmente, apresentarem maior concentração plasmática de LH que as novilhas inteiras, aos 8 meses de idade não observamos diferença na área total de secreção de LH e área total dos picos de secreção de LH entre os grupos de novilhas inteiras e ovariectomizadas, sugerindo que, aos 8 meses a utilização de um antagonista de dopamina é capaz de igualar a

área total de concentração de LH e área total dos picos de secreção de LH entre novilhas inteiras e ovariectomizadas (Figura 23 e 24). Pode ser que nesse período a dopamina exerça efeito estimulatório sobre a secreção de LH e o bloqueio de seus receptores não permitiu aumento da concentração média de LH, nas novilhas ovariectomizadas.

Aos 8, 12 e 16 meses de idade, não houve diferença no número de picos de secreção de LH, entre os grupos, após a administração de um antagonista de receptor D_2 da dopamina. Nas novilhas que receberam salina houve um aumento no número de picos em função da idade, o que não foi observado nas novilhas tratadas. Esses resultados sugerem que a dopamina (através de receptores D_2) parece exercer função estimuladora sobre a secreção de LH em novilhas pré-púberes, situação evidenciada aos 8, 12 e 16 meses de idade. Em ovelhas ovariectomizadas, um antagonista da dopamina (pimozide), bloqueou os picos de LH induzido pelo 17β -estradiol (JACKSON¹, 1977 apud DEEVER; DAILEY, 1982, p. 624). Durante o anestro sazonal de ovelhas, a administração de um antagonista da dopamina não aumentou a frequência de picos de LH (MEYER; GOODMAN, 1985), embora Misztal et al. (2004), tenham observado aumento da frequência de pulsos. Porém, na presença do estradiol (implante) a frequência pulsátil de LH aumentou, quando um antagonista da dopamina foi administrado em ovelhas ovariectomizadas (SÁNCHEZ et al., 1998).

Embora a frequência de picos de secreção de LH (Figura 26) não tenha sido diferente entre os grupos, a quantidade de LH secretada na área do maior pico (Figura 27) e área total de picos (Figura 28) foi maior, nas novilhas ovariectomizadas, somente aos 12 e 16 meses. O aumento na frequência de picos pode ter sido inibida pela administração do sulpiride, bloqueando receptores dopaminérgicos aos 8 meses de idade. Esperávamos que a ausência das gônadas, conseqüentemente a ausência da retroalimentação negativa de estradiol resultasse no aumento da frequência de picos, além de aumentar a quantidade de secreção de LH, durante todo o período pré-pubertal, parecendo contraditório com os achados da literatura que obtiveram aumento na frequência de pulsos, após a ovariectomia em novilhas pré-púberes (DAY et al., 1984; RODRIGUES et al., 2002).

¹JACKSON, G. L. Effect of adrenergic blocking drugs on secretion luteinizing hormone in the ovariectomized ewe. *Biology of Reproduction*, v. 16, p. 543-548, 1977.

Aos 8 meses de idade, a amplitude máxima dos picos de secreção de LH não foi influenciada pela administração do sulpiride nas novilhas inteiras, porém uma maior amplitude dos picos de LH ocorreu, nas novilhas ovariectomizadas, aos 12 e 16 meses de idade, conseqüência provável da ausência da retroalimentação negativa exercida pelo estradiol ou a ausência de diferença aos 8 meses de idade, provável conseqüência do bloqueio exercido pela dopamina. Podemos supor isso uma vez que Chandolia et al. (1997), obtiveram decréscimo na amplitude dos pulsos de LH, em bezerros da raça Hereford, com 24 meses de idade, após a administração de um antagonista da dopamina, semelhante ao ocorrido, aos 8 meses de idade.

Observamos, na figura 31, que o tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH diminuiu, nas novilhas ovariectomizadas, aos 16 meses. A diminuição do tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH sugere um aumento na freqüência de pulsos de secreção que não foi constatada pela variação no número de picos, ou possivelmente aumento da sensibilidade do hipotálamo ao efeito inibitório da dopamina. Com o avançar da idade, mesmo nas novilhas ovariectomizadas, esperava-se um aumento na freqüência de pulsos de secreção de LH. No entanto como a secreção de LH nessa fase de maturação sexual é errátil e inconstante, o intervalo de coleta seriada menor que 24 horas pode levar a resultados inconclusivos (DODSON et al., 1988). Também é possível que o sistema dopaminérgico, aos 16 meses de idade, esteja exercendo inibição sobre a secreção de LH, uma vez que a administração do sulpiride reduziu o tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH.

Aos 8 meses de idade, a amplitude máxima de LH não foi influenciada pela administração do sulpiride, nas novilhas inteiras e ovariectomizadas, porém uma maior amplitude dos picos de LH ocorreu nas novilhas ovariectomizadas aos 12 e 16 meses de idade, conseqüência provável da ausência da retroalimentação negativa exercida pelo estradiol, ou de bloqueio do efeito inibitório da dopamina evidenciado pelo uso de um antagonista da dopamina.

A interação com outros neurotransmissores deve ser discutida e estudada. Em ovelhas, a combinação de um antagonista da dopamina com um antagonista de opióides aumentou a secreção de LH (HAYNES et al., 1989). Porém, em ovinos, a dopamina inibiu a secreção de opióides endógenos (TORTONESE, 1999). A ação inibitória dos opióides endógenos ocorre, através do sistema dopaminérgico, em ratos (HOLLT; BERGMANN, 1982; LOCATELLI et al., 1983; RASMUSSEN, 1991) e

humanos (ROPERT et al., 1984); a dopamina pode ainda inibir a secreção de LH diretamente na hipófise (DAILEY et al., 1987). Segundo Honaramooz et al. (2000) os experimentos conduzidos com novilhas indicam que os opióides endógenos, através de neurônios dopaminérgicos, atuam de forma indireta sobre os neurônios produtores de GnRH; o mesmo efeito foi observado em machos (CHANDOLIA et al., 1997). O bloqueio de receptores de dopamina pode aumentar a secreção de β -endorfina o que suprime o eixo hipotálamo-hipófise-gonadas; essa cascata de eventos pode ter suprimido a secreção de LH, aos 8 meses de idade. Com o avançar da idade, o efeito inibitório opioidérgico diminui, tornando essa observação menos evidente.

A remoção de fatores inibitórios, como os opióides endógenos, pode favorecer o efeito estimulatório da dopamina, sobre os neurônios produtores de GnRH (HONARAMOOZ et al., 2000).

Até o presente momento estes são os primeiros relatos do envolvimento do sistema dopaminérgico, sobre a secreção de LH, em novilhas da raça Nelore, durante a fase pré e peri-púbere.

7.5 CONCLUSÕES

Rejeitamos a hipótese de que a secreção de LH é inibida pela dopamina, em alguns períodos. Na ausência de esteróides gonadais, a supressão de receptores de dopamina diminuiu a secreção de LH:

- ✓ A administração do sulpiride (inibidor D_2) diminuiu a secreção de LH (concentração média, área total, área total dos picos e área do maior pico secreção de LH) nas novilhas ovariectomizadas, aos 8 meses de idade, sugerindo nesta idade estímulo da dopamina, na secreção de LH, na ausência de esteróides gonadais, ou a ação de um maior efeito inibitório do sistema opioidérgico, liberado pelo bloqueio de receptores de dopamina.

- ✓ O tratamento com sulpiride diminuiu a amplitude máxima dos picos de secreção de LH, aos 8 meses de idade, nas novilhas ovariectomizadas.
- ✓ O bloqueio de receptor D₂ diminuiu o tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH, aos 16 meses, sugerindo que, nessa idade, a dopamina possa estar agindo de maneira inibitória, sobre a pulsatilidade de secreção de LH.

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

8.1 JUSTIFICATIVA

A participação do sistema adrenérgico, controlando a secreção e a pulsatilidade de hormônios hipotalâmicos e gonadotróficos, tem sido relatada em bovinos (BORROMEO et al., 1995; HONARAMOOZ et al., 2000), ovinos (THOMAS et al., 1994), ratas (ANSELMO-FRANCI et al., 1997; SALICIONI et al., 1997) e humanos (LAL et al., 1975). As primeiras evidências que neurônios noradrenérgicos podem participar das vias liberadoras de GnRH foram providas por Sawyer et al.¹ (1947 apud HERBISON, 1997, p. 120), mostrando que a ovulação, em coelhos, foi bloqueada pela administração de um antagonista de receptores alfa adrenérgico. A inervação noradrenérgica do hipotálamo é extrínseca e se origina em corpos celulares localizados em regiões como o *Locus ceruleus* (LC), que pode controlar a secreção de LH. Lesões no LC induziram um decréscimo de norepinefrina na área pré-óptica e na eminência média hipotalâmica, inibindo a pulsatilidade de LH em ratas ovariectomizadas (ANSELMO-FRANCI, 1999). Além do LH, há evidências de que a norepinefrina também modula a secreção do hormônio do crescimento (GH) e prolactina (PRL), (LAL et al., 1975).

A hipótese estudada foi a de que a secreção de LH (área total de LH, número de picos, área total de pico, área do maior pico, tempo necessário para o aparecimento do maior pico e amplitude máxima dos picos) é estimulada pelo sistema adrenérgico, na presença ou não de esteróides gonadais, durante a fase pré-púbere, em novilhas da raça Nelore.

¹SAWYER, C. H.; MARKEE, J. E.; HOLLINGSHEAD, W. H. Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinology*, v. 41, p. 395-402, 1947.

8.2 MATERIAL E MÉTODO

8.2.1 Animais e manejo

No presente experimento foram utilizadas 15 novilhas da raça Nelore, nascidas em março de 2003 e oriundas da Agropecuária CFM, Fazenda São Francisco, Magda, SP. Após serem desmamadas, aos 6 meses de idade, as novilhas foram trazidas 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. O ganho de peso foi acompanhado quinzenalmente utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

8.2.2 Ovariectomia e canulação

A ovariectomia foi realizada pela equipe cirúrgica de grandes animais do Hospital Veterinário da Unesp de Araçatuba (ver detalhes no item 5.1.1). No dia anterior à administração do sulpiride, cada novilha teve a veia jugular canulada, a fim de permitir coleta seriada de amostras de sangue, interferindo o menos possível no bem-estar dos animais (ver detalhes no item 5.1.2).

8.2.3 Administração de neurotransmissor e coleta de material

A clonidina (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US) é um agonista específico de receptor α -2-adrenérgico e foi usada na dosagem de 10 $\mu\text{g/kg}$, 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.

8.2.4 Delineamento Experimental.

As novilhas (n=15) foram divididas em 3 grupos com 5 animais cada: GRUPO IS: novilhas inteiras que receberam solução salina 0,9%, Grupo ICL (novilhas inteiras) e Grupo OvCL (novilhas ovariectomizadas), ambas tratadas com 10 $\mu\text{g/kg}$ da clonidina (Figura 30).

Figura 30 - Delineamento de aplicação dos tratamentos e do período de coleta de amostras durante o experimento 3.

8.2.5 Radioimunoensaio para gonadotrofinas, coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH

Os ensaios para LH bovino foram adaptados dos descritos por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990), realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do Curso de Veterinária da Unesp de Araçatuba. O coeficiente de variação intra e interensaio e a sensibilidade dos ensaios de LH, para a clonidina, foram respectivamente de 19,29%; 21,50% e 0,05 ng/ml.

6.2.6 Identificação das variáveis estudadas e análise estatística

A concentração média de LH (ng/mL) do pós-tratamento foi calculada através da média dos valores do período pós-infusão da clonidina (de 0 a 4 hs). Para identificação dos picos, área de secreção de LH, frequência e amplitude dos picos de secreção de LH utilizou-se o programa GrafPad Prism versão 3.00 for Windows (ver detalhes no item 5.4).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas, empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, 1998). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, no nível de significância de 5%. Antes de cada análise, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem às premissas, eram submetidos a várias transformações na seqüência ($\log(X+1)$; logaritmo na base 10 – $\log_{10}X$; Raiz quadrada – RQ X ; Quadrado – X^2), procurando atender à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Para a descrição dos resultados, foram empregadas às médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais. O número de picos não se mostrou adequado quanto à normalidade dos resíduos, mesmo após as transformações citadas anteriormente. Utilizou-se, então, o teste não paramétrico de Friedman (medidas repetidas) para comparação dentro de cada grupo e o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos. Para a descrição dos resultados, foram

empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

8.3 RESULTADOS

Não houve efeito aparente da clonidina sobre a concentração de LH média dos grupos de novilhas inteiras tratadas ou não ($P \geq 0,05$), aos 8, 12 e 15 meses de idade (Figura 31). A concentração média de LH, nas novilhas OvCI, foi maior que as novilhas inteiras que receberam solução salina e inteiras que receberam a clonidina, aos 8, 12 e 15 meses (Figura 32).

Aos 8 meses de idade, não houve diferença entre os grupos ($P \geq 0,05$), em relação à área total de secreção de LH. Aos 12 meses, houve uma menor ($P \leq 0,05$) área total de secreção de LH nas novilhas inteiras que receberam clonidina, quando comparado às novilhas ovariectomizadas. Os grupos de novilhas IS e ICI com 15 meses de idade apresentaram menor área total de secreção de LH ($P \geq 0,05$) que o grupo das novilhas OvCI (Figura 33).

Figura 31 - Concentração de LH (Média $\pm$ EPM) de amostras colhidas, a cada 15 min, por 4 h pós-aplicação da solução salina a 0,9% (inteiras salina - IS) e da Clonidina a 10 μ g/kg, em dois grupos de novilhas (inteiras - ICL e ovariectomizadas - OvCI) aos 8, 12 e 15 meses de idade. A seta indica o momento da aplicação da salina ou clonidina.

^{A,B,C} médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 32 - Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICl; n=5) e ovariectomizadas (OvCl; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 33 - Área total de secreção de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) de novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

Aos 8 meses, a área total dos picos de secreção de LH foi maior ($P \leq 0,05$) nas novilhas ICL que receberam a clonidina, quando comparado às novilhas IS que receberam salina. Aos 12 meses de idade, não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os grupos e aos 15 meses de idade observamos, nas novilhas OvCL, que a área total de picos foi maior ($P \leq 0,05$), quando comparada com as novilhas ICL. (Figura 34).

Aos 8 meses de idade, o número de picos nas novilhas ovariectomizadas foi estatisticamente menor ($P \leq 0,05$), quando comparado às novilhas inteiras que

receberam salina e a clonidina. Nas ovariectomizadas, houve um aumento ($P \leq 0,05$) no número de picos, em função da idade (Figura 35).

Nas novilhas ovariectomizadas a área do maior pico de secreção de LH aumentou ($P \leq 0,05$), entre 8 e 15 meses de idade. Aos 8 meses de idade, a área do maior pico nas novilhas inteiras que receberam a clonidina foi maior ($P \leq 0,05$) que nas novilhas inteiras que receberam salina e nas ovariectomizadas, e aos 15 meses de idade as novilhas OvCI apresentaram maior área do maior pico ($P \leq 0,05$) que as novilhas inteiras que receberam a clonidina (Figura 36).

Quando os grupos foram comparados, quanto à amplitude máxima dos picos de secreção de LH, não houve diferença ($P \geq 0,05$) aos 8 meses de idade. Aos 12 meses as novilhas ovariectomizadas apresentaram maior amplitude de secreção de LH ($P \leq 0,05$) que as novilhas inteiras que receberam a clonidina e aos 15 meses foi maior ($P \leq 0,05$) nas ovariectomizadas, quando comparado às novilhas inteiras que receberam salina e a clonidina. A amplitude máxima de LH aumentou ($P \leq 0,05$), em função da idade, nas novilhas ovariectomizadas (Figura 37).

Aos 8 meses de idade, não houve diferença entre o intervalo entre a administração da clonidina e o momento de ocorrência do maior pico de secreção de LH. Nas novilhas OvCL, com 12 meses de idade, o maior pico aconteceu mais rapidamente do que nas novilhas IS que receberam salina (Figura 38). Aos 15 meses, a administração da clonidina diminuiu ($P \leq 0,05$) o tempo necessário para o aparecimento do maior pico de LH, nas novilhas inteiras e ovariectomizadas, quando comparado ao grupo que recebeu salina. O tempo necessário para que o maior pico fosse estimulado aumentou ($P \leq 0,05$), em função da idade, nas novilhas inteiras que receberam salina (Figura 38).

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 34 - Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

^{a,b,c} médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Friedman.

Figura 35 - Número de picos de secreção de LH (valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento, em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 36 - Área do maior pico de secreção LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 37 - Amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 38 - Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam solução salina a 0,9%, inteiras (ICL; n=5) e ovariectomizadas (OvCL; n=5) que receberam 10 μ g/kg da clonidina, em diferentes idades.

8.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a concentração média de LH, pós-administração da clonidina (agonista α -adrenérgico), em novilhas da raça Nelore, foi maior nas novilhas ovariectomizadas, sugerindo uma maior secreção de LH, na ausência das gônadas, quando comparada com as novilhas inteiras (Figura 32). Essas diferenças se repetiram, no 12º e 15º mês de idade, na área total da secreção de LH, nas novilhas ovariectomizadas, sendo que, aos 8 meses de idade não houve diferença entre os grupos. As observações reforçam um aumento na estimulação da secreção

de LH, à medida que as novilhas tornaram-se mais velhas, ficando mais evidente, após o 8º mês de idade (Figura 33).

A primeira evidência, em ratos, que neurônios noradrenérgicos podem atuar inibindo ou estimulando a secreção de GnRH foi provida por Sawyer et al.² (1947 apud HERBISON, 1997, p. 120). Há indícios que o efeito estimulatório de agonistas adrenérgicos, sobre a secreção de LH, seja através de alfa receptores (ESTES et al., 1982), com a participação da progesterona produzida pela adrenal, ativando vias adrenérgicas e modulando neurotransmissores envolvidos na secreção de LH (SALICIONI et al., 1997). Em novilhas da raça Holandesa a administração da clonidina não interferiu na concentração circulante de LH (GOREWIT et al., 1981). Cabras infectadas por *Trichomonas congolense* não responderam à clonidina, quando a concentração de LH foi analisada, porém responderam ao GnRH, mostrando integridade do eixo hipotálamo-hipófise (NG'WENA et al., 1997). Em nosso experimento, a concentração de LH pós clonidina foi maior nas novilhas Nelore ovariectomizadas, embora visualmente (pré-tratamento) tenha havido uma diminuição na concentração de LH, a partir do 12º mês de idade nesse grupo, mais evidente em função da concentração mais elevada de LH (na ausência de gônadas, Fig. 31). Em humanos, quando receptores alfa adrenérgicos foram estimulados pela clonidina, não houve efeito sobre a secreção sérica de LH (LAL et al., 1975), mas em ratas ovariectomizadas a administração da clonidina aumentou a secreção de LH (ESTES et al., 1982), enquanto que, em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol diminuiu a secreção (YAMADA et al., 2006).

Quanto ao número de picos de secreção de LH, apenas com 8 meses de idade, as novilhas inteiras tratadas apresentaram maior número de picos que as ovariectomizadas tratadas. Diferente das ratas ovariectomizadas, onde a administração da clonidina não alterou a frequência de picos de LH (YAMADA et al., 2006), no presente experimento, as novilhas ovariectomizadas, aos 8 meses de idade, apresentaram menor número de picos. A ação da clonidina sobre a secreção de LH pode ter resultado em ausência de diferença entre novilhas inteiras e ovariectomizadas aos 12 e 15 meses de idade, possivelmente diminuindo o número de picos de secreção de LH, nas novilhas ovariectomizadas (Figura 35). Apesar do

² SAWYER, C. H.; MARKEE, J. E.; HOLLINGSHEAD, W. H. Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinology*, v. 41, p. 395-402, 1947.

número de picos (frequência de pulsos) não aumentar, em função da idade, nas novilhas inteiras, diferente do esperado (DAY et al., 1994; RODRIGUES et al., 2000) a área total dos picos de secreção de LH apresentou um comportamento interessante. Nas novilhas inteiras, aos 8 meses de idade, após a administração da clonidina observamos maior secreção da área total dos picos, quando comparado a novilhas inteiras que receberam salina. Este comportamento se inverteu, quando as novilhas ficaram mais velhas. A clonidina que estimulou a secreção, aos 8 meses, nas novilhas inteiras, aos 15 meses, aparentemente inibiu, quando comparado às ovariectomizadas, não diferenciando do grupo que recebeu salina (Figura 34). Uma importante região noradrenérgica do SNC que modula a secreção de GnRH/LH é o locus ceruleus. A lesão deste diminui a quantidade de norepinefrina na área pré-óptica medial e no hipotálamo médio basal, bloqueando a pulsatilidade em ratas ovariectomizadas (ANSELMO-FRANCI et al., 1997; ANSELMO-FRANCI et al., 1999). É possível que o efeito da clonidina diminua a quantidade de norepinefrina secretada, bloqueando a pulsatilidade de LH que deveria aumentar com o decorrer da idade e com a maturação sexual.

Ao analisarmos a variação na área do maior pico de secreção de LH, fica evidente que não houve diferença, entre os grupos aos 12 meses de idade. A área do maior pico foi maior, nas novilhas inteiras, aos 8 meses e menor 15 meses, sugerindo um efeito estimulatório e inibitório da clonidina, em função da idade, embora o número de picos não tenha sido diferente, entre os grupos, aos 15 meses de idade. Chama atenção que o menor número de picos se refletiu, na menor área do maior pico, aos 8 meses de idade, nas novilhas ovariectomizadas. Como as novilhas ovariectomizadas já apresentavam uma concentração de LH mais elevada que as inteiras, esperava-se que houvesse um efeito estimulatório também neste grupo e que a área do maior pico de secreção de LH fosse maior que nas novilhas inteiras. Como isso não ocorreu é possível que haja um efeito inibitório da clonidina sobre a pulsatilidade e área do maior pico de secreção de LH, aos 8 meses de idade, na ausência de esteróides gonadais. (Figura 36).

Quando a amplitude máxima dos picos de secreção de LH é analisada, notamos que o efeito inibitório da clonidina aconteceu, principalmente, na presença de esteróides gonadais (novilhas inteiras), aos 12 e 15 meses de idade, apesar do número de picos não ter diferido nesta idade entre os grupos; efeito semelhante quando um agonista de receptor alfa 1-adrenérgico foi utilizado em ratas (BERGEN;

LEUNG, 1986). A amplitude máxima dos picos de LH foi maior, após a aplicação da clonidina, em ratas ovariectomizadas (YAMADA et al., 2006), semelhante aos nossos resultados. A ação inibitória pode ser exercida via ativação de alfa e beta adrenoreceptores (FRANCIS PAU et al., 1998; LEUNG et al., 1982; PI, 1999), neste experimento, na presença de esteróides gonadais.

Com relação ao tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH, observamos que nas novilhas inteiras que receberam salina, o tempo necessário para a ocorrência do primeiro pico aumentou com a idade. Esperávamos que, à medida que as novilhas ficassem mais velhas, houvesse um aumento na frequência de picos de secreção de LH, o que repercutiria em um menor intervalo entre o tratamento e o primeiro pico. No entanto, como a primeira ovulação ocorreu mais tarde que o esperado, é possível que, com 15 meses, esses animais ainda estivessem distantes da primeira ovulação. Por outro lado, nas novilhas ovariectomizadas, tratadas com a clonidina, o tempo necessário para o aparecimento do primeiro pico diminuiu, em função da idade. Isso pode ser consequência da ação da clonidina ou da ação de outros agentes estimulatórios, nessas novilhas, sem gônadas, sem esteróides, com menor retroalimentação negativa. Observa-se, aos 15 meses, menor tempo necessário para o primeiro pico nas novilhas ovariectomizadas tratadas; entretanto, se houvesse um aumento na frequência de picos, intrínseco à idade nas novilhas ovariectomizadas, isso deveria se refletir em aumento do número de picos, o que não foi observado. Notamos, novamente, a possibilidade de um possível aumento da sensibilidade estimulatória adrenérgica, com o avançar da idade, mais evidente nas novilhas ovariectomizadas (Figura 38).

Há a suposição de que a falta de seleção das novilhas Nelore (ELER et al., 2002) associada a cruzamentos inseridos na raça (MEIRELLES et al., 1999) pode gerar diferenças de respostas e características fisiológicas entre animais, dificultando pesquisa, com número reduzido destes. Não está claro que a liberação pulsátil de LH seja direcionada exclusivamente pela liberação pulsátil de GnRH, pelo hipotálamo (KORDAN et al., 1994), podendo também ser influenciada por neurotransmissores, como os alfa-adrenérgicos, agindo diretamente na hipófise.

8.5 CONCLUSÕES

Rejeitamos a hipótese de que a secreção de LH é estimulada pelo sistema adrenérgico, durante a fase pré-púbere, em novilhas Nelore.

- ✓ Aos 8 meses de idade, o tratamento com a clonidina aumentou a área total dos picos de secreção de LH, nas novilhas inteiras, quando comparado ao grupo que recebeu salina.
- ✓ Na presença de esteróides gonadais, a clonidina estimulou a área do maior pico de secreção de LH, aos 8 meses de idade.
- ✓ Aparentemente, aos 8 meses de idade, o sistema alfa-adrenérgico possui um efeito inibitório, sobre a área total dos picos de secreção de LH, na ausência de esteróides gonadais.
- ✓ A área total de secreção de LH foi maior nas novilhas ovariectomizadas, aos 12 e 15 meses de idade.
- ✓ O número de picos foi menor pós-administração da clonidina nas novilhas ovariectomizadas, com 8 meses de idade.
- ✓ Aos 12 e 15 meses de idade, a clonidina inibiu a amplitude máxima dos picos de secreção de LH, nas novilhas inteiras.
- ✓ Na ausência de esteróides gonadais, o tratamento com a clonidina diminuiu o tempo necessário para o aparecimento do maior pico, aos 12 e 15 meses de idade.

9 EXPERIMENTO 4: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LH, AO LONGO DO TEMPO, EM NOVILHAS NELORES PRÉ-PÚBERES, APÓS O TRATAMENTO COM O 17 β -ESTRADIOL

9.1 JUSTIFICATIVA

Durante o ciclo estral de vacas e novilhas ocorre um aumento na concentração plasmática de estrógenos, precedendo a onda pré-ovulatória de LH (NAKADA et al., 2001). A administração do 17 β -estradiol (E₂), em novilhas peri-púberes ou ovariectomizadas, provoca uma onda pré-ovulatória de LH (BOLT et al., 1990). Através de estudos em ovinos, foi constatado que o núcleo ventromedial hipotalâmico é o sítio responsável pela estimulação da secreção de GnRH, pelos esteróides gonadais (SCOTT et al., 2000).

Por outro lado, em novilhas pré-púberes, o estradiol produzido pelos folículos ovarianos é um potente fator ovariano que inibe a secreção cíclica do LH (DAY et al., 1984; DODSON et al., 1988). Com o aproximar da puberdade (1ª ovulação) ocorre um decréscimo na sensibilidade à retroalimentação negativa exercida pelo estradiol, sobre a secreção de GnRH (KINDER et al., 1995). A concentração plasmática do E₂ permanece baixa até um mês antes da puberdade, e então, gradualmente aumenta até o momento da primeira ovulação (NAKADA et al., 2000).

O declínio na retroalimentação negativa, exercida pelo estradiol, sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, em novilhas na pré-puberdade, foi associado ao declínio no número de receptores, para o estradiol, no hipotálamo e na hipófise, aumentando a pulsatilidade de LH (DAY et al., 1987). Por outro lado, a primeira ovulação é precedida por uma retroalimentação positiva do estradiol, sobre o eixo hipotálamo-hipófise, permite uma onda pré-ovulatória de LH e estimula a ovulação do maior folículo na novilha. O aumento da retroalimentação positiva ao estradiol, no eixo hipotálamo-hipófise, em novilhas próximo da puberdade, pode desencadear a primeira ovulação (NAKADA et al., 2001).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar as mudanças na secreção de LH, ocasionadas pela administração do estradiol, em novilhas pré-púberes da raça Nelore, durante o desenvolvimento sexual. Testamos a hipótese de que há uma mudança no padrão de resposta da secreção de LH, após o tratamento com E₂, ao longo da maturação sexual de novilhas da raça Nelore.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1 Animais e manejo

Foram utilizadas 10 novilhas da raça Nelore, nascidas em março de 2003 e oriundas da Agropecuária CFM, Fazenda São Francisco Magda, SP. Após serem desmamadas, aos 6 meses, as novilhas foram trazidas 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. O ganho de peso foi acompanhado, quinzenalmente, utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

9.2.2 Ovariectomia e canulação

A ovariectomia foi realizada pela equipe cirúrgica de grandes animais do Hospital Veterinário da Unesp de Araçatuba (ver detalhes no item 5.1.1). No dia anterior à administração do sulpiride, cada novilha teve a veia jugular canulada, a fim de permitir coleta seriada de amostras de sangue, interferindo o menos possível no bem-estar dos animais (ver detalhes no item 5.1.2).

9.2.3 Administração de neurotransmissor e coleta de material

Utilizaram-se 2 μ g/kg do 17 β -estradiol (E₂-Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, US) administrado por via endovenosa, adaptado do descrito por Nakada et al. (2001). Antes da administração do E₂, foram realizadas 5 coletas de sangue a cada 15 min, com finalidade de adaptar o animal e diminuir o estresse ocasionado pela manipulação. Após a administração do E₂, amostras de sangue foram coletadas a

cada 15 min, por 3 h, a cada hora, por 7 h e a cada 3 h por 21 h, aos 10, 13 e 17 meses de idade.

9.2.4 Delineamento Experimental

As novilhas foram divididas em 2 grupos (Figura 39): GRUPO IE (novilhas inteiras) e Grupo OvE (novilhas ovariectomizadas) que receberam o 17 β -estradiol.

Figura 39 - Delineamento com o tratamento e o intervalo de coleta das amostras de sangue utilizadas no experimento 4.

9.2.5 Radioimunoensaio para gonadotrofinas, coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH

Os ensaios para LH bovino foram adaptados dos descritos por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990), realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do Curso de Veterinária da Unesp de Araçatuba. O coeficiente de variação intra e interensaio e a sensibilidade dos ensaios de LH, para o E₂, foram respectivamente de 14,41%; 18,38% e 0,05 ng/ml.

9.2.6 Identificação das variáveis estudadas e análise estatística

A concentração média de LH (ng/ml) do pós-tratamento foi calculada através da média dos valores do período pós-infusão do E₂ (0-32 hs). Para identificação das características da secreção de LH, utilizou-se o programa GrafPad Prism (ver detalhes no item 5.4).

Os resultados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, 1998). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, no nível de significância de 5%. Antes de cada análise os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem às premissas, foram submetidos a várias transformações na sequência (Log (X+1); logaritmo na base 10 – Log₁₀X; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X²), procurando atender à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Para a descrição dos resultados, foram empregados as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

9.3 RESULTADOS

Após o tratamento com E₂, todas as novilhas, dos 10 aos 17 meses, apresentaram uma supressão seguida de um aumento significativo na secreção de LH (Figura 40).

Na figura 41 estão representados os valores médios de secreção de LH, nos dois grupos de novilhas em função do tempo, comparando a secreção aos 10, 13 e 17 meses de idade. Somente aos 10 meses de idade, a concentração média de LH, das novilhas ovariectomizadas pós-administração do 17 β -estradiol, foi maior ($P \leq 0,05$); quando comparado ao grupo de novilhas inteiras, aos 13 e 17 meses, o tratamento com E₂ diminuiu a diferença entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas.

A área total de secreção de LH foi maior ($P \leq 0,05$), nas novilhas ovariectomizadas, que nas novilhas inteiras, aos 10 meses de idade. Quando o grupo de novilhas inteiras foi comparado em função do tempo, a área total de secreção de LH foi maior, aos 13 e 17 meses ($P \leq 0,05$), que aos 8 meses de idade (Figura 42).

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) na área total de picos de secreção de LH, no número de picos e área do maior pico, entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas e entre os meses em um mesmo grupo (Figuras 43 a 45).

A amplitude máxima do pico de LH foi maior ($P \leq 0,05$), nas novilhas ovariectomizadas, aos 8 meses de idade. Houve nas novilhas inteiras uma maior amplitude de LH ($P \leq 0,05$) aos 13 meses do que aos 10 meses de idade; a amplitude do pico de LH, após o tratamento com o 17 β estradiol, gradualmente tornou-se maior com a idade (Figura 46).

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os grupos e entre as idades no tempo necessário para a ocorrência do maior pico (Figura 47).

Figura 40 - Concentração de LH (média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (I; n=5) e ovariectomizadas (Ov; n=5), após a administração do 17 β -estradiol aos 10, 13 e 17 meses de idade.

^{A,B,C} médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 41 -. Concentração média de LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 42 - Área total de secreção de H (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 43 - Área total dos picos de secreção de LH (ng/mL x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n= 5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

^{A,B,C} médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 44 - Número de picos de secreção LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 45 - Área do maior pico de LH (ng/ml x min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 46 - Variação na amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) entre novilhas Nelores pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

A,B,C médias seguidas de letras diferentes diferem, entre os grupos, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

a,b,c médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 47 - Tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH (min, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IE; n=5) e ovariectomizadas (OvE; n=5) que receberam 2 μ g/kg do 17 β -estradiol, em diferentes idades.

9.4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, várias pesquisas foram realizadas, em novilhas, com o intuito de se avaliar a resposta da secreção de LH, em relação ao tratamento com estrógeno e progesterona (ANDERSON et al., 1996; BO et al., 2000; IMWALLE et al., 1998; NAKADA et al., 2000; PATTERSON et al., 1990). Podemos observar, na figuras 41 e 42, que as novilhas ovariectomizadas apresentaram maior concentração média e área total de secreção de LH, que as novilhas inteiras somente aos 10 meses de idade. As novilhas ovariectomizadas normalmente apresentam

concentração de LH mais elevada que as novilhas inteiras, em função da ausência da retroalimentação negativa das gônadas sobre a secreção de LH (NAKADA et al., 2000). Interessante que, nesta situação, provavelmente, podem ter acontecido dois eventos: a secreção de LH após a administração do E₂ foi menos suprimida aos 10 meses nas novilhas ovariectomizadas ou as novilhas inteiras responderam mais ao efeito estimulador do E₂, à medida que ficaram mais velhas.

A área total de secreção de LH aumentou com a idade, após a administração do 17 β -estradiol, nas novilhas inteiras, mas não nas ovariectomizadas (Figura 42). Aparentemente a estimulação provocada pela administração de estradiol, sobre a secreção de LH, foi maior nas novilhas inteiras que nas novilhas ovariectomizadas, em função do tempo. Acreditamos que, nas novilhas ovariectomizadas, o maior efeito da administração do E₂ foi a retroalimentação negativa, uma vez que, em função da idade, não foi possível observar aumento na área total de secreção de LH, nas novilhas desse grupo. Em outros experimentos, foi observado um aumento fisiológico na concentração de LH, em novilhas Nelore pré-púberes, em função da idade (NOGUEIRA et al., 2004).

Nos bovinos, o número de receptores para estradiol não se alterou no hipotálamo anterior, hipotálamo médio basal e na hipófise anterior, do nascimento até 50 dias antes da primeira ovulação, porém houve um decréscimo no número de receptores próximo ao momento em que ocorreu a primeira ovulação (DAY et al., 1987), sugerindo que, do nascimento à primeira ovulação, existem receptores para o estradiol no hipotálamo. Durante o período pré-púbere na novilha, foi observado um aumento na concentração de estradiol, tanto no soro quanto no fluido folicular (DODSON et al., 1988; EVANS et al., 1994) mantendo a retroalimentação negativa exercida pelo estradiol sobre a secreção de GnRH e LH, no hipotálamo e na hipófise, respectivamente. No período pré-púbere, a retroalimentação negativa exercida foi considerada o principal fator responsável pela contenção secretora de GnRH-LH do hipotálamo de novilhas (KINDER et al., 1995).

Não observamos diferença significativa na área total dos picos e área do maior pico de secreção de LH, nem no número de picos de secreção de LH (Figuras 43 a 45), mas houve um aumento na área total de secreção de LH, em função da idade nas novilhas inteiras (Figura 42). O tratamento com estradiol aumentou a concentração basal nas novilhas inteiras, interferido na área dos picos de secreção, mesmo sem aumentar o número de picos. Esperávamos que houvesse um aumento

no número de picos de LH, com o avançar da idade; no entanto isso não foi observado. Esse evento pode ser consequência da ação bifásica do E₂, semelhante ao encontrado por Schoppee et al. (1999). Inicialmente há uma inibição da secreção de LH, possivelmente através da ativação de receptores no núcleo ventromedial do hipotálamo (SCOTT et al., 2000) e posteriormente uma estimulação na secreção de LH por ação do E₂ nas células do hipotálamo mediobasal (GÜMEN; WILTBANK, 2002). Com essa inibição e posterior estimulação, não foi possível identificar variação do número de picos em função da idade.

Com a administração do E₂ nas novilhas inteiras e ovariectomizadas, diminuiu a diferença na secreção de LH após os 10 meses de idade; é de se supor que a maior modificação tenha sido em aumentar o efeito estimulatório nas novilhas inteiras. Se houvesse aumento da resposta estimulatória, nas ovariectomizadas, a diferença seria mantida. Em outras palavras, ficou mais evidente o efeito inibitório do E₂ nas novilhas ovariectomizadas e o estimulatório nas inteiras.

A concentração de LH e o número de picos de LH aumentaram com o aproximar da puberdade (MELVIN et al., 1999). A ovariectomia aumentou a frequência de picos de LH (DAY et al., 1984) que foi suprimida pelo tratamento com estradiol (WOLFE, 1989). Estradiol exógeno pode diminuir a retroalimentação negativa, sobre a secreção de LH (DYER et al., 1990), podendo induzir (ANDERSON et al., 1996; SCHOPPEE et al., 1995) ou não (RODRIGUES et al., 1999) a puberdade precoce.

Assim como a área total dos picos (Figura 43), a área do maior pico de secreção de LH (Figura 45) não variou entre os grupos, provavelmente em função da ação bifásica do E₂ sobre a secreção de LH, com inibição e posterior estímulo.

Apesar de aparentemente diferentes, estatisticamente não encontramos variação no tempo necessário para o aparecimento do maior pico de secreção de LH entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas (Figura 47). O momento em que aconteceu o pico de LH, em resposta à administração do benzoato de estradiol em novilhas Holandesas decresceu entre o 1º e o 9º mês de idade (NAKADA et al., 2000), resultado não verificado em nosso experimento, provavelmente consequência da idade mais avançada das novilhas da raça Nelore. Essa possível interferência da administração do E₂ sobre a secreção de LH, sugere que, nas novilhas ovariectomizadas, o efeito predominante do E₂ seja inibitório, enquanto que, nas novilhas inteiras, o efeito seja mais estimulatório, como proposto anteriormente.

Nossos dados mostraram que, entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas da raça Nelore, a dispersão do pico, em relação ao tratamento com E₂ e a divergência da concentração de LH, diminuiu com a idade (17 meses; Figura 40).

Com relação à amplitude máxima dos picos de secreção de LH, podemos observar que, apesar da presença do efeito inibitório do E₂ sobre a secreção de LH, aos 10 meses, as novilhas ovariectomizadas apresentaram maior amplitude dos picos de secreção que as novilhas inteiras, que, por sua vez, apresentaram aumento de resposta ao E₂, através do aumento da amplitude da secreção do LH, em função da idade. Nakada et al. (2000), também, observaram que a administração de E₂, em novilhas Holandesas, com 15 a 18 meses de idade, induziu um pico de LH, após 16 a 20 horas. A amplitude média do pico de secreção de LH, em novilhas holandesas, dos 15 a 18 meses de idade, induzido pelo benzoato de estradiol (RIBADU et al., 1999), foi semelhante ($5,1 \pm 0,8$ ng/mL) aos nossos dados ($5,72 \pm 2,56$ ng/ml) com novilhas Nelore, aos 17 meses de idade. Apesar das novilhas ovariectomizadas apresentarem maior concentração basal de LH, as novilhas inteiras, quando estimuladas pelo E₂, apresentaram a mesma amplitude máxima dos picos de secreção de LH que as ovariectomizadas. Estes dados indicam a existência de um sistema de retroalimentação positiva exercido pelo estradiol, sobre a secreção de GnRH, em fêmeas bovinas, durante a imaturidade sexual; o mesmo ocorre em ovelhas pré-púberes (FOSTER; OLSTER, 1985).

Os resultados nos fazem pressupor que diferentes subtipos de receptores, para o estradiol, podem mediar uma retroalimentação positiva sobre a secreção de GnRH, induzida pelo E₂. Em novilhas da raça Nelore, a partir dos 10 meses de idade, a presença de receptores para E₂, na área pré-óptica medial e adjacente ao hipotálamo anterior, pode aumentar a secreção de LH (ANDERSON et al., 1996; BLACHE et al., 1994; FLUGGE et al., 1986; HERBISON et al., 1993; LANGUB et al., 1991). Embora tenha ocorrido um declínio no número de receptores de estradiol, antes da primeira ovulação no hipotálamo anterior de novilhas (DAY et al., 1987), sugerindo alterações funcionais no hipotálamo de mamíferos pré-púberes (FRANKFURT; MCEWEN, 1991).

Existem diversas hipóteses procurando compreender os fatores responsáveis pelo início da atividade gonadal, nas fêmeas de bovinos. A diminuição da inibição hipotalâmica exercida pelo E₂, sobre a pulsatilidade de LH, coincide com o início da puberdade em novilhas pré-púberes, tanto *Bos taurus* quanto *Bos indicus*

(RODRIGUES et al., 2002). Uma outra hipótese considerada é o aumento da atividade de neurônios que secretam aminoácidos excitatórios (HONARAMOOZ et al., 2000; JARRY et al., 1995), ou a diminuição de secreção de inibitórios como o ácido gama-aminobutírico (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2005) e opióides endógenos (WOLFE et al., 1991), que através de interação com esteróides gonadais, podem estimular a secreção hipotalâmica de GnRH.

Como já comentado anteriormente, as novilhas Nelore, apesar de oriundas de um mesmo rebanho, apresentaram diferentes respostas aos tratamentos, intrínsecas de cada animal (ver gráfico apêndice). Como o número de animais foi reduzido (5 por grupo), em função da intensiva coleta de amostras, houve uma dispersão de resposta, que resultou em dificuldade de identificar variações entre grupos, ao longo do tempo.

9.5 CONCLUSÕES

Aceitamos a hipótese de que há uma mudança, no padrão de secreção de LH, após o tratamento com E₂, ao longo da maturação sexual de novilhas da raça Nelore.

- ✓ Aos 10 meses de idade, a administração do 17 β -estradiol não alterou a diferença, na concentração média de LH, entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas, por uma menor estimulação de secreção de LH, nas novilhas inteiras ou menor supressão, nas novilhas ovariectomizadas. O mesmo aconteceu com a área total de secreção de LH e amplitude máxima dos picos de secreção de LH.
- ✓ Não houve diferença, entre os grupos, após a administração do 17 β -estradiol em relação ao número de picos, área total de picos, área do maior pico e tempo necessário para acontecer o maior pico.

10 EXPERIMENTO 5: CONCENTRAÇÃO DE LH DA DESMAMA À PRIMEIRA OVULAÇÃO

10.1 JUSTIFICATIVA

A secreção de LH, durante o período pré-puberal nos bovinos, pode ser inibida, de acordo com o mecanismo gonadostático, segundo o qual, animais imaturos são muito sensíveis ao efeito inibitório do estradiol (DODSON et al., 1988; RODRIGUES et al., 1999) ou através do mecanismo de contenção central, envolvendo a ação de neurônios, com capacidade de inibir a secreção de gonadotrofinas (HONARAMOOZ et al., 1998). Durante a fase pré-púbere, a pulsatilidade de LH é infreqüente, porém com o aproximar da puberdade e a diminuição de receptores de estradiol no hipotálamo (DAY et al., 1987), observa-se um decréscimo da retroalimentação negativa dos esteróides gonadais, sobre a secreção de GnRH, aumentando a pulsatilidade de LH (RODRIGUES et al., 1999; SCHILLO et al., 1982). Os mecanismos responsáveis pelo declínio da retroalimentação negativa aos esteróides gonadais não estão completamente elucidados.

Comparando novilhas inteiras com ovariectomizadas, pretendemos avaliar a existência de outro mecanismo de contenção da secreção de LH, além do gonadostático. Se a concentração de LH variar, em função da idade nas novilhas ovariectomizadas, é porque outro mecanismo, além do gonadostático, modula a secreção de GnRH, em função da idade.

A hipótese estudada foi a de que há variação da concentração de LH, em função da idade, em novilhas pré-púberes da raça Nelore, inteiras e ovariectomizadas.

10.2 MATERIAL E MÉTODOS

10.2.1 Animais e manejo

Foram utilizadas 15 novilhas da raça Nelore, nascidas em março de 2003 e oriundas da Agropecuária CFM, Fazenda São Francisco Magda, SP. Após serem desmamadas, aos 6 meses, as novilhas foram trazidas 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. O ganho de peso foi acompanhado quinzenalmente utilizando-se uma balança da marca Toledo (modelo: MGR-3000).

10.2.2 Ovariectomia e canulação

Cinco novilhas, com 6 meses de idade, foram ovariectomizadas pela equipe cirúrgica de grandes animais do Hospital Veterinário da Unesp de Araçatuba (ver detalhes no item 5.1.1).

Apenas os grupos de novilhas utilizados para identificar o número de picos e amplitude máxima dos picos de secreção de LH foram canulados. No dia anterior à administração da solução salina, cada novilha teve a veia jugular canulada, a fim de permitir coleta seriada de amostras de sangue, interferindo o menos possível, no bem estar dos animais (ver detalhes no item 5.1.2).

As amostras de sangue para identificar a variação na concentração de LH plasmática em novilhas pré-púberes inteiras (n=10) e ovariectomizadas (n=5) do 6º ao 19º mês de idade foram coletadas a cada 4 dias (uma única coleta, através de venopunção).

10.2.3 Delineamento experimental

10.2.3.1 Coleta a cada 4 dias

As amostras de sangue, para identificar a variação na concentração de LH plasmática, em novilhas pré-púberes inteiras (n=10) e ovariectomizadas (n=5) do 6º ao 19º mês de idade foram coletadas a cada 4 dias (uma única coleta, através de venopunção).

10.2.3.2 Coleta seriada a cada 15 minutos

Para identificar o número de picos de secreção de LH e a amplitude dos picos de secreção de LH foram utilizadas, apenas, dez novilhas divididas em 2 grupos, com 5 animais cada: GRUPO IS: novilhas inteiras que receberam salina 0,9%; GRUPO OvS: novilhas ovariectomizadas que receberam salina 0,9%. Antes da administração da salina 0,9%, foram realizadas 5 coletas de sangue a cada 15 min, com finalidade de adaptar o animal e diminuir o estresse ocasionado pela manipulação. Após a administração da salina 0,9% amostras de sangue foram coletadas a cada 15 min por 10 h, aos 8, 10, 12, 14, 16 e 17 meses de idade, nas novilhas inteiras e aos 10, 14, 15, 17 e 19 meses nas novilhas ovariectomizadas.

10.2.4 Radioimunoensaio para gonadotrofinas e coeficiente de variação intra e interensaio e sensibilidade dos ensaios de LH

Os ensaios, para LH bovino, foram adaptados dos descritos por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990), realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba. O coeficiente de variação intra e interensaio e a sensibilidade dos ensaios de LH foram respectivamente de 11,56%; 17,91% e 0,06 ng/ml.

10.2.5 Identificação das variáveis estudadas e análise estatística

Para realizar a análise estatística, a concentração de LH foi agrupada mensalmente, perfazendo a média de 7 amostras de cada animal de cada grupo, coletadas a cada 4 dias. Para identificar o número de picos e amplitude máxima dos picos de LH, nas novilhas inteiras e ovariectomizadas, que receberam salina 0,9%, utilizou-se o programa GrafPad Prism (ver detalhes no item 5.4).

Os dados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas, empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, no nível de significância de 5%. Antes de cada análise, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem às premissas, eram submetidos a várias transformações na seqüência ($\log(X+1)$; logaritmo na base 10 – $\log_{10}X$; Raiz quadrada – RQ X ; Quadrado – X^2), procurando atender à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Para a descrição dos resultados, foram empregados às médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

10.3 RESULTADOS

A variação, na concentração média de LH nas novilhas inteiras e ovariectomizadas, em função da idade, está sumarizada na figura 48. Não houve diferença ($P \geq 0,05$), na concentração de LH entre novilhas inteiras e ovariectomizadas, aos 6 meses de idade. Em contraste, a partir dos 7º mês de idade, a concentração de LH foi maior nas novilhas Ov ($P \leq 0,05$) que nas novilhas I, aumentando ao longo do experimento (Tabela 2).

Aos 16 meses de idade, a concentração de LH, nas novilhas inteiras, estabilizou-se em 0,80 ng/mL, e não aumentou ($P \geq 0,05$) nos meses seguintes (Tabela 2).

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) no número de picos de secreção de LH, nas novilhas inteiras, em função da idade, embora a frequência pulsátil de LH, nas novilhas ovariectomizadas, aumentou ($P \leq 0,05$) com o decorrer da idade, apresentando maior número de picos aos 17 meses ($P \leq 0,05$), quando comparado aos 14 meses de idade (Figuras 49 e 50).

A amplitude máxima dos picos de secreção de LH não aumentou ($P \geq 0,05$), em função da idade, nas novilhas inteiras (Figura 51). Quando o grupo de novilhas ovariectomizadas foi comparado ao longo do tempo, houve uma maior amplitude de LH ($P \leq 0,05$), aos 17 meses, que aos 15 meses de idade (Figura 52).

A maioria das novilhas (60%) ovularam entre os 15 e 19º mês, em razão da dosagem plasmática de progesterona (Figura 53). No mês de outubro, 3 novilhas começaram a ciclar, nos demais meses, apenas, um animal por mês.

Figura 48 - Variação na concentração de LH plasmática (média±EPM) em novilhas Nellore pré-púberes Inteiras (n=10) e Ovariectomizadas (n=5) até o 19º mês de idade. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas. As amostras foram colhidas a cada 4 dias e os valores, após a primeira ovulação, foram excluídos.

Tabela 2 - Comparação da concentração média de LH (ng/ml) entre novilhas Nelore pré-púberes Inteiras (n=10) e Ovariectomizadas (n=5). As amostras foram colhidas a cada 4 dias, os valores agrupados e comparados, entre as idades, em meses. Os dados após a primeira ovulação não foram considerados.

Idade		Inteiras		Ovariectomizadas		
Meses	N	Médias	SEM	N	Médias	SEM
6	27	0,57 ^b	0,05	15	0,60 ^f	0,08
7	71	0,77 ^{abA}	0,05	40	1,01 ^{eB}	0,07
8	63	0,73 ^{abA}	0,05	35	1,51 ^{dB}	0,11
9	72	0,65 ^{abA}	0,03	40	1,61 ^{cB}	0,12
10	63	0,67 ^{abA}	0,02	35	1,70 ^{bcdB}	0,10
11	72	0,78 ^{aA}	0,04	40	2,17 ^{abB}	0,12
12	63	0,71 ^{abA}	0,02	35	2,06 ^{abcB}	0,16
13	71	0,76 ^{abA}	0,05	40	2,00 ^{abcdB}	0,17
14	71	0,79 ^{aA}	0,05	40	2,18 ^{abB}	0,13
15	55	0,69 ^{abA}	0,04	35	1,99 ^{abcdB}	0,28
16	56	0,80 ^{aA}	0,04	35	2,47 ^{aB}	0,29
17	59	0,76 ^{abA}	0,04	40	2,44 ^{aB}	0,16
18	43	0,76 ^{abA}	0,05	35	2,17 ^{abB}	0,16
19	36	0,81 ^{aA}	0,06	38	2,19 ^{abB}	0,13

n= número de observações

Letras minúsculas sinalizam diferença entre os meses

Letras maiúsculas sinalizam diferenças entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas

Figura 49 - Número de picos de secreção LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina 0,9%, em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.

a,b,c médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$)

Figura 50 - Número de picos de secreção LH (ng/mL, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes ovariectomizadas (OvS; n=5) que receberam salina 0,9%, em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.

Figura 51 - Variação na amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelore pré-púberes inteiras (IS; n=5) que receberam salina 0,9% em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.

a,b,c médias seguidas de letras diferentes diferem, dentro de cada grupo, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 52 - Variação na amplitude máxima dos picos de secreção de LH (ng/ml, valores não transformados; Média $\pm$ EPM) no período pós-tratamento em novilhas Nelores pré-púberes ovariectomizadas (OvS; n=5) que receberam salina 0,9% em diferentes idades. Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.

Figura 53 - Número de novilhas inteiras (n=10) que ovularam em função da idade. A idade da primeira ovulação foi determinada em função da concentração plasmática de progesterona (acima de 1 ng/mL). Abaixo da idade (meses) estão sinalizados os meses do ano em que as coletas foram realizadas.

10.4 DISCUSSÃO

No presente experimento houve aumento ($P \leq 0,05$) de 40%, na concentração de LH; à medida que as novilhas inteiras se aproximaram da primeira ovulação, passou de 0,57 ng/mL, aos 6 meses, para 0,80 ng/mL, aos 16 meses de idade. Nas novilhas ovariectomizadas, aos 6 meses de idade, a concentração média de LH era de 0,60 ng/mL; aumentou 312% (2,47 ng/mL) até os 16 meses de idade (Tabela 2).

Durante o período de crescimento nas novilhas inteiras, fica nítido que as gônadas exercem um efeito inibitório na secreção de LH, evidenciado pela alta concentração circulante de LH nas novilhas ovariectomizadas (Figura 48) e pelo aumento do número de picos, com o decorrer da idade, nas novilhas ovariectomizadas (Figura 50). De acordo com Day et al. (1984), novilhas ovariectomizadas (*Bos taurus*) apresentaram um aumento significativo, na

freqüência de picos de LH, após a ovariectomia, que foi inibido pelo tratamento com E_2 , até o início da primeira ovulação. Segundo Rodrigues et al. (2002) o efeito inibitório do E_2 é mais evidente na freqüência dos picos do que na concentração plasmática média de LH. Day et al. (1987) concluíram que o aumento na freqüência de picos é a variação que prediz a proximidade da primeira ovulação, quando comparado com a concentração média de LH (DAY et al., 1987; DODSON et al., 1988); entretanto o número de picos não aumentou nas novilhas inteiras, em função da idade (Figura 49). Os dados do presente experimento mostraram que, em novilhas ovariectomizadas da raça Nelore, a ausência de esteróides gonadais exerceu efeito não somente na concentração, mas também na freqüência e amplitude dos picos de secreção de LH (Figura 51), concordando com a “teoria gonadostática” descrita por Hohlweg and Dohrn¹ (1930 apud OJEDA; URBANSKI, 1994, p. 388), que relaciona o início da puberdade com a diminuição do número de receptores hipotalâmicos para o E_2 , resultando em maior concentração e freqüência pulsátil de LH.

Da mesma forma, novilhas *Bos taurus* pré-púberes, imunizadas contra E_2 , apresentaram maior concentração de LH (D’OCCHIO et al., 1988). O aumento na concentração de LH aconteceu, progressivamente, em função da diminuição da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise ao E_2 . Com o crescimento e o avançar da idade, houve aumento na secreção média de LH de ambos grupos (inteiras e ovariectomizadas), em consequência da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Figura 48). O perfil de secreção foi semelhante ao observado em novilhas *Bos taurus* (EVANS, 1994), apesar do número e da amplitude dos picos de secreção de LH não terem aumentado em função da idade nas novilhas inteiras (Figuras 49 e 51). Uma das funções importantes do LH, além de desencadear a ovulação, é a manutenção do crescimento folicular. Após a maturação das células da granulosa induzida pelo FSH, estas adquirem a capacidade de responder mais ao LH que ao FSH, sugerindo uma maior concentração de receptores para LH do que para o FSH (HILLIER, 2001). A maturação sexual está relacionada ao crescimento do folículo dominante e à maior secreção de LH (FORTUNE et al., 2001) resultando em uma maior produção de E_2 que levará ao desencadeamento de um pico pré-ovulatório de

¹ HOHLWEG, W.; DOHRN, M. Über die Beziehungen Zwischen Hypophysenvorderlappen und Keimdrüsen. Klin Wochenschr, v. 11, p. 233-235, 1932.

LH (EVANS et al., 1995). É possível que a presença de esteróides gonadais, durante a maturação sexual de novilhas da raça Nelore, seja inibitória até o momento da primeira ovulação, semelhante a novilhas *Bos indicus* ovariectomizadas e implantadas com E₂ (RODRIGUES et al., 2002); porém não foi possível observar aumento na frequência de picos, como descrito em outras raças bovinas (DAY et al., 1994; DODSON et al., 1988). Em ratas ovariectomizadas, o efeito inibitório do E₂, sobre a secreção de LH, no período pré-puberal, pode estar associado à supressão de neurônios noradrenérgicos (LEGAN; CALLAHAN, 1999) ou inibição provocada por opióides endógenos e outros neurotransmissores como o GABA (HANARAMOOZ et al., 2000; RAWLINGS et al., 2003). Um dos possíveis locais de ação do E₂, no SNC, pode ser o *locus coeruleus*, uma região catecolaminérgica que sofre modulação do E₂, na produção de enzimas envolvidas na síntese de norepinefrina (SEROVA et al., 2002).

Com relação à pulsatilidade e amplitude máxima dos picos de secreção de LH, nas novilhas ovariectomizadas da raça Nelore, os dados apresentados neste estudo mostraram uma maior pulsatilidade, a partir dos 15 meses de idade (Figura 49). A amplitude máxima dos picos de secreção de LH, aos 15 meses, foi menor quando comparado aos 17 meses (Figura 50). Os dados obtidos nas novilhas ovariectomizadas apresentaram um comportamento interessante e diferente dos dados obtidos por Day et al. (1987) em novilhas *Bos taurus*, que verificaram aumento na frequência de picos de LH, com diminuição da amplitude de secreção próximo à primeira ovulação. Rodrigues et al. (2002), comparando genótipo *Bos indicus* com *Bos taurus*, não verificaram diferença na amplitude máxima dos picos de secreção de LH dos 10 meses de idade, até a primeira ovulação. Nas novilhas ovariectomizadas, da raça Nelore, o aumento da frequência de picos foi acompanhado do aumento da amplitude máxima de secreção dos picos de LH. Provavelmente a ausência de esteróides gonadais próximo à primeira ovulação, nas novilhas ovariectomizadas, possa ter interferido nos sítios hipotalâmicos responsáveis pela inibição da amplitude máxima dos picos de secreção de LH.

A secreção de LH, em resposta ao tratamento com estradiol, aumentou com a proximidade da primeira ovulação, sugerindo que, com o avançar da maturação sexual, há um aumento nos receptores ou grupo de neurônios que respondem positivamente ao estradiol, aumentando a secreção de GnRH e conseqüentemente a de LH (NAKADA et al., 2001). Entretanto, o tratamento crônico com E₂, a partir de

190 dias de idade, não antecipou a puberdade em novilhas cruzadas (RODRIGUES et al., 1999).

Os resultados do presente estudo confirmam que a regulação endócrina, envolvendo a concentração média de LH, durante o período de maturação sexual, em novilhas da raça Nelore, foi semelhante a genótipos como os *Bos taurus*; porém a primeira ovulação normalmente é mais tardia nas novilhas *Bos indicus*, decorrente de fatores ambientais (RODRIGUES et al., 2002) e genéticos (ELER et al., 2002). É possível que nas novilhas da raça Nelore o aumento da secreção de LH, em função da idade, esteja não somente associado à diminuição da retroalimentação negativa ao E₂, mas também à ativação de neurônios estimuladores e à diminuição da ação de neurônios com capacidade de inibir a secreção de GnRH.

10.5 CONCLUSÕES

Durante a maturação sexual de novilhas Nelore houve um aumento na concentração de LH, tanto em novilhas inteiras quanto ovariectomizadas.

A remoção das gônadas em novilhas pré-púberes resultou em um aumento na concentração de LH plasmático, após o 7º mês e aumento do número de picos de secreção de LH e amplitude máxima de secreção de LH, com o aproximar-se da primeira ovulação.

11 CONCLUSÕES FINAIS

11 CONCLUSÕES FINAIS

Quando agrupamos os resultados de todos os experimentos observamos que:

- ✓ Houve um aumento na atividade inibitória gabaérgica com o aproximar da primeira ovulação (14 meses de idade) ou ficou mais evidente com a diminuição da retroalimentação negativa dos esteróides gonadais (Figura 54).
- ✓ A administração de um inibidor de dopamina suprimiu a secreção de LH aos 8 meses de idade, sugerindo que, a dopamina possa exercer um efeito estimulatório, ou que, o possível aumento da secreção de prolactina possa ter inibido a secreção de LH, ficando mais evidente nas novilhas ovariectomizadas.
- ✓ Novilhas Nelore pré-púberes inteiras que receberam um estimulador alfa-adrenérgico apresentaram maior secreção de LH aos 8 meses de idade, enquanto que, a mesma droga diminuiu a área total dos picos e o número de picos nas novilhas ovariectomizadas com a mesma idade.
- ✓ O tratamento com 17β -estradiol diminuiu as diferenças sobre a secreção de LH entre as novilhas inteiras e ovariectomizadas, exceto aos 8 meses de idade, quando o tratamento com E_2 não alterou as diferenças entre os grupos. Aparentemente nesta idade, o estradiol suprimiu a secreção de LH nas novilhas ovariectomizadas, enquanto estimulou nas novilhas inteiras.
- ✓ Com relação à concentração média de LH da desmama à primeira ovulação, houve aumento durante a maturação sexual nas novilhas inteiras e ovariectomizadas. O número de picos e amplitude máxima dos picos de secreção de LH foram maiores com o decorrer da idade, nas novilhas ovariectomizadas.

Figura 54 - Desenho esquemático dos sinais neuronais regulando a secreção de GnRH, em novilhas da raça Nelore, durante o processo de maturação sexual.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. J. A. Conteção química de eqüinos e ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. 807 p.
- AKEMA, T.; CHIBA, A.; KIMURA, F. On the relationship between noradrenergic stimulatory and GABAergic inhibitory systems in the control of luteinizing hormone secretion in female rats. **Neuroendocrinology**, v. 52, p. 566-572, 1990.
- ALENCAR, M. M.; COSTA, J. L.; CORREA, L. A. Desempenho reprodutivo de fêmeas das raças Canchim e Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 753-758, 1987.
- ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1025-1031, 1996.
- ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; KRULICH, L.; RODRIGUES, J. A.; MCCANN, S. M. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic área and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactina preovulatory surge. **Brain Research**, v. 767, p. 289-296, 1997.
- ANSELMO-FRANCI, J. A.; ROCHA-BARROS, V. M.; FRANCI, C. R.; MCCANN, S. M. Locus coeruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. **Brain Research**, v. 833, p. 86-92, 1999.
- ANUALPEC 2005. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação FNP, 2005. 540 p.
- ARAÚJO, G. F.; NOGUEIRA, G. P.; CRESPILO, A. M.; LOUZADA, M. J. Q. Análise da bioimpedância em novilhas Nelore pré-púberes. In: REUNIÃO DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17., 2002, Salvador. **Resumos...** São Paulo: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002. (Abstract 19057).
- AROEIRA, J. A. D. C.; SILVA, H. M.; FONTES, L. R.; SAMPAIO, I. B. M. Idade ao primeiro parto, vida reprodutiva e expectativa de vida em vacas Zebu. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 29, p. 301-309, 1997.

BAÇA, J. R. F.; ENRIQUE, P. G.; GALINA, C. S. Reproductive performance of *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers following artificial insemination after spontaneous estrus in the dry tropics of Costa Rica. **Veterinária** (Mexico), v. 29, p. 57-66, 1998.

BELOSO, E. S.; IGLESIA, R. L.; GUVARA, L.; CASTILLO, G. S. Bull effect on the reproductive performance of the mature and first-suckled Zebu cows in the tropics. **Theriogenology**, v. 48, p. 1185-1190, 1997.

BERGEN, H.; LEUNG, P. C. Supression of progesterone-induced gonadotropin surge by adrenergic agonist in estrogen-primed ovariectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 43, p. 397-403, 1986.

BERETTA, V.; LOBATO, J. F. P.; MIELITZ NETTO, C. G. A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas pecuários de cria diferindo na idade das novilhas ao primeiro parto e na taxa de natalidade do rebanho do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1278-1286, 2001.

BLACHE, D.; BATAILLER, M.; FABRE-NYS, C. Oestrogen receptors in the preoptico-hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrous cycle in ovariectomized ewe. **Journal of Neuroendocrinol**, v. 6, p. 329-339, 1994.

BO, G. A.; BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 141-157, 2000.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

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

BOLT, D. J.; SCOTT, V.; KIRACOFÉ, G. H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-RH treatment in ovariectomized beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 263-271, 1990.

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.

BRANGO, C. W.; WHISNANT, C. S.; GOODMAN, R. L. A role for catecholaminergic neurons in the suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the pré-pubertal ewe lamb. **Neuroendocrinology**, v. 52, p. 448-454, 1990.

BRANN, D. W.; PUTNAM, C. D.; MAHESH, V. B. Gamma -aminobutyric acidA receptors mediate 3 alpha -hydroxy-5 alpha -pregnan-20-one-induced gonadotropin secretion. **Endocrinology Philadelphia**, v. 126, p. 1854-1859, 1990.

BRANN, D. W.; MAHESH, V. B. Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion, **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, p. 325-329, 1995.

CARBONE, S.; PONZO, O.; SZWARCFARB, B.; RONDINA, D.; REYNOSO, R.; SCACCHI, P.; MOGUILEVSKY, J. A. Ontogenic modifications in the effect of the GABAergic system on the hypothalamic excitatory amino acids: its relationship with GABAergic control of gonadotrophin secretion during sexual maturation in female rats. **Developmental Brain Research**, v. 133, p. 13-18, 2002.

CARTWRIGHT, T. C. Prognosis of Zebu cattle: research and application. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 1221-1226, 1980.

CHANDOLIA, R. K.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. The involvement of dopaminergic and opiodergic neuronal systems in the control of the early rise in LH secretion in bull calves. **Journal of neuroendocrinology**, v. 9, p. 121-127, 1997.

CHENOWETH, P. J. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: a review. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, p. 422-426, 1994.

CHOMIKA, L. K. Biogenic amines and the activity of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in ewes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 43, p. 57-68, 1992.

CURLEWIS, J. D.; NAYLOR, A. M.; MCNEILLY, A. S. Evaluation of a possible role for the dopamine D1 and D2 receptors in the steroid-dependent suppression of luteinizing hormone secretion in the seasonally anoestrous ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 3, p. 387-391, 1991.

DAILEY, K. A.; DEEVER, D. R.; GOODMAN, R. L. Neurotransmitter regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 577-585, 1987.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D. D.; SCHANBACHER, B. D.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: oestradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 332-341, 1984.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFER, P. L.; KITTOCK, R. J. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 1054-1065, 1987.

DAY, M. L.; GASSER, C. L.; GRUM, D. E. Determinantes da idade à puberdade em novilhas. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2006, Uberlândia. **Curso...** Uberlândia: [s.n], 2006, p. 86-105, 2006.

DE LUCIA, R. F. S.; PEREIRA, F. V.; NOGUEIRA, G. P. Follicular population in precocious and non precocious Nelore heifers during prepubertal period. **Theriogenology**, v. 57, p. 603, 2002, Supplement 1.

DEEVER, D. R.; DAILEY, R. A. Effects of dopamine, norepinephrine and serotonin on plasma concentration of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized and anestrus ewes. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 624-632, 1982.

DEMLING, L.; FUCHS, E.; BAUMERT, M.; WUTTKE, W. Preoptic catecholamine, GABA and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen primed rats utilizing a push-pull cannula technique. **Neuroendocrinology**, v. 41, p. 212-218, 1995.

D'OCCHIO, M. J.; GIFFORD, D. R.; HOSKINSON, R. M.; WEATHERLY, T.; SETCHELL, B. P. Gonadotropin secretion and ovarian responses in pré-pubertal heifers actively immunized against androstenedione and oestradiol-17 beta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 159-168, 1988.

DÖCKE, F.; ROHDE, W.; GERBER, P.; KREUZ, G. Medial preoptic area estrogen and the peripubertal desensitization to the negative estrogen feedback in female rats. **Neuroendocrinology**, v. 39, p. 74-80, 1984.

DODSON, S. E.; MCLEOD, B. J.; HARESIGN, W.; PETERS, A. R.; LAMMING, G. E. Endocrine changes from birth to puberty in the heifer. **Journal of Animal Reproduction**, v. 82, p. 527-538, 1988.

DONADEU, F. X.; THOMPSON JR., D. L. Administration of sulpiride to anovulatory mares in winter: effects on prolactin and gonadotropin concentrations, ovarian activity, ovulation and hair shedding. **Theriogenology**, v. 57, p. 963-976, 2002.

DYER, R. M.; BISHOP, M. D.; DAY, M. L. Exogenous oestradiol reduces inhibition of luteinizing hormone by oestradiol in prepubertal heifers. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 755-761, 1990.

ELER, J. P.; SILVA JR., J. A.; FERAZ, J. B. S.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H. N.; EVANS, J. L.; GOLDEN, B. L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 951-954, 2002.

ESTES, K.; SIMPKIN, J.; KALRA, S. Resumption with clonidine of pulsatile LH release following acute norepinephrine depletion in ovariectomised rats. **Neuroendocrinology**, v. 35, p. 56-62, 1982.

EVANS A. C. O.; CURRIE, W. D.; RAWLINGS, N. C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 847-855, 1992.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 187-194, 1994.

EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Effects of treatment with LH and FSH between 8 and 12 weeks of age on ovarian follicular development and puberty in heifers. **Theriogenology**, v. 44, p. 725-740, 1995.

EVANS, A. C. O.; O'KEEFFE, P.; MIHM, M.; ROCHE, J. F.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronisation, the LH surge and ovulation in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 13-23, 2003.

FAJERSSON, P.; BARRADAS, H. V.; ROMAN-PONCE, H.; COOK, R. M. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. **Theriogenology**, v. 35, p. 845-855, 1991.

FERREIRA, M. B. D.; LOPES, B. C.; DANTAS, M. S.; MOURÃO, G. B.; VALE FILHO, V. R. Escore do aparelho reprodutivo pré estação de monta em novilhas Zebu aos dois anos de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 160-162, 1999.

FERREIRA, V. C. P.; PENNA, V. M.; BERGMANN, J. A. G.; TORRES, R. A. Interação genótipo-ambiente em algumas características produtivas de gado de corte no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 385-392, 2001.

FLUGGE, G.; OERTEL, W. H.; WUTTKE, W. Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 43, p. 1-5, 1986.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FOSTER, D. L.; RYAN, K. D. Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. **Endocrinology**, v. 105, p. 896-904, 1979.

FOSTER, D. L.; OLSTER, D. H. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (lh) secretion and competency of the lh surge system. **Endocrinology**, v. 116, p. 1186-1189, 1984.

FOSTER, D. L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives of leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 205-215, 1999.

FLUGGE, G.; OERTEL, W.; WUTTKE, W. Evidence for estrogen receptive GABAergic neurons in the preoptic/ anterior hypothalamic area of the rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 43, p. 1-5, 1986.

FRANCIS PAU, K. Y.; LEE, C.J.; COWLES, A.; YANG, S. P.; HESS, D. L.; SPIES, H. G. Possible involvement of norepinephrine transporter activity in the pulsatility of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release: influence of the gonad. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, p. 21-29, 1998.

FRANKFURT, M.; MCEWEN, B. S. 5-7-dihydroxytryptamine and gonadal steroid manipulation alter spine density in the ventromedial hypothalamic neurons. **Neuroendocrinology**, v. 54, p. 653-657, 1991.

GALINA, C. S.; ARTHUR, G. H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 1. Puberty and age at first calving. **Animal Breeding Abstracts**, v. 57, p. 583-590, 1989.

GALLEGOS-SANCHEZ, J.; MALPAUX, B.; THIERY, J. C. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 38, p. 3-15, 1998.

GAMA FILHO, R. V.; FONSECA, F. A.; FONTES, R. S.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, F. P.; CARVALHO, C. S.; RAMOS, J. L. G. Influencia da sazonalidade sobre a dinâmica folicular ovariana de novilhas da raça Guzerá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 90-92, 2002.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; NIZIELSKI, S. E.; WILLIAMS, G. L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2158-2167, 2002.

GOREWIT, R. C. Effect of Clonidine on glucose production and insulin secretion of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1769-1772, 1980.

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

GREER, R. C.; WHITMAN, R. W.; STAIGMINLLER, R. B.; ANDERSON, D. C.; Estimating the impact of management decisions on the occurrence of puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 30-39, 1983.

GÜMEN, A.; WILTBANK, M. C. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1689-1695, 2002.

HAYNES, N. B.; LAMMING, C. E.; YANG, K. P.; BROOKS, A. N.; FINNIE, A. D. Endogenous opioid peptides and farm animal reproduction. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v. 11, p. 111-145, 1989.

HERBISON, A. E.; DYER, R. G. Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge [rats]. **Neuroendocrinology**, v. 53, p. 317-320, 1991.

HERBISON, A. E.; ROBINSON, J. E.; SKINNER, D. C. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 751-759, 1993.

HERBISON, A. E. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 1-6, 1997.

HILLIER, S. G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 179, p. 39-46, 2001.

HOLLT, V.; BERGMANN, M. Effects of acute and chronic haloperidol treatment on the concentrations of immunoreactive β -endorphin in plasma, pituitary and brain of rats. **Neuropharmacology**, v. 21, p. 147-154, 1982.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Effect of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 67-79, 1999.

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

HORVATH, T. L.; PU, S.; DUBE, M. G.; DIANO, S.; KALRA, S. P. A GABA-neuropeptide Y (NPY) interplay in LH release. **Peptides**, v. 22, p. 473-481, 2001.

IMWALLE, D. B.; PATTERSON, D. J.; SCHILLO, K. K. Effects of melengestrol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 432-436, 1998.

JARRY, H.; LEONHARDT, S.; SCHWARZE, T.; WUTTKE, W. Preoptic rather than mediobasal hypothalamic amino acid neurotransmitter release regulates GnRH secretion during the estrogen induced LH surge in the ovariectomized rat. **Neuroendocrinology**, v. 62, p. 479-486, 1995.

JACKSON, G. L. Effect of adrenergic blocking drugs on secretion luteinizing hormone in the ovariectomized ewe. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 543-548, 1977.

JACKSON, G. L.; KUEHL, D. Effects of applying gamma-aminobutyric acid_B drugs into the medial basal hypothalamus on basal luteinizing hormone concentrations and on luteinizing hormone surges in the female sheep. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 334-339, 2004.

JONATHAN, N. B.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactina (PRL) inhibitor. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 724-763, 2006.

KEEN, K. L.; BURICH, A. J.; MITSUSHIMA, D.; KASUYA, E.; TERASAWA, E. Effects of pulsati infusion of the GABA (A) receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. **Endocrinology**, v. 140, p. 5257-5266, 1999.

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

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 393-407, 1995, Supplement 1.

KORDAN, C.; DROVA, S. V.; MARTINEZ DE LA ESCALARA, G.; WEINER, R. L. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactina. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1994. 1878 p.

KULJIS, R. O.; ADVIS, J. P. Immunocytochemical and physiological evidence of a synapse between dopamine and luteinizing hormone releasing hormone-containing neurons in the ewe median eminence. **Endocrinology**, v. 124, p. 1579-1581, 1989.

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. 827-832, 1975.

LAMBERTS, R.; VIJAYAN, E.; GRAF, M.; MANSKY, T.; WUTTKE, W. Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release. **Experimental Brain Research**, v. 52, p. 356-360, 1983.

LANGUB JR., M. C.; MALEY, B. E.; WATSON JR., R. E. Ultrastructural evidence for luteinizing hormone-releasing hormone neuronal control of estrogen responsive neurons in the preoptic area. **Endocrinology**, v. 198, p. 27-36, 1991.

LEGAN, S. S. J.; CALLAHAN, W. H. Supression of tonic LH secretion and norepinephrine release near GnRH neurons by estradiol in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 79, p. 237-245, 1999.

LEUNG, P. C.; ARENDASH, G. W.; WHITMOYER, D. I.; GORSKI, R. A.; SAWYER, C. H. Differential effects of central adrenoceptor agonist on luteinizing hormone release. **Neuroendocrinology**, v. 34, p. 207-214, 1982.

LOBO, R. B.; FERNÁNDEZ, M. B.; MAFFEI, W. E.; BEZERRA, L. A. F.; LOBO, M. P.; GAVIO, D.; RIBEIRO, L. B. Estudo preliminar da mensuração do perímetro ovariano em bezerras da raça Nelore participantes do PMGRN. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 127-128, 2001.

LOCATELLI, V.; PETRAGLIA, F.; PENALVA, A.; PANERAI, A. E. Effects of dopaminergic drugs on hypothalamic and pituitary immunoreactive β -endorphin concentrations in the rat. **Life Science**, v. 33, p. 1711-1717, 1983.

MARSON, E. P. M.; GUIMARAES, J. D.; SILVA, J. C. P.; NETO, T. M.; GUIMARAES, S. E. F.; BORGES, A. M.; MARTINS, G. J. T.; SANTOS, R. L. D. Concentrações plasmáticas de progesterona em novilhas compostas Montana Tropical. durante as fase pré-puberal e puberal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 134-136, 2001.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária. Farmacologia e técnicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, 235 p.

McNEILLY, A. S. Prolactin and the control of gonadotropin secretion in the female. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 537-549, 1980.

MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LOBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. M. Is the American Zebu really *Bos indicus*. **Genetic Molecular Biology**, v. 22, p. 543-546, 1999.

MELVIN, E. J.; LINDSEY, B. R.; QUINTAL-FRANCO, J.; ZANELLA, E.; FIKE, K. E.; VAN TASSELL, C. P.; KINDER, J. E. Circulating concentrations of estradiol. luteinizing hormone. and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian

follicular development in prepubertal cattle. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 405-412, 1999.

MEZZADRA, C.; HOMSE, A.; SAMPEDRO, D.; ALBERIO, R. Pubertal traits and seasonal variation of the sexual activity in Brahman. Hereford and crossbred heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 987-996, 1993.

MEYER, S. L.; GOODMAN, R. L. Neurotransmitter involved in mediating the steroid-dependent suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in anestrus ewes: effects of receptor antagonist. **Endocrinology**, v. 116, p. 2054-2061, 1985.

MILAZZOTTO, M. P.; PERRI, S. H.; CAMPAGNARI, F.; GARCIA, J. F. Genetic analysis of early puberty phenotype in *Bos primigenius indicus*. **Theriogenology**, v. 57, p. 613, 2002, Supplement 1.

MISZTAL, T.; ROMANOWICZ, K.; BARCIKOWSKI, B. Effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in anestrus ewes following dopamine and opiate receptor blockade. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 245-259, 2004.

MITSUSHIMA, D.; HEI, D. L.; TERASAWA, E. γ -aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone releasing hormone before the onset of puberty. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, 395-399, 1994.

MOGUILEVSKY, J. A.; CARBONE, S.; SZWARCFARB, B.; RONDINA, D. Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotrophin secretion in female rats. **Brain Research**, v. 563, p. 12-16, 1991.

MORELLO, H.; CALIGARIS, L.; HAYMAL, B.; TALEISNIK, S. Inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. **Neuroendocrinology**, v. 50, p. 81-87, 1989.

NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone. luteinizing hormone. estradiol-17 β . testosterone. progesterone. and inhibin in heifers from birth to puberty. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, p. 57-69, 2000.

NAKADA, K.; MORIOYOSHI, M.; NAKAO, T. Changes in peripheral levels of LH and FSH in prepubertal heifers after estradiol treatment. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47, p. 341-349, 2001.

NEGUSSIE, B.; BRANNANG, E.; ROTTMANN, O. J. Reproductive performance and herd life of dairy cattle at Asella livestock farm. Arsi. Ethiopia. II. Crossbreds with 50. 75 e 87.5% European inheritance. **Journal of Animal Breeding Genetic**, v. 116, p. 225-234, 1999.

NEINDRE, P. L.; BOIVEIN, X.; BOIVIN, A. Handling of extensively kept animals. **Applied Animal Behavior Science**, v. 489, p. 73-81, 1996.

NG'WENA, A. G. M.; PATEL, N. B.; WANGO, E. O. Plasma luteinizing hormone levels in response to gonadotropin-releasing hormone agonist and clonidine in trypanosoma congolense-infected female goats. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 591-595, 1997.

NOGUEIRA, G. P.; BARNABE, R. C.; VERRESCHI, I. T. N. Puberty and growth rate in throughbred filies. **Theriogenology**, v. 48, p. 581-588, 1997.

NOGUEIRA, G. P.; DE LUCIA, R. F. S.; PEREIRA, F. V.; CIRILO, P. D. Precocious fertility in Nelore heifers. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 382, 2003, Supplement 1.

NOGUEIRA, G. P.; OLIVEIRA, D. J. C. Gaba inhibitor stimulates lh secretion in pre-pubertal nelore heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro, Brasil. **Anais...** Porto Seguro: ICAR, 2005. p. 122.

OJEDA, S. R.; NEGRO-VILAR, A.; MCCANN, S. M. Evidence for involvement of α -adrenergic receptors in norepinephrine-induced prostaglandin E2 and luteinizing hormone-releasing hormone release from the median eminence. **Endocrinology**, v. 110, p. 409-412, 1982.

OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, 1878 p.

OLIVEIRA, D. J. C.; NOGUEIRA, G. P.; GUERRA, F. F.; SPOSITO, C. S.; VALENCIO, C. S.; BELTRAN, M. P. Efeitos do tratamento com sulpiride (antagonista da dopamina) na secreção de LH em novilhas da raça nelore pré-púberes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: CBRA. 2005. (CD ROOM).

ORIHUELA, A. Effect of calf stimulus on the milk yield of Zeby type cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 26, p. 187-190, 1990.

OYEDIPE, E. O.; OSORI, D. I. K.; AKEREJOLA, O.; SAROR, D. Effect of level of nutrition on onset of puberty and conception rate of Zebu heifers. **Theriogenology**, v. 18, p. 525-539, 1982.

PATTERSON, D. J.; CORAH, L. R.; BRETHOUR, J. R. Response of prepubertal *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers to melengestrol acetate with or without gonadotropin-releasing hormone. **Theriogenology**, v. 33, p. 661-668, 1990.

PATTERSON, D. J.; CORAH, L. R.; BRETHOUR, J. R.; HIGGINS, J. J.; KIRACOFÉ, G. H.; STEVENSON, J. S. Evaluation of reproductive traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred heifers: relationship of age at puberty to length of the post partum interval to estrus. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1994-1999, 1992a.

PATTERSON, D. J.; PERRY, R. C.; KIRACOFÉ, G. H.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B.; CORAH, L. R. Management considerations in heifers development and puberty. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 4018-4035, 1992b.

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.

PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J. J. S.; KROETZ, L. A. Produtividade a desmama de novilhas Nelore e F1 *Bos taurus* x Nelore e *Bos indicus* x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1712-1719, 2001.

PERRY, R. C.; CORAH, L. R.; COCHRAN, R. C.; BRETHOUR, J. R.; OLSON, K. C.; HIGGINS, J. J. Effect of hay quality, breed and ovarian development on onset of puberty and reproductive performance of beef heifers. **Journal of Production Agriculture**, v. 4, p. 13-18, 1991.

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.

PI, W. P. Effects of adrenergic antagonist on LH surge in short-term ovariectomized-steroids-primed rats. **Proceedings of the National Science Council**, v. 23, n. 3, p. 120-125, 1999.

PINEDA, N. Base genética brasileira para ser multiplicada. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2004. p. 15-20.

PRZEKOP, F.; TOMASZEWSKA, D. Responses in the hypothalamic monoaminergic system activity in ewes to beta-endorphin. CRF and their antagonists. **Acta Neurobiologiae Experimentalis Warsaw**, v. 56, p. 807-817, 1996.

PEREIRA, J. C. C. Contribuição genética do Zebu na pecuária bovina do Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 21, p. 30-38, 2000.

RAJARATNE, A. A. J.; RANAWANA, S. S. E.; THILAKARATNE, N.; SRIKANDAKUMAR, A. Comparative tolerance of hot-humid climatic conditions by three species (*Bos taurus*, *Bos indicus*, and *Bubalus bubalis*) of Bovidae. **Sri Lanka Veterinary Journal**, v. 31, p. 21-26, 1983.

RAPISARDA, J. J.; BERGMAN, K. S.; STEINER, R. A.; FOSTER, D. L. Response to estradiol inhibition of tonic luteinizing hormone secretion decreases during the final stage of puberty in the rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 112, p. 1172-1179, 1983.

RASMUSSEN, D. D. Dopamine-opioid interaction in the regulation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion. **Neuroendocrinology Letters**, v. 13, p. 419-424, 1991.

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

RECABARREN, S. E.; LOBOS, A.; ARAYA, M.; DÍAZ, V.; PARILO, J. A. Evaluación de la acción de un antagonista de receptores gabaérgicos sobre la secreción de hormona luteinizante, antes, durante y después de ayuno en ovejas prepúberes. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 36, p. 1-10, 2004.

REITER, E. O.; GRUMBACK, M. M. Neuroendocrine control mechanisms and the onset of puberty. **Annual Reviews of Physiology**, v. 44, p. 595-613, 1982.

RE, G.; BADINO, P.; ODORE, R.; ZIZZADORO, C.; ORMAS, P.; GIRARDI, C.; BELLOLI, C. Identification of functional alpha-adrenoceptor subtypes in the bovine

female genital tract during different phases of the oestrous cycle. **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 479-494, 2002.

RESTLE, J.; POLLI, V. A.; SENNA, D. B. Efeito do grupo genético e heterose sobre a idade e peso à puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 701-707, 1999.

RHODES, F. M.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. E. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1437-1443, 1996.

RIBADU, A. Y.; NAKADA, K.; TANAKA, Y.; MORIYOSHI, M.; ZHANG, W. C.; NAKAO, T. Lack of lh response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 112, p. 150-156, 1983.

ROCHA, M. G.; LOBATO, J. F. P. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1388-1395, 2002.

RODRIGUES, R. O. L.; SEGURA, C. V. M. Effect of once-daily suckling on postpartum reproduction in Zebu-cross cows in the tropics. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p. 1-5, 1995.

RODRIGUEZ, R. E.; WISE, M. E. Advancement of postnatal pulsatile luteinizing hormone secretion in the bull calf by pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone during infantile development. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 432-439, 1991.

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

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Tratament with 17 β -oestradiol does not influence age and weight at puberty in *Bos indicus* heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 1-10, 1999.

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

ROPERT, J. F.; QUIGLEY, M. E.; YEN, S. S. The dopaminergic inhibition of LH secretion during the menstrual cycle. **Life of Science**, v. 34, p. 2067-2073, 1984.

SALICIONI, A. M.; CARÓN, R. W.; DEIS, R. P. Participation of both adrenergic and opiodergic systems in the negative feedback of adrenal progesterone on LH secretion. **European Journal of Pharmacology**, v. 332, p. 283-287, 1997.

SÁNCHEZ, J. G.; MALPAUX, B.; THIERY, J. C. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 38, p. 3-15, 1998.

SANDERS, J. O. History and development of Zebu cattle in the United States. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 1188-1200, 1980.

SAS. **SAS/STAT user's guide**. New York: SAS Institute Inc., 1998. (CD ROOM).

SCHAMS, D.; SCHALLENBERGER, E.; GOMBE, S.; KARG, H. 1981. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 103-110, 1981.

SCHOPPEE, P. D.; ARMSTRONG, J. D.; HARVEY, R. W.; WASHBURN, S. P.; FELIX, A.; CAMPBELL, R. M. Endocrine and ovarian responses to exogenous estradiol-17 β in 6-month-old heifers previously immunized against growth hormone-releasing factor. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2071-2078, 1995.

SCHOPPEE, P. D.; FOUTS, W. B.; ARMSTRONG, J. D. Exogenous oestradiol-17 β induces precocious puberty in 8-mo-old Angus heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73 (S1), p. 222, 1995, Supplement 1.

SCACCHI, P.; CARBONE, S.; SZWARCFARB, B.; RONDINA, D.; WUTTKE, W.; MOGUILEVSKY, J. A. Interactions between GABAergic and serotonergic systems with excitatory amino acid neurotransmission in the hypothalamic control of gonadotropin secretion in prepubertal female rats. **Developmental Brain Research**, v. 105, p. 51-58, 1998.

SCHILLO, K. K.; HANSEN, P. J.; KAMWANJA, L. A.; DIERSCHKE, D. J.; HAUSER, E. R. Influence of season on sexual development in heifers: age at puberty as related to growth and serum concentrations of gonadotropins. prolactina. thyroxine and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 329-341, 1983.

SCOTT, C. J.; CLARKE, B. J. Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for γ -amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. **Endocrinology**, v. 133, p. 1993.

SCOTT, C. J.; TILBROOK, A. J.; RAWSON, J. A.; CLARKE, I. J. Gonadal steroid receptors in the regulation of gnRH secretion in farm animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-66, p. 313-326, 2000.

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

SEROVA, L.; RIVKIN, M.; NAKASHIMA, A.; SABBAN, E. Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzyme in rat locus coeruleus. **Neuroendocrinology**, v. 75, p. 193-200, 2002.

SILVA, M. A.; PEREIRA, F. A. Crescimento e desempenho reprodutivo de animais Zebus e mestiços Chianina-Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 15, p. 116-123, 1986.

SILVA, L. F. P. Interface da nutrição com a reprodução: o que fazer? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: GERAEMBRYO, 2005. p. 1-12.

SOUZA, E. M.; MILAGRES, J. C.; SILVA, M. A.; REGAZZI, A. J.; CASTRO, A. G. C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 926-935, 1995.

SULLIVAN, S. D.; MOENTER, S. M. GABAergic integration of progesterone and androgen feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 33-41, 2005.

SZWARCFARB, B.; CARBONE, S.; STEIN, M. L.; MEDINA, J.; MOGUILEVSKY, J. A. Sexual differences in the effect of GABAergic system on LH secretion and in the hypothalamic ontogenesis of GABA-A receptors in prepubertad rats. **Brain Research**, v. 646, p. 351-355, 1994.

TERASAWA, E. Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 283-295, 1998.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 111-151, 2001.

THOMAS, G. B.; SCOTT, C. J.; CUMMINS, J. T.; CLARKE, I. J. Adrenergic regulation of growth hormone secretion in the ewe. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 11, p. 187-195, 1994.

TORTONESE, D. J. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. **Endocrinology**, v. 140, p. 750-757, 1999.

TORTONESE, D. J.; LINCOLN, G. A. Photoperiodic modulation of the dopaminergic control of pulsatile LH secretion in sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 25-32, 1994.

TRAN, T. Q.; WARNICK, A. C.; HAMMOND, M. E.; KOGER, M. Reproduction in Brahman cows calving for the first time at two or three years of age. **Theriogenology**, v. 29, p. 751-756, 1988.

VARGAS, C. A.; ELZO, M. A.; CHASE JR., C. C.; CHENOWETH, P. J.; OLSON, T. A. Estimation of genetic parameters for scrotal circumference, age at puberty in heifers and hip height in Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2536-2541, 1998.

VIANA, J. A. C. **O terceiro mundo não é assim: está assim!** Belo Horizonte: FEP-MVZ/UFMG – Escola de Veterinária, 1999. 689 p.

ZAREMBA, D. T.; PRZEKOP, F.; MATEUSIAK, K. The involvement of GABAA receptors in the control of GnRH and β -Endorphin release, and catecholaminergic activity in the ventromedial-infundibular region of hypothalamus in anestrus ewes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, p. 489-500, 2001.

WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; ROBERSON, M. S.; WOLFE, P. L.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Oestradiol influences on pattern of gonadotropin secretion in bovine males during the period of changed response to oestradiol feedback in age-matched females. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 626, 1989, Supplement 1.

WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; WOLFE, P. L.; DAY, M. L.; KOCH, R. M.; KINDER, J. E. Effect of selection for growth traits on age and weight at puberty in bovine females. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1595-1602, 1990.

WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; ROBERSON, M. S.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Opioid and 17 β -estradiol regulation of lh and fsh secretion during sexual maturation in heifers. **Domestical Animal Endocrinology**, v. 8, p. 491-498, 1991.

WOLFE, M. W.; ROBERSON, M. S.; STUMPF, T. T.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Modulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in circulation by interactions between endogenous opioids and oestradiol during the peripubertal period of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 165-174, 1992.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 535-547, 2000.

YAMADA, S.; UENOYAMA, Y.; MAEDA, K.; TSUKAMURA, H. Role of noradrenergic receptors on the bed nucleus on the stria terminalis in regulating pulsatile hormone secretion in female rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 115-121, 2006.

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.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Grupo Picrotoxina. Novilhas do grupo controle que receberam solução salina a 0,09%

8 MESES

10 MESES

14 MESES

17 MESES

APÊNDICE B - Grupo Picrotoxina. Novilhas inteiras receberam picrotoxina 0,18 mg/kg.

APÊNDICE C - Grupo Picrotoxina Novilhas ovariectomizadas que receberam administração endovenosa de Picrotoxina

8 MESES

10 MESES

14 MESES

17 MESES

APÊNDICE D - Grupo Sulpiride Novilhas controle

8 MESES

12 MESES

16 MESES

APÊNDICE E - Grupo Sulpiride. Novilhas inteiras

8 MESES

12 MESES

16 MESES

APÊNDICE F - Grupo sulpiride. Novilhas ovariectomizadas

APÊNDICE G - Grupo Clonidina. Novilhas controle.

8 MESES

12 MESES

15 MESES

APÊNDICE H - Grupo Clonidina. Novilhas inteiras

8 MESES

12 MESES

15 MESES

15 MESES

APÊNDICE J - Grupo 17Bestradiol. Novilhas inteiras.

APÊNDICE K - Grupo 17Bestradiol. Novilhas ovariectomizadas.

APÊNDICE L - Concentração de LH da desmama a primeira ovulação. Novilhas ovariectomizadas e inteiras.

APÊNDICE M - Novilhas ovariectomizadas que receberam salina

APÊNDICE N - Novilhas ovariectomizadas que receberam salina

17 MESES

19 MESES