

# Serum levels of ghrelin, growth hormone, and insulin during growth of cattle under tropical conditions<sup>x</sup>

*Niveles séricos de ghrelina, hormona del crecimiento e insulina en la fase de crecimiento de bovinos en condiciones de trópico*

*Níveis séricos de ghrelina, hormônio do crescimento e insulina na fase de crescimento de bovinos em condições de tropico*

Fernando Heredia<sup>1</sup>, MVZ, MSc; Rómulo Campos<sup>1\*</sup>, MV, MSc, DSc; Leonidas Giraldo<sup>1</sup>, MVZ; Katherine García<sup>1</sup>, Zoot, MSc

*\*Autor para correspondencia: Rómulo Campos Gaona. Departamento de Ciencia Animal, Universidad Nacional de Colombia. AA 232, Palmira. Teléfono: (572) 2868802. Correo electrónico: rcamposg@unal.edu.co*

*El presente trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia.*

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia Animal, Universidad Nacional de Colombia, Campus Palmira. Colombia.

*(Recibido: 20 de octubre, 2014; aceptado: 10 de abril, 2015)*

## Abstract

From a physiological and animal production standpoint, it is important to know the factors associated with growth and development of the rumen. Calf transition from monogastric into ruminant involves structural and physiological changes of the digestive system. This process involves hormones that affect both the orexigenic (ghrelin) and metabolic phases, and also nutrient utilization (i.e., insulin and growth hormone). The aim of this study was to monitor growth of calves between birth and six months of age and determine serum ghrelin, growth hormone, and insulin, in three breeds. Eight animals were selected from each breed (Harton del Valle, Holstein, and Brahman). Body weight was measured and blood samples collected every 30 days. Protein was analyzed by direct refractometry, insulin and ghrelin by radioimmunoassay (RIA), glucose by enzymatic colorimetry, and growth hormone (HG) by ELISA. A factorial design with two main effects (animal breed and sampling age) was used, blocking by weight groups. Analysis of variance showed differences ( $p < 0.05$ ) for main effects. The observed mean values were: 529 g/day weight gain, 55.6 g/L protein, 4.99 mmol/L glucose, 297.69 pmol/L insulin, 59.11 pmol/L ghrelin, and 12,87 ug/L HG. Differences were observed for hormone values and indicators by age of calves at the time of sampling.

## Key words

*Cattle, gastrointestinal hormones, growth, rumen development.*

<sup>x</sup>Para citar este artículo: Heredia F, Campos R, Giraldo L, García K. Niveles séricos de ghrelina, hormona del crecimiento e insulina en la fase de crecimiento de bovinos en condiciones de trópico. Rev CES Med Zootec. 2015; Vol 10 (1): 45-56.

## Resumen

El conocimiento de los factores asociados al crecimiento y al desarrollo del rumen es importante desde el punto de vista fisiológico y de la producción animal. El paso de monogástrico a rumiante en terneros implica cambios estructurales y fisiológicos en el sistema digestivo. En el proceso intervienen hormonas que inciden en las fases orexigénica (ghrelina), metabólica y de utilización de nutrientes por parte del organismo (insulina y hormona de crecimiento). El objetivo del presente trabajo fue monitorear el crecimiento entre el nacimiento y seis meses de edad de terneros y determinar las concentraciones séricas de Ghrelina, hormona del crecimiento e insulina, en tres grupos raciales de bovinos. Fueron seleccionados ocho animales de cada raza (Hartón del Valle, Holstein y Brahman). Cada 30 días se determinó el peso vivo animal y se recolectaron muestras de sangre. La proteína se analizó por refractometría directa, la glucosa por colorimetría enzimática, la insulina y la ghrelina por radioinmunoanálisis (RIA) y la hormona del crecimiento (HG) por la técnica de Elisa. Se utilizó un diseño factorial con dos efectos principales (raza y edad de muestreo), y un bloqueo final por grupos de peso de los animales. El análisis de varianza mostró diferencia ( $p < 0,05$ ) para los efectos principales. Los valores promedios fueron para ganancia de peso vivo 529 g/día, proteína 55,6 g/L, glucosa 4,99 mmol/L, insulina 297,69 pmol/L, ghrelina 59,11 pmol/L, y HG 12,87 ug/L. Se presentaron diferencias en los valores de hormonas e indicadores según la edad de los terneros al tiempo de muestreo.

## Palabras clave

*Bovinos, crecimiento, desarrollo del rumen, hormonas gastrointestinales.*

## Resumo

O conhecimento dos fatores associados ao crescimento e ao desenvolvimento do rumem é importante tanto desde o ponto de vista fisiológico quanto da produção animal. A mudança dos vitelos de monogástrico para ruminante implica mudanças estruturais e fisiológicas no sistema digestivo. No processo intervêm hormônios que incidem nas fases orexigénica (ghrelina), metabólica e de utilização de nutrientes por parte do organismo (insulina e hormônio do crescimento). O objetivo do presente trabalho foi monitorar o crescimento entre o nascimento e os seis meses de idade de vitelos e assim determinar as concentrações séricas de ghrelina, hormônio do crescimento e insulina, em três grupos raciais de bovinos. Foram selecionados oito animais de cada raça (Hartón del Valle, Holandês e Brahman). A cada 30 dias determinou-se o peso vivo do animal e se coletaram amostras de sangue. A proteína analisou-se por refractometria direta, a glucose por colorimetria enzimática, a insulina e a ghrelina por radioimunoanalise (RIA) e o hormônio do crescimento (HG) pela técnica de ELISA. Utilizou-se um desenho fatorial com dois efeitos principais (raça e idade de amostragem), e um bloqueio final por grupos de peso dos animais. O analise de variância apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os efeitos principais. Os valores médios foram para ganho de peso vivo, 529 g/dia; proteína, 55,6 g/L; glucose, 4,99 mmol/L; insulina, 297,69 pmol/L; ghrelina, 59,11 pmol/L, e HG, 12,87 µg/L. Apresentaram-se diferenças nos valores de hormônios e indicadores segundo a idade dos vitelos ao tempo de amostragem.

## Palavras chave

*Bovinos, crescimento, desenvolvimento do rumem, hormônios gastrointestinais.*

## Introducción

Los ruminantes activan su sistema digestivo, principalmente el rumen, durante los primeros meses de vida; en esta etapa muestran una mejor conversión de alimento, incremento de peso y desarrollo. Ésta fase es crítica en el cambio del tracto digestivo, al pasar de monogástrico a rumiante. Durante el crecimiento la relación costo-beneficio justifica el suministro de alimentos de alta

calidad nutritiva, para reemplazar la leche como único alimento. Cada compartimento gástrico desarrolla un proceso fisiológico específico; así mismo la capacidad del rumen y del abomaso son de diferente proporción, siendo mayor la del primero a través del tiempo<sup>23</sup>. El ternero nace con su aparato digestivo preparado para digerir la leche, absorber inmunoglobulinas para alcanzar la inmunidad pasiva y realizar la digestión enzimática del alimento, razón por la cual el abomaso duplica en tamaño

al rumen que inicialmente es rudimentario; su función digestiva es exclusiva y en él se secretan las enzimas (renina, pepsinógeno) y el ácido clorhídrico necesario para coagular y degradar la caseína<sup>5</sup>.

A través del reflejo denominado gotera esofágica se evita el ingreso de leche al rumen, ésta una vez coagulada en el abomaso, libera el suero lácteo que pasa al duodeno y es absorbido a nivel intestinal. La capacidad de aprovechar otros alimentos y sobre todo el forraje requiere del desarrollo del rumen, donde se realiza la colonización por microorganismos encargados de la degradación fermentativa del alimento; esta colonización se da de manera espontánea y gradual gracias al contacto de los terneros con bovinos adultos o por pastoreos en común. A medida que se desarrolla el rumen, las proporciones relativas de los compartimentos gástricos cambian hasta alcanzar su total desarrollo después de 8 o 10 meses, cuando se completa la diferenciación de los tejidos acompañada de un aumento gradual de las capas musculares y de la mucosa interna donde se desarrollan las papilas<sup>5</sup>. Al mismo tiempo en el epitelio interno se producen diversos cambios metabólicos que modifican el sustrato de oxidación<sup>23</sup>; así, a partir de la glucosa se obtienen productos finales de fermentación microbiana, como el butirato, y se desarrolla la capacidad de cetogénesis de los rumiantes adultos<sup>34</sup>.

El mayor desarrollo del rumen favorece una mejor utilización de forrajes y por ende, de alimentos de menor costo. Este proceso fisiológico origina cambios y adaptaciones tanto estructurales como histológicos.

Diferentes mecanismos fisiológicos son los responsables del crecimiento y en especial de la diferenciación del tracto gastrointestinal, entre éstos los cambios hormonales y la variación en los procesos bioquímicos asociados al tipo de alimento presente en los compartimentos digestivos. Las hormonas relacionadas con crecimiento y la actividad orexigénica son la ghrelina, la insulina y la hormona del crecimiento, las tres metabólicamente asociadas<sup>2,26</sup>.

En 1999, fue aislado e identificado un péptido de 28 aminoácidos al que denominaron Ghrelina<sup>21</sup>. El aislamiento y caracterización de ghrelina, el ligando natural para el receptor del factor liberador de la hormona del crecimiento, abrió una nueva ventana que condujo a entender distintos conceptos de la fisiología de la hormona del crecimiento y su secreción por la hipófisis, entre estos el papel de la HG en el anabolismo y la homeostasis, como también contribuyó a dilucidar la relación entre alimentación y motilidad gastrointestinal a través de las interacciones intestino-cerebro<sup>17</sup>. El

90% de ghrelina en el organismo se origina en el *fundus gastricus*; aunque también se encuentra en otros órganos como el rumen, los intestinos, el páncreas, sistema inmunológico<sup>14</sup>, hipotálamo e hipófisis<sup>20</sup>.

En 2005, fueron identificadas células ghrelina-inmuno-reactivas ampliamente distribuidas del cuello a la base de las glándulas oxínticas del estómago de humanos, bovinos, ovinos, cerdos y equinos<sup>13</sup>. La ghrelina, al igual que los secretagogos sintéticos, aumenta potentemente la liberación de la hormona de crecimiento (GH)<sup>2,32</sup>, y puede atravesar la barrera hemato-encefálica para ligarse con sus receptores en el cerebro. Estos receptores son principalmente expresados en el núcleo *arcuato* del hipotálamo donde se asocian localmente con la expresión del neuropéptido Y (NPY)<sup>29</sup>. La ghrelina fisiológicamente aumenta el consumo de alimentos, estimula la adipogénesis, disminuye la oxidación de las grasas<sup>3</sup>, la motilidad y secreción gástrica<sup>46</sup> y, tiene otras funciones hormonales sobre las funciones cardiovasculares, pulmonares y la función inmune<sup>37</sup>. La producción de ghrelina depende del contacto de las células estomacales con los alimentos, siendo su secreción inversamente proporcional a la cantidad del alimento consumido<sup>2</sup>. Se ha demostrado que el estómago regula de manera independiente la producción de ghrelina, no sólo cuando el animal come, sino también cuando recibe estímulos externos como olores y sabores y, su expresión puede ser estimulada por la hipoglucemia<sup>4</sup>.

La hormona del crecimiento (GH), además de ser secretada por la glándula pituitaria, es sintetizada por los linfocitos, la placenta, la glándula mamaria, la glándula pineal y el cerebro, lo que sugiere efectos tanto paracrinos como autocrinos<sup>25</sup>. Esta hormona posee cuatro isoformas, la secuencia de aminoácidos determina su especificidad; es producida principalmente en la hipófisis anterior por células acidófilas o somatotrofos y está constituida por una cadena polipeptídica de 190-191 aminoácidos con un peso molecular de 22,000 daltons<sup>22</sup>. La GH es una clásica hormona anabólica, única capaz de estimular un crecimiento rápido e integral del organismo animal; influye en el metabolismo de las proteínas y especialmente en el aumento de la retención de nitrógeno por el organismo; además, reduce la pérdida de nitrógeno en la orina en forma de urea o de otros productos de desecho nitrogenados, lo cual indica la retención de éstos. Otro efecto importante, es su influencia en el aumento de la permeabilidad de las células a los aminoácidos, con lo que se favorece la formación de las masas musculares y por esta vía la ganancia de peso<sup>25</sup>.

La insulina en mamíferos se libera bajo la influencia de varios estímulos, entre ellos, el consumo de proteínas y glucosa y su paso a la sangre a partir de los alimentos digeridos. Algunos carbohidratos se metabolizan y aumentan los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo, estimulando de inmediato la liberación de insulina en la circulación portal<sup>10</sup>. Esta hormona actúa en las células diana principalmente en el hígado, los músculos y el tejido adiposo, iniciando una transducción de señales cuyo efecto es el incremento en la captación de glucosa y su posterior almacenamiento, evitando, así, un ascenso excesivo de la glicemia postprandial. Interviene en el aprovechamiento de los nutrientes, sobre todo regulando el metabolismo de los carbohidratos; al igual que la GH, influye en la masa grasa y su distribución y, en la composición corporal<sup>26</sup>. Aparentemente el estímulo de la concentración de insulina en suero como factor de crecimiento modula algunos de los efectos de GH, por lo menos durante el crecimiento<sup>11</sup>.

Por otra parte, el crecimiento se asocia directamente con la ganancia de peso en animales en desarrollo; se ha buscado que la selección genética de toros se dé por mayor tasa potencial de formación de masa corporal. Además, si se considera que el consumo de alimento en niveles adecuados está directamente relacionado con el incremento de peso y crecimiento, y que el consumo es influenciado por las respuestas fisiológicas al llenado estomacal y la fisiología del apetito, es factible evidenciar relaciones entre las modificaciones digestivas y hormonas como ghrelina, insulina y hormona del crecimiento, que puedan ser empleadas como marcadores de desarrollo<sup>9</sup>.

La hipótesis del presente trabajo y como un aporte en el estudio de la diferenciación del TGI de rumiantes, el cual tradicionalmente ha empleado el sacrificio planeado como herramienta de trabajo, plantea determinar tres hormonas directamente relacionadas con la función digestiva: ghrelina, insulina y hormona del crecimiento, que puedan ser consideradas como indicador indirecto del desarrollo del sistema digestivo.

El objetivo en este trabajo fue analizar el desarrollo entre el nacimiento y los seis meses de edad, evidenciado mediante ganancia de peso y su relación con las concentraciones séricas de hormonas ghrelina, de crecimiento e insulina, en tres grupos raciales de bovinos.

## Materiales y métodos

### Localización geográfica

El estudio se efectuó en la zona agroecológica comprendida entre 3° 25' N a 4° 25' N y 76° 09' O a 76°

14' O, Colombia, entre 650 y 1057 m.s.n.m., 20 a 28 °C y 70–80% HR, dentro de la zona de bosque seco montano bajo (bs-MB)<sup>15</sup>.

### Aval de ética

Para la realización de la presente investigación se cumplió con las normas nacionales e internacionales de bioética en la investigación con animales del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) y las normas de buenas prácticas en investigación con animales de laboratorio. Para el experimento se obtuvo el aval del comité de ética de investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, consignado en el Acta 3 de Noviembre 18 de 2010.

### Sistemas de manejo de los sujetos experimentales

El trabajo se realizó en animales de tres grupos raciales: Brahman (*Bos indicus*) y Holstein y Hartón del Valle (*Bos taurus*), esta última raza nativa colombiana. De cada una de ellos se seleccionaron ocho terneros, para un total de 24 animales experimentales. Previo el estudio se realizó un registro de información básica que incluyó fecha de nacimiento, días al nacimiento, sexo, peso vivo y estado clínico. Todos los animales en el estudio permanecieron en las condiciones de manejo de sus hatos respectivos.

Los terneros de la raza Brahman permanecieron en pastoreo con sus madres durante el tiempo de investigación. La base de alimentación fue pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), puntero (*Hyparrhenia rufa*), humidicola (*Bracharia humidicola*), brizanta (*B. brizanta*), tanzania (*B. tanzania*), decumbes cv. Común (*B. decumbens*), los animales contaban con acceso permanente a sal mineralizada (4% de fósforo) y agua.

Los animales de la raza Holstein pertenecían a una explotación de lechería intensiva con cría artificial, por lo tanto solo se contó con terneras hembras, que permanecían con sus madres durante tres días, antes de ser trasladadas a 'la guardería', donde recibían leche en balde a razón de 6 L/día durante 60 días, previa adaptación con tetero por dos días. Desde el día 10 hasta el día 60 recibieron suplementación con un concentrado iniciador comercial (proteína 16%, grasa 2.5%, fibra 1.5%, cenizas 1.0%, humedad 13%) hasta alcanzar un consumo máximo de 1 kg/animal por día. Entre el día 60 a 120 de edad los animales se alojaron en cubículos independientes cubiertos, con piso en cemento y acceso a un pequeño potrero común durante las horas de la mañana. Después de esta edad pasaron a potreros de pastos estrella (*Cynodon*

*nlemfuensis*), guinea (*Panicum maximum*) y elefante (*Pennisetum purpureum*), adicionalmente, se suministró concentrado comercial (NDT 85%), sal mineralizada (9% de fósforo) y agua a libre disposición. Después de cinco meses, cuando alcanzaron un peso vivo entre 140 y 150 kg, fueron trasladadas a pasturas de guinea o estrella, con acceso a voluntad a sal mineralizada y agua.

Los terneros de la raza Hartón permanecieron con las madres durante el período experimental, consumieron calostro hasta el día tres después del nacimiento; posteriormente, durante la noche y hasta el ordeño de la mañana siguiente permanecían separados de las madres. Una vez finalizado el ordeño, a los terneros se les permitía el amamantamiento para que consumieran la leche residual y luego eran llevados a un potrero con acceso permanente a agua y suplementación de pasto picado adicionado con sal y melaza, siempre aislados de la madre hasta el día siguiente. Este manejo se hizo hasta el destete a los cinco meses de edad. En el mes seis los animales de este grupo racial fueron manejados en un sistema silvopastoril en rotación de pasturas mixtas de estrella y leucaena (*Leucaena leucocephala*), o estrella y cratylia (*Cratylia argentea*), brachiaria cv. Común, cv. Toledo (*B. brizantha* -CIAT 26110-), pasto morado (*Penisetum hybridum*), melaza, sal mineralizada (4% de fósforo) y agua a libre disposición.

#### *Colecta de muestras*

Las muestras de sangre fueron tomadas una vez por mes (período) desde el nacimiento hasta los seis meses, siempre entre las 9 y las 11 a.m. mediante venipunción yugular y sistema vacutainer en tubos sin anticoagulante; éstas se identificaron y se transportaron refrigeradas al laboratorio, donde se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 15 min para obtener suero, el cual se fraccionó en alícuotas y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de los análisis. Una vez finalizada la colecta sanguínea los animales eran pesados.

#### *Análisis de metabolitos y hormonas*

Las determinaciones de glucosa se hicieron mediante ensayo enzimático colorimétrico con un equipo de lectura óptica automatizada, el analizador enzimático RAYTO (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd. Nanshan Shenzhen, China) empleando reactivo comercial IHR. La proteína total se valoró por lectura directa en suero utilizando refractómetro manual. La concentración de insulina fue cuantificada mediante radioinmunoensayo de fase sólida con reactivo comercial (RIA, Insulina Siemens lote 936). Para la determinación

de la concentración sérica de ghrelina se empleó reactivo comercial multiespecie RIA de fase sólida, referencia Millipore GHRA-88HK. La determinación de hormona del crecimiento fue realizada mediante prueba Elisa en microplaca, kit comercial GH-Bovine KA2270 de Abnova.

#### *Análisis estadístico*

Se utilizó un modelo estadístico de arreglo factorial con dos efectos principales (raza y edad de muestreo) y un bloqueo posterior para dos rangos de peso (alto y bajo). Las variables de respuesta correspondieron al peso, los metabolitos y hormonas, las cuales fueron analizadas con el programa estadístico<sup>35</sup> SAS 9.1 (Cary, NC). Las hipótesis de posibles diferencias entre grupos raciales y edades frente a las variables experimentales se analizaron mediante Anova multifactorial y se usó la prueba de Tukey para verificar las diferencias significativas entre los valores medios de las variables en cada grupo. Adicionalmente, se realizaron pruebas de correlación de Pearson para analizar la posible relación entre variables. Antes de los análisis se realizaron pruebas de normalidad y ajuste de valores críticos. La significancia se aceptó con una  $p \leq 0,05$  y se analizó el error experimental tipo I.

## **Resultados**

#### *Ganancias de peso vivo animal*

La ganancia diaria promedio de peso vivo (PV) fue de  $529 \pm 41$  g (Tabla 1), que se encuentra dentro de los rangos esperados para estos tipos de animales en pasturas tropicales<sup>7,27</sup>.

#### *Proteína y glucosa sérica*

Los niveles séricos promedio de proteína en los terneros estudiados fueron de  $55,6 \pm 12,5$  g/L; los valores de glucosa encontrados corresponde a  $4,99 \pm 0,29$  mmol/L (Tabla 2).

#### *Hormonas*

*Ghrelina.* La concentración sérica media de la hormona ghrelina fue de  $59,11 \pm 0,95$  pmol/L (Tablas 2 y 3), el coeficiente de variación intraensayo  $<8\%$  y la sensibilidad de 2,31 pmol/L.

*Hormona del crecimiento.* La concentración sérica de la GH en los animales fue en promedio  $12,87 \pm 1,35$  ug/L (Tablas 2 y 3). El coeficiente de variación intraensayo  $<5\%$  y la sensibilidad de 0,5 ug/L.

**Tabla 1.** Peso promedio (kg de peso vivo) en terneros de tres razas bovinas, en los seis períodos experimentales, según el rango de peso (bajo y alto).

Período	Grupo 1: peso bajo			Grupo 2: peso alto		
	Brahman	Holstein	Hartón	Brahman	Holstein	Hartón
1	33,62 ±1,1	37,2±3,1	33±4,0	58±0,2	53,7±8,7	43,7±2,1
2	58±0,01	70±4,69	51±1,73	67±0,01	86,3±6,1	58±0,01
3	94±0,01	96±4,34	64,7±4,3	102±0,01	108,7±5,6	76±3,4
4	102±0,01	120±2,3	81,2±0,9	105±0,01	127,5±0,7	88,7±2,31
5	105±0,01	131±0,01	93,5±0,7	135±0,01	139,3±0,3	103±1,15
6	133±0,01	147,3±4,2	106,3±0,6	144±0,01	160±4,95	123±11,36

**Tabla 2.** Concentración sérica de proteína, glucosa, insulina, ghrelina y hormona del crecimiento (valores medios) por rangos de edad para las tres razas en estudio.

Rango de edad (días)	Proteína (g/l)	Glucosa (mmol/L)	Insulina (pmol/L)	Ghrelina (pmol/L)	GH (ug/L)
0 a 30	54,9 <sup>ab</sup>	5,64 <sup>ab</sup>	299,13 <sup>bc</sup>	60,09 <sup>a</sup>	13,69 <sup>b</sup>
31 a 60	52,3 <sup>b</sup>	5,69 <sup>a</sup>	287,43 <sup>b</sup>	59,53 <sup>b</sup>	13,84 <sup>b</sup>
61 a 90	55,1 <sup>ab</sup>	4,90 <sup>ab</sup>	264,40 <sup>c</sup>	58,23 <sup>b</sup>	12,16 <sup>b</sup>
91 a 120	54,8 <sup>ab</sup>	4,91 <sup>ab</sup>	295,83 <sup>b</sup>	58,05 <sup>b</sup>	9,59 <sup>c</sup>
121 a 150	57,3 <sup>ab</sup>	4,54 <sup>bc</sup>	277,03 <sup>bc</sup>	59,22 <sup>b</sup>	13,58 <sup>bc</sup>
151 a 180	59,8 <sup>a</sup>	3,77 <sup>cd</sup>	343,83 <sup>a</sup>	58,23 <sup>b</sup>	14,31 <sup>a</sup>
Promedio	55,6	4,99	297,69	59,14	12,87

\* Valores con diferente letra en la misma columna, presentan diferencia significativa (p<0,05) según la prueba de Tukey.

**Tabla 3.** Niveles séricos de insulina, ghrelina y hormona del crecimiento en los distintos grupos de edad, según el rango de peso (bajo o alto).

Rango edad (días)	Insulina (pmol/L)		Ghrelina (pmol/L)		GH (ug/l)	
	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Alto
0-30	205,64 <sup>bac*</sup>	392,62 <sup>ba</sup>	58,89 <sup>a</sup>	61,30 <sup>a</sup>	9,52 <sup>bc</sup>	17,86 <sup>a</sup>
31-60	260,95 <sup>a</sup>	310,89 <sup>b</sup>	58,21 <sup>ba</sup>	59,92 <sup>bc</sup>	11,46 <sup>c</sup>	15,30 <sup>a</sup>
61-90	173,92 <sup>bc</sup>	385,08 <sup>ba</sup>	57,57 <sup>bc</sup>	59,10 <sup>c</sup>	9,68 <sup>bc</sup>	15,46 <sup>a</sup>
91-120	224,79 <sup>ba</sup>	376,83 <sup>ba</sup>	57,20 <sup>bc</sup>	59,01 <sup>c</sup>	8,23 <sup>c</sup>	11,14 <sup>b</sup>
121-150	153,55 <sup>c</sup>	378,05 <sup>ba</sup>	57,28 <sup>bc</sup>	60,81 <sup>ba</sup>	10,76 <sup>bc</sup>	15,89 <sup>a</sup>
151-180	264,90 <sup>a</sup>	435,95 <sup>a</sup>	56,41 <sup>c</sup>	60,35 <sup>ba</sup>	10,17 <sup>ba</sup>	19,12 <sup>a</sup>

\* Valores con diferente letra en la misma columna, presentan diferencia significativa (p<0,05) según la prueba de Tukey.

**Insulina.** La concentración sérica media de insulina de los animales incluidos en este estudio fue 297,69 ± 80,36 pmol/L (Tablas 2 y 3). El coeficiente de variación intraensayo <10% y la sensibilidad de 86,10 pmol/L.

La tabla 4, presenta las concentraciones séricas de las hormonas analizadas en el estudio en relación a la edad de muestreo para cada una de las razas consideradas en el estudio.

**Tabla 4.** Promedios para los valores séricos de insulina, ghrelina y hormona del crecimiento por rangos de edad en los primeros 6 meses de vida, para las razas Brahman, Holstein y Hartón del Valle.

Edad (días)	Insulina (pmol/L)			Ghrelina (pmol/L)			GH (ug/l)		
	BR	HF	HV	BR	HF	HV	BR	HF	HV
0 - 30	229,24	305,44	438,11	60,37	60,01	59,64	14,81	10,84	16,17
31 - 60	199,75	290,23	437,60	59,56	57,82	60,78	14,69	14,11	11,92
61 - 90	167,46	294,89	326,39	59,53	58,48	56,90	10,20	16,18	10,59
91 - 120	291,95	211,30	371,74	59,63	58,93	56,39	8,82	9,90	9,78
121 - 150	240,65	243,09	384,15	59,46	58,65	59,16	10,24	14,15	20,48
151 - 180	306,37	308,53	385,73	58,82	59,03	57,37	8,76	13,71	16,64

BR=Brahman, HO= Holstein Friesian, HV= Hartón del Valle

## Discusión

### Ganancias de peso vivo animal

Los terneros Brahmán presentaron las mayores ganancias de PV entre las razas evaluadas en este trabajo, alcanzando un promedio de 604 g/día, similar a la obtenida en investigaciones previas (666 g/día)<sup>7</sup> y mayor que la encontrada para esta raza (130 g/día)<sup>27</sup> en un ambiente similar -terneros amamantados al pie de la madre- pero bajo condiciones de manejo extremas. En la raza Holstein<sup>39</sup>, se informa un promedio de aumento diario de PV de 400 g, mientras que en el presente estudio los animales alcanzaron una ganancia media de 557 g/día.

En el análisis estadístico por bloques para los rangos de PV, se encontró que en los animales de bajo peso no se presentaron diferencias ( $p>0,05$ ) entre razas, mientras que en los animales con rango de peso más alto se presentaron diferencias ( $P<0,05$ ) en el grupo racial Hartón del Valle frente a las demás razas. La menor ganancia de PV en esta raza probablemente fue debida a la baja oferta de alimento y al amamantamiento restringido, en comparación con los animales Brahmán que permanecieron todo el tiempo en amamantamiento sin restricciones y frente a los Holstein que recibieron leche y alimento concentrado iniciador. En el presente estudio la ganancia diaria de PV en animales Hartón del Valle fue  $393 \pm 26$  g/día, seguida, por los terneros Holstein y los Brahman. Además de la raza, la edad fue un factor determinante de la ganancia de PV animal.

La menor ganancia de PV durante el primer período (Tabla 1) posiblemente se debió a la reducida capacidad gástrica de los terneros en esta edad, lo que se refleja en

menor consumo de alimento. La capacidad del estómago en los rumiantes varía considerablemente dependiendo de la edad, el tamaño del animal y la dieta<sup>5</sup>, la variación en estas condiciones se evidencia en el presente trabajo cuando se comparan las ganancias diarias de peso, según los rangos de PV en los animales (alto vs bajo). Por otra parte, en terneros de mayor edad (entre 150 y 180 días), último grupo etario de trabajo, no se observó un comportamiento definido en la ganancia de PV, ya que en ese período se inició el destete y por tanto se suprimió el suministro de leche y concentrado para estos animales.

### Proteína y glucosa sérica

Estos compuestos se determinaron como indicadores generales de la nutrición proteica y energética en los animales experimentales y sus valores (Tabla 2) se encontraron dentro de los considerados como referencia para bovinos en crecimiento<sup>30</sup>. Los valores aparentemente bajos de proteína pudieron estar relacionados con baja asimilación proteica en los animales, lo cual provoca disproteinemia con posiblemente reducción de gamma-globulinas y transferrina<sup>18</sup>. El valor de glucosa sérica encontrado está dentro de intervalo de referencia para bovinos<sup>33</sup>.

### Hormonas

**Ghrelina.** La diferenciación del tracto digestivo, en especial de las cavidades pregástricas en los bovinos, se encuentra estrechamente relacionada con el aumento de PV y la edad<sup>5</sup>. Las dificultades experimentales para determinar el grado y velocidad del crecimiento del rumen ha favorecido la búsqueda de opciones alternativas de estudio, tales como el uso de indicadores indirectos de crecimiento<sup>28</sup>. De los resultados de la

presente investigación se esperaba que la ghrelina fuera útil como un indicador indirecto del desarrollo, ya que algunos trabajos mostraban cambios en los patrones de secreción de esta hormona entre animales jóvenes y adultos<sup>1,6</sup>. En el análisis estadístico de bloques, que consideró animales de bajo y alto peso vivo (Tablas 1 y 3) se hallaron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los terneros más jóvenes (<1 mes) y los demás rangos de edad, encontrando en las dos condiciones (edad y alto peso) la mayor concentración de la hormona, mientras que la más baja la presentaron los terneros de mayor edad (seis meses), pertenecientes al grupo de animales de menor peso.

Se esperaría que los animales más jóvenes presenten mayor nivel sérico de ghrelina, debido a que su capacidad gástrica es menor y por tanto la menor cantidad de alimento consumido requiere una mayor frecuencia de liberación de la hormona; así mismo, el vaciado gástrico es rápida situación que genera liberación de la hormona<sup>13</sup>. En los animales de mayor edad y sobre todo en aquellos de peso más alto, el desarrollo ruminal asociado con el inicio de consumo de materia seca facilita el aumento gradual y frecuente del consumo de forraje y la presencia del alimento en el abomaso, lo cual inhibe la liberación de ghrelina<sup>32</sup>. Esto es debido a que la producción de esta hormona es inversamente proporcional a la cantidad de alimento consumido, toda vez que el 90% de la ghrelina circulante en el organismo se origina en el *fundus gastricus*<sup>12</sup>; siendo los principales lugares de síntesis el estómago y el duodeno<sup>8</sup>.

En la literatura se informan niveles séricos de ghrelina de 47,06 pmol/L para terneros Holstein de seis meses de edad<sup>41</sup>, entre 2,96 y 20,72 pmol/L en terneros Holstein de 3 meses<sup>25</sup>, y de 70 pg/ml para terneros Holstein entre 2 y 46 días de edad<sup>16</sup>.

**Hormona del crecimiento.** Los valores hallados en el presente trabajo son mayores que los informados en 2008 cuando encontraron al destete en terneros Holstein de cinco y 10 semanas de edad concentraciones, promedio de GH de 2,4 y 3,4 ug/L respectivamente<sup>41</sup>. En una investigación en 2008<sup>38</sup>, encontraron en terneros Holstein un rango de GH entre 6 y 32 ug/L, con una media de 17 ug/L.

En el presente experimento no se encontraron diferencias en GH entre Holstein (12,77 ug/L) y las demás razas; pero sí entre Brahman (11,97 ug/L) y Hartón del Valle (14,04 ug/L) ( $p < 0,05$ ). Aunque no se presentaron diferencias en la concentración de la hormona entre rangos de edad ( $p > 0,05$ ), sí se observaron éstas para los grupos de PV, especialmente en el cuarto mes cuando, tanto los animales

de peso alto como de peso bajo presentaron las menores concentraciones séricas de la hormona en relación con los demás rangos de edad.

Los promedios más altos de GH e insulina se observaron en la raza Hartón del Valle así como los más bajos de ghrelina y las menores ganancias de PV, hallazgo que permite asociar una relación directa entre GH e insulina y entre ghrelina y ganancia de PV. La relación entre estas hormonas y el crecimiento también fue evidente en otros trabajos<sup>31,42</sup>, en los cuales relacionan ghrelina e insulina, a través de la incidencia de la primera con el metabolismo de la glucosa. En otros trabajos se muestra la relación entre ghrelina, GH y crecimiento<sup>12,16,25</sup> en determinaciones hormonales en períodos posprandiales, lo que se asocia con la corta vida media de los péptidos.

La presente investigación fue diseñada para conocer la relación entre crecimiento y las principales hormonas relacionadas con el metabolismo energético, por tanto las mediciones realizadas mes a mes, durante los primeros seis meses de vida posiblemente brindan una información general y no reflejan los mecanismos de control homeostático de corto plazo, como sí ocurre en otros trabajos donde se estudió el efecto del alimento, en muestreos asociados a períodos de tiempo estrechamente relacionados con la vida media de las hormonas estudiadas, lo que no permite una evaluación puntual de ellas<sup>43</sup>, ni de su acción fisiológica específica asociada al consumo de alimento<sup>40,41</sup>.

**Insulina.** En mamíferos la insulina se libera bajo la influencia de varios estímulos, entre ellos, la ingesta de glucosa y de proteínas, y su absorción a partir de los alimentos digeridos.

Se encontraron diferencias ( $p < 0,05$ ) en la concentración de insulina sérica entre razas, siendo más baja en la raza Brahman (228,52 pmol/L) y más alta en los terneros Hartón del Valle (392,19 pmol/L). Mediante el bloqueo estadístico para peso (bajo y alto) en ambos grupos de animales se obtuvieron resultados similares en las relaciones entre razas y concentraciones de insulina. La baja insulinemia en Brahmán, comparada con las otras razas en estudio, puede ser resultado del amamantamiento permanente, lo que significa un consumo continuo de alimento con la consecuente hemoconcentración de glucosa en cuyo caso la respuesta fisiológica eleva también la insulinemia. El promedio de insulina más alto en los terneros Hartón del Valle se debió posiblemente, a que el muestreo se realizó poco tiempo después del ordeño, efectuado con ternero al pie, lo que permitió que

la cría consumiera la leche residual al final del ordeño, dejando a estos animales en situación posprandial y por ende con alta concentración sérica de la hormona.

Se sabe que la insulina induce lipogénesis y ésta se relaciona con ganancia de PV; es probable que su concentración sérica en este ensayo, no se relacione directamente con la ganancia de peso, cuya determinación se realizó mediante un único pesaje en un intervalo amplio de tiempo, ya que los mayores niveles circulantes de la hormona se dan en cortos períodos de tiempo y se asocia en condiciones normales al efecto posprandial<sup>10</sup>. En el presente trabajo tanto las determinaciones hormonales como el pesaje se hicieron de forma puntual una sola vez al mes, sin implicar esta medición un seguimiento sobre la dieta, dado que los objetivos eran evaluar la fase de cría, el comportamiento hormonal y el desarrollo gástrico en un sistema de manejo y no estrictamente el suministro de alimento.

El análisis estadístico del efecto edad (período de muestreo) no mostró diferencias ( $P>0,05$ ) entre rangos de edad, sobre el peso (Tabla 1). Esto pudo deberse al sistema de alimentación de los animales experimentales y al tipo de muestreo realizado, este último no diseñado para analizar variaciones específicas entre grupos en períodos cortos asociados a la dieta.

No se encontró correlación entre glucosa e insulina, como se observa en la tabla 5. Se sabe que la insulina controla los niveles de glucosa en el organismo, sin embargo, la homeostasis regula hormonalmente en forma estrecha la glicemia. Debido al control homeostático endocrino la relación directa entre insulina y glucosa no fue evidente; tampoco se observó relación entre los metabolitos glucosa y proteína con la ghrelina y la GH.

**Tabla 5.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las hormonas y los metabolitos analizados en los tres grupos raciales ( $p<0,05$ ).

	<i>Insulina</i>	<i>Ghrelina</i>	<i>GH</i>	<i>Glucosa</i>	<i>Proteína</i>
Insulina	1,00000				
Ghrelina	0,18784	1,00000			
	0,02630				
GH*	0,10095	0,5913	1,00000		
	0,23530	0,4862			
Glucosa	0,21205	0,12088	0,02461	1,00000	
	0,01190	0,1533	0,7720		
Proteína	0,01855	-0,10355	0,15875	0,08079	1,00000
	0,82780	0,2217	0,0601	0,3409	

\*GH= Hormona del crecimiento

El sistema gastrointestinal (TGI) de neonatos bovinos modifica aceleradamente su estructura y adecuación al sustrato alimenticio. Sobre este cambio dinámico actúan factores como el poblamiento bacteriano del rumen, la diferenciación de las cavidades pregástricas y el cambio del abomaso como principal cavidad digestiva, dando paso a la consolidación del rumen como el sitio de fermentación y producción de ácidos grasos libres y proteína bacteriana<sup>5</sup>. Se ha propuesto que el crecimiento y la diferenciación del TGI son influenciados por aspectos evolutivos (genética), profundamente modificados por el manejo de la nutrición y el efecto hormonal sobre la morfofisiología del sistema digestivo<sup>36</sup>. Se sabe que diversas sustancias ejercen profundos efectos sobre la proliferación y diferenciación de los tejidos incluyendo el TGI<sup>36</sup>. Por otra parte, la insulina, la ghrelina y la leptina, los factores de crecimiento epidermal (EGF), los factores insulínicos (IGFs), el factor alfa de necrosis tumoral

(TNF- $\alpha$ ), el factor  $\beta$  transformador del crecimiento (TGF-  $\beta$ ) y el péptido-2 similar al glucagón (GLP-2), participan ampliamente en el crecimiento del TGI, como fue demostrado<sup>45</sup>.

En el presente experimento se esperaba que el muestreo con un amplio intervalo de tiempo permitiera en forma indirecta monitorear modificaciones del TGI, no obstante, la primera gran limitante encontrada fue que como respuesta al consumo de alimento se afectó la homeostasis, ya que los principales cambios para lograr el equilibrio posprandial son de tipo hormonal<sup>44</sup>; de esta forma los resultados de esta investigación sólo dan una idea general de las concentraciones hormonales para las tres razas de bovinos estudiadas en los primeros 6 meses de vida (Tablas 1, 2 y 3). Los resultados de otros trabajos en bovinos de edades similares<sup>19</sup> muestran que las concentraciones de las hormonas son ampliamente

influenciadas por el alimento, en especial la utilización de la leche o concentrado; estos cambios son evidentes tanto para ghrelina, insulina y hormona del crecimiento entre terneros en lactación y destetos<sup>12</sup>.

## Conclusiones

No se encontró correlación entre las variables hormona de crecimiento, ghrelina, insulina, glucosa y proteína, aunque todas biológicamente estén relacionadas con el crecimiento y desarrollo en terneros.

Los promedios obtenidos en la concentración sérica para las hormonas insulina, ghrelina y de crecimiento no mostraron diferencias entre los diferentes rangos de edad (primeros seis meses de vida), pero sí entre las tres razas de bovinos típicos de los sistemas de producción en condiciones de trópico bajo.

Las concentraciones de las hormonas estudiadas se encuentran dentro de los valores de referencia en bovinos, no obstante se debe tener en cuenta el tipo de estudio y la situación de la determinación frente al suministro de alimento (efecto prandial).

## Referencias

1. Anderson L, Jęftinija S, Scanes CG, Stomer MN, Lee JS, *et al.* Physiology of ghrelin and related peptides. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29(1):111-144.
2. Arellanes-Licea, E.; Díaz-Muñoz, M. Ritmicidad biológica de la secreción de Ghrelina, GH e IGF-I, y su regulación por la Alimentación. *Rev Endocrinol Nutr* 2012; 20 (2):74-87.
3. Bradford BJ, Allen MS. Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 2008; 34 (2):196-203.
4. Broglio F, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, *et al.* Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol* 2004; 61(4):503-509.
5. Campos R, Páez P, Enríquez C. Manejo de la cría y nutrición de neonatos bovinos. Editorial Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 2011.
6. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31(1):44-60.
7. Coppo JA. ¿El destete precoz produce estrés en los terneros cruzados cebú? *Rev Electr Vet* 2007; 8(7):1-40.
8. Cummings DE, Shannon MH, Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg* 2003; 138(4):389-396.
9. DiMarco O, Barcelos J, DaCosta E. Crescimento dos tecidos. En: *Crescimento de bovinos de corte*. Brasil. Editorial UFRGS; 2007. p. 59-91.
10. Eyzaguirre F, Codner E. Análogos de insulina. En: *búsqueda del reemplazo fisiológico*. *Rev Med Chil* 2006; 134(2):239-250.
11. Feng J, Gu Z, Wu M, Gwazdauskas FC, Jiang H. Growth hormone stimulation of serum insulin concentration in cattle. Nutritional dependency and potential mechanisms. *Domest Anim Endocrinol* 2009; 37(2):84-92.
12. Fukumori R, Mita T, Sugino T, Hasegawa Y, Kojima M *et al.* Effects of intravenous ghrelin injection on plasma growth hormone, insulin and glucose concentrations in calves at weaning. *Anim Sci J*. 2013; 83(4):310-315
13. Hashizume T, Horiuchia M, Nonakaa S, Kasuyab E, Kojimac M, *et al.* Effects of ghrelin on growth hormone secretion in vivo in ruminants. *Regul Pept* 2005; 126(1 - 2):61-65.
14. Hayashida T, Murakami K, Mogi K, Nishihara M, Nakazato M, *et al.* Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21(1): 17-24.
15. Holdridge L. Ecología basada en zonas de vida. Traducido por Humberto Jiménez Saa. San José, Costa Rica. IICA. 1987.
16. Itoh F, Komatsu T, Yonai M, Sugino T, Kojima M, *et al.* GH secretory responses to ghrelin and GHRH in growing and lactating dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 28(1): 34-45.

17. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. What is the general action of ghrelin for vertebrates? – Comparisons of ghrelin's effects across vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 181:187–191.
18. Kaneko JJ. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. San Diego, CA. Academic Press. 1997.
19. Katoh K, Furukawa G, Kitade K, Katsumata N, Kobayashi Y, et al.. Postprandial changes in plasma GH and insulin concentrations, and responses to stimulation with GH-releasing hormone (GHRH) and GHRP-6 in calves around weaning. *J Endocrinol* 2004.183: 497–505.
20. Komatsu M, Kojima M, Okamura H, Nishio M, Kaneda M, et al. Age-related changes in gene expression of the growth hormone secretagogue and growth hormone-releasing hormone receptors in Holstein-Friesian cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2012; 42:83–93.
21. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402:656-660.
22. Kopchick J, Okada S. Growth hormone receptor antagonists: discovery and potential uses. *Growth horm IGF Res* 2001; 11(Suppl. 1):103-109.
23. Lesmeister KE, Tozer PR, Heinrichs AJ. Development and Analysis of a Rumen Tissue Sampling Procedure. *J Dairy Sci* 2004; 87(5):1336–1344.
24. Lílido N, Ramirez I. Somatotrofina, Somatotropina (STH) u hormona del crecimiento (GH) en animales domésticos. *Rev Mundo Pec* 2007; 3(2): 45-54.
25. Miura H, Tsuchiya N, Sasaki I, Kikuchi M, Kojima M, et al. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci* 2004; 82(5): 1329-1333.
26. Molero E, Morales LM, Fernández V. et al. Insulina, leptina y hormona de crecimiento y su relación con índice de masa corporal e índice de obesidad en adolescentes. *Arch Latinoam Nutr* 2006; 56(1): 29-35.
27. Obispo N, Pares P, Hidalgo C, Palma J, Godoy S. Consumo de forraje y ganancia diaria de peso en bovinos de carne en crecimiento suplementados con fuentes proteicas. *Zootec Trop* 2001; 19(3):423-442.
28. Ocampo ID, Castrillón MI, Campos R, Giraldo L, Gil, J. et al. Evaluación del beta-hidroxibutirato (BHB) como potencial indicador del desarrollo ruminal en bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20 (4):631-632.
29. Olszewski PK, Cedernaes J, Olsson F, Levine AS, Schiöth HB. Analysis of the network of feeding neuroregulators using the Allen Brain Atlas. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32(5):945-956.
30. Páez P, Campos R, Giraldo L. Suplementación y metabolismo del hierro en neonatos bovinos en condiciones de trópico. *Acta Agron* 2013; 62(1):59-65.
31. Reimer M, Paccini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinol* 2003; 144(3):916-921.
32. Rincón JJ. Ghrelina, un péptido modulador del metabolismo energético. *Rev Endocrinol Nutr* 2007; 15(3):138-148.
33. Russell KE, Roussel AJ. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. *Vet Clin Food Anim* 2007; 23(3):403-426.
34. Rotger A. Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Barcelona, 2004. 196p.
35. Statistical Analysis System Institute-SAS. SAS Institute Inc. 9.1.3 SAS User's guide, Statistics, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2007. 208p.
36. Smith SB, Kawachi H, Choi CB, Choi CW, Wu G, et al. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J Anim Sci* 2009; 87(Suppl. 14): 72-82.
37. Soares JB, Leite AF. Ghrelin, desacil grelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. *Peptides* 2008; 29(7):1255-1270.
38. Swali A, Cheng Z, Bourne N, Wathes DC. Metabolic traits affecting growth rates of pre-pubertal calves and their relationship with subsequent survival. *Domest Anim Endocrinol* 2008; 35(3):300-313.

39. Tamayo M. La selección de sementales bovinos en Cuba. 1. Crecimiento y desarrollo corporal y gonadal en futuros sementales Holstein. *Rev Electr Vet.* 2009; 10(12):1-19
40. ThanThan S, Mekaru C, Seki N, Hidaka K, Ueno A, *et al.* Endogenous ghrelin released in response to endothelin stimulates growth hormone secretion in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2010; 38(1): 1-12.
41. ThidarMyint H, Yoshida H, Ito T, Kuwayama H. Dose-dependent response of plasma ghrelin and growth hormone concentrations to bovine ghrelin in Holstein heifers. *J Endocrinol* 2006; 189(3): 655-664.
42. Ukkola O. Ghrelin and insulin metabolism. *Europ J Clin Invest* 2003; 33(3):183-185.
43. Wertz-Lutz AE, Knight TJ, Pritchard RH, Daniel JA, Clapper JA, *et al.* Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence. *J Anim Sci* 2006; 84(12):3285-3300.
44. Wilding JP. Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med* 2002; 18(8): 619-627.
45. Zabielski R, Godlewski MM, Guilloteau P. Control of development of gastrointestinal system in neonates. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(Suppl. 1): 35-54.
46. Zhang JV, Ren PG, Kretchmer OA, Luo CW, Rauch R, *et al.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; 310(5750): 996-999.