FERNANDA ALTIERI FERREIRA

**Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a
qualidade de complexos cumulus oócito e o desenvolvimento de
embriões *In vitro***

São Paulo

2007

FERNANDA ALTIERI FERREIRA

Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade de complexos cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões *In vitro*

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. Mário Binelli

São Paulo

2007

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.1880
FMVZ

Ferreira, Fernanda Altieri

Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade de complexo cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões *In vitro* / Fernanda Altieri Ferreira. -- São Paulo: F. A. Ferreira, 2007.
89 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Binelli.

1. Oócito. 2. Bovinos (fêmeas). 3. Embrião. 4. Uréia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da qualidade de oócitos aspirados *in vivo* de novilhas bovinas alimentadas com nitrogênio não protéico e sua competência durante a produção *in vitro* de embriões", protocolado sob o nº854/2006, utilizando 40 (quarenta) vacas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, 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 em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research "Evaluation of quality and competence of oocytes recovered by ovum pick up from heifers fed with a non-protein nitrogen source", protocol number 854/2006, utilizing 40 (forty) cows, under the responsibility of Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, 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 in the meeting on the 17th of May of 2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Fernanda Altieri

Título: Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade de complexos cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões *In vitro*

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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas sem as quais minha vida e conquistas não teriam sentido.

Aos meus amados pais, Sérgio Luiz e Adelina.

Com seu amor, tenacidade e paciência, nunca me deixaram esmorecer ante as dificuldades.

Deram-me todo apoio e amor que um ser humano precisa.

Encorajam-me a cada segundo de minha vida a ser uma pessoa melhor.

E, sobretudo, feliz.

Às minhas amadas irmãs,

Cecília, um anjo que habita os céus, sei que vela por mim com todo seu amor.

Renata, minha querida companheira, sempre me encorajando e torcendo por mim.

Ao Marcos Roberto, que tanto amo,

Que doou e doa muito de sua força e de seu amor a mim e me ensinou que tudo é possível,

com boa vontade, amor e dedicação ao trabalho realizado

AGRADECIMENTO

*Simples palavras nem sempre expressam a magnitude dos sentimentos.
Porém, tento registrar aqui o que mais se aproxima do meu eterno agradecimento às pessoas e instituições essenciais na minha formação profissional e crescimento pessoal.*

A toda minha família, esteio sem o qual não seria possível eu ter conquistado este sonho. Em especial a meus pais, pela paciência e amor em todos os momentos!

Ao Professor Paulo Henrique Mazza Rodrigues, pela orientação de tantos anos. Paulo receba o apreço, respeito e admiração que lhe tenho. Sob sua orientação, ao longo destes anos de trabalho, aprendi não somente a fazer Ciência, mas também sobre Ética e valores, que para sempre pautarão minha vida. Mestre, muito obrigada por tudo!

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, que me acolheram desde a graduação. Escola querida! Para sempre me orgulharei de ter passado em seus bancos.

Aos Departamentos de Reprodução Animal (VRA) e Nutrição e Produção Animal (VNP), bem como ao corpo funcional, sempre solícito, e ao corpo docente, pelo empenho em propiciarem tão completa formação ao aluno. Em especial, aos funcionários do VNP, pela convivência e amizade de tantos anos e à amiga Harumi, pelo carinho e amizade com que sempre me tratou!

Em especial a dois professores do VRA: Professor Mário Binelli, agradeço a boa vontade, disposição e alegria com que me recebeu como orientada na última etapa, e ao Professor José Antônio Visintin, pelo apoio e confiança em mim, a quem dedico profunda admiração, carinho e reconhecimento por seu trabalho de base na graduação. Obrigada!

Ao Professor Flávio Meirelles e ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), em especial aos Pós-graduandos Marcos, Lígia e Pati, pela disposição em me ajudar a compreender melhor a fascinante Embriologia e ao Moysés e ao Fernando, pela gentileza em colaborar nos resumos internacionais gerados deste trabalho.

Ao Professor João Alberto Negrão, que abriu as portas do Laboratório de Fisiologia (FZEA-USP) para realização das análises plasmáticas e pelas valiosas contribuições ao trabalho e a técnica Sandra Oliveira, pela ajuda na execução das análises.

Aos Professores que figuraram na banca do exame de qualificação, cujas contribuições inestimáveis foram essenciais para a conclusão deste trabalho: Professor Ed Hoffmann Madureira e Professor Francisco Palma Rennó.

À CAPES, pela bolsa de estudos tão necessária para nossa dedicação integral ao trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Grupo Vitrogen, na pessoa da Dra. Yeda Watanabe e do Dr. Márcio Leão Ferraz, que acreditaram em nosso trabalho, nos apoiando e abrindo as portas de sua casa para nós! Ao amigo Laércio (Juca) por possibilitar o encontro entre as partes!

Ao Dr. Ramon Gómez, pela realização das sessões de aspiração folicular com todo o zelo e afinco, pelos debates científicos e pela agradável companhia na república Cravinhense.

Ao Daniel Carlino Joaquim, pela dedicação, capricho e afinco com que conduziu o trabalho de laboratório e pela paciência em sempre responder as minhas dúvidas.

Ao pessoal do Núcleo Biotecnológico: Rogério (Ferreirinha), Rondinele, Seu Jair e Lucila, por toda a ajuda durante o experimento e aos estagiários que por lá passaram, em especial à Michele Bastos e ao Fernando, por toda a dedicação ao experimento.

Aos colegas da sala de Pós-Graduação do VNP, por me acolherem tão bem e pela alegre convivência que tivemos. Em especial ao Flávio Rocha (Flavião), amigo que descobri nesta etapa, pelas nossas discussões filosóficas e pela amizade!

Ao pessoal da casa do VRA, em Pirassununga, pela agradável convivência!

Por fim, um grande e especialíssimo agradecimento a todos os meus queridos e amados amigos, cada um a sua própria maneira, contribuiu com palavras, gestos, abraços, bons pensamentos, ensinamentos e fez de mim uma melhor pessoa, na alegria e na tristeza. Amo todos vocês, vocês estão todos os dias da minha vida comigo, cada um na sua cadeira cativa no meu coração! Toda satisfação gerada neste trabalho, divido com a maior satisfação, com vocês! Obrigada!

RESUMO

FERREIRA, F. A. **Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade de complexos cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões *In vitro***. [Short-term urea feeding affect quality of cumulus oocyte complexes and *In vitro* embryo development]. 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A utilização de uréia na alimentação de fêmeas bovinas pode prejudicar o desempenho reprodutivo destes animais, provavelmente decorrente do aumento do teor de nitrogênio uréico plasmático (NUP). O objetivo deste estudo foi avaliar se alimentação com uréia por curto prazo oferecida a novilhas, e conseqüente aumento de NUP, exerce influência sobre a quantidade, qualidade e competência dos complexos cumulus-oócito (CCO). O experimento teve duração de 62 dias, dividido em oito semanas e dois períodos. Foram utilizadas 40 novilhas mestiças mantidas a pasto, alocadas a dois tratamentos, utilizando-se delineamento “cross-over”: dieta sem uréia (SU): 5 kg (matéria original) de silagem de milho e 1 kg de concentrado/animal/dia ou dieta com uréia (U): 5 kg de silagem de milho e 1 kg de concentrado contendo 75 g de uréia/animal/dia. Os animais selecionados a cada semana receberam as dietas por seis dias, uma única vez ao dia. No sexto dia de oferecimento das dietas, foram realizadas aspiração folicular (OPU) e colheita de sangue, em jejum e 3 horas após a alimentação. Imediatamente após a OPU, foi realizada contagem total de CCO recuperados e classificação dos mesmos em viáveis e inviáveis. Apenas os viáveis foram destinados à produção *In vitro* de embriões. Em relação ao teor de NUP, houve efeito de interação entre tratamento e tempo de colheita ($P=0,04$) e dentro de cada tempo foi observado aumento significativo ($P<0,01$) para os animais do tratamento U. Não foi observado efeito de tratamento em relação ao número total de CCO recuperados por animal (média $\pm$ EPM: SU=9,15 $\pm$ 0,82 vs. U=8,82 $\pm$ 0,95), nem sobre a porcentagem de CCO viáveis sobre total de CCO recuperados por animal (SU=73,61% $\pm$ 2,47 vs. U=70,26% $\pm$ 2,31). A taxa de clivagem obtida no dia 3 após a inseminação *In vitro* (IIV) e as taxas de blastocisto nos dias 6, 7 e 9 após a IIV, não foram influenciadas pelo tratamento. Porém, no 11º pós IIV, houve diminuição ($P=0,04$) da taxa de blastocistos eclodidos para o tratamento U (SU=82,50% $\pm$ 0,05 vs. U=64,33% $\pm$ 0,07). Apesar do aumento do teor de NUP observado nas novilhas do tratamento U, a quantidade, qualidade e competência dos CCO durante as primeiras clivagens até atingirem o estágio de blastocisto *In vitro* não foram influenciadas pelo oferecimento de

75 g de uréia na dieta, durante seis dias. Porém, foi observada redução da taxa de eclosão dos blastocistos das novilhas do tratamento U.

Palavras-chave: Bovinos (fêmeas). Embrião. Oócito. Uréia.

ABSTRACT

FERREIRA, F. A. **Short-term urea feeding affect quality of cumulus oocyte complexes and *In vitro* embryo development.** [Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade de complexos cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões *In vitro*]. 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Urea feeding offered to bovine dams may damage their reproductive performance, probably due to an increase in levels of plasmatic urea nitrogen (PUN). The aim of this study was evaluate if short-term urea feeding of heifers, following high PUN levels, would have an influence on the quantity, quality and competence of cumulus-oocyte complexes (COC). Trial lasted 62 days, divided into eight weeks and two periods. Forty crossbred grazing heifers were allocated to one of two treatments, using a cross-over design: diet without urea (WU): 5 kg (as fed) of corn silage and 1 kg of concentrated/animal/day, or diet with urea (U): 5 kg of corn silage and 1 kg of concentrated with 75 g of urea/animal/day. Heifers selected in each week received these diets once a day, for six days. On the sixth day of diets' offer, ovum pick-up (OPU) and blood sampling at fasting and 3 hours after feeding were carried out. Immediately after OPU, total COC recovered was counted and classified as either viable or unviable. Only viable were destined to *In vitro* embryo production. In relation to PUN level, there was a significant interaction between treatment and sampling time ($P=0.04$) and a significant ($P<0.01$) increase in animals undergoing U treatment for each of the test times. No significant effect was observed relative to either the total number of recovered COC per animal (mean $\pm$ SEM: WU= 9.15 ± 0.82 vs. U= 8.82 ± 0.95), or the viable COC as a percentage of total recovered COC per animal (WU= $73.61\% \pm 2.47$ vs. U= $70.26\% \pm 2.31$). Cleavage ratio assessed on day 3 post *In vitro* insemination (IVI) and blastocyst ratio on days 6, 7 and 9 post IVI were not influenced by treatments. However, there was a significant treatment effect ($P=0.04$) in relation to hatched blastocysts on day 11 after IVI (WU= $83\% \pm 0.05$ vs. U= $64\% \pm 0.07$). Even though higher PUN levels were observed in animals from treatment U, quantity, quality and competence of the COC during first cleavages until reaching the blastocyst stage *In vitro* were not influenced by adding 75 g of urea on the diet offered to heifers, during six days. Nevertheless, a decline in hatched blastocysts rate was observed in heifers of treatment U.

Key words: Bovine (female). Embryo. Oocyte. Urea.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	14
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 INTRODUÇÃO.....	18
2.2 METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RUMINANTES	19
2.3 NITROGÊNIO URÉICO PLASMÁTICO	22
2.4 RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS BOVINAS	24
2.4.1 Proteína bruta na dieta e qualidade oocitária e embrionária.....	25
2.4.2 Proteína bruta na dieta e secreção hormonal	29
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 3: ALIMENTAÇÃO EM CURTO PRAZO COM URÉIA PODE PREJUDICAR ECLOSÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE NOVILHAS	42
Resumo	42
Abstract	44
3 INTRODUÇÃO	46
3.1 OBJETIVO	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.2.1 Animais e instalações	48
3.2.2 Tratamentos e delineamento experimental	50
3.2.3 Colheita de sangue e análises plasmáticas.....	55
3.2.4 Procedimento de aspiração folicular.....	56
3.2.5 Seleção dos oócitos.....	57
3.2.6 Produção <i>In vitro</i> de embriões.....	58
3.2.7 Análises estatísticas	59
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.3.1 Nitrogênio uréico plasmático.....	60
3.3.2 Glicose plasmática.....	63
3.3.3 Creatinina plasmática	65

3.3.4 Quantidade, qualidade e competência dos CCO recuperados	67
3.3.5 Produção <i>In vitro</i> de embriões.....	70
3.4 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 4	84
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho bovino do mundo, contando com aproximadamente 165 milhões de cabeças no ano de 2006. O país foi o maior exportador mundial de carne, tendo sido exportadas 2,1 milhões de toneladas de equivalente-carcaça no ano de 2006 (INSTITUTO FNP, 2007).

Porém, apesar de ocupar papel de destaque no cenário internacional do agronegócio da carne, nota-se que a taxa de desfrute do rebanho ainda é baixa, pois apenas 47,1 milhões de cabeças foram abatidas no ano de 2006, perfazendo taxa de desfrute de 28% (INSTITUTO FNP, 2007). Países como os Estados Unidos desfrutaram 35% de seu rebanho de 96,7 milhões de cabeças em 2006 (USDA, 2006).

Uma das causas possíveis para a baixa taxa de desfrute apresentada é a nutrição inadequada do rebanho brasileiro. Com 80% do rebanho nacional sendo de aptidão para corte e destes, 98% criados em regime extensivo, segundo Morgulis apenas 50% recebem algum tipo suplementação no cocho (informação verbal)¹.

Um aspecto fundamental no estudo da baixa taxa de desfrute é a análise da idade média de abate, que no Brasil é de 3,5 anos. O intervalo parto-concepção possui associação positiva com a idade de abate. A nutrição inadequada de matrizes pode ser responsável por maior intervalo parto-concepção, baixas taxas de concepção e prenhez, aumentando ainda mais o ciclo produtivo, fazendo com que a meta de produzir-se um bezerro/vaca/ano não seja alcançada (RUSCHE et al., 1993).

Um dos fatores chave para determinação do sucesso do par vaca-bezerro é a eficiência reprodutiva. O status nutricional da vaca está relacionado ao intervalo do período de anestro pós-parto e a probabilidade da vaca tornar-se gestante durante a estação de monta (SHORT; ADAMS, 1988).

¹ Informação fornecida por Morgulis em São Paulo, em 2007.

Suplementação protéica parece beneficiar a função reprodutiva de vacas de corte (WILEY et al., 1991). Uma maneira econômica de se incrementar o teor de proteína bruta da dieta é o fornecimento de uréia na suplementação. Porém, a utilização desta foi associada à baixa qualidade de embriões em ovelhas (MCEVOY et al., 1997) e em vacas leiteiras (RHOADS et al., 2006). Primíparas e múltiparas apresentaram baixa taxa de prenhez associada a teor de NUP superior a 19 mg por dL de plasma (BUTLER; CALAMAN; BEAM, 1996).

Contudo, a condição de exposição à uréia parece ser fator preponderante para que efeitos deletérios à reprodução se manifestem. Dieta contendo 2,6% de uréia oferecida a vacas secas não implicou em piora no desenvolvimento folicular e embrionário (GARCIA-BOJALIL et al., 1994). Já em vacas leiteiras doadoras de embriões, a adição de uréia 1,5% na dieta resultou em diminuição nas taxas de produção e qualidade embrionária, porém apenas quando a uréia foi oferecida por curto período, da inseminação até a colheita de embriões (DAWUDA et al., 2002). A adição de 1,5% de uréia a dieta de vacas zebuínas doadoras ou receptoras de embriões não implicou em piora no desempenho reprodutivos destes animais (BARRETO et al., 2003).

Há relatos sobre a fisiopatologia do processo pela qual a uréia poderia prejudicar o desenvolvimento de embriões bovinos, principalmente daqueles produzidos em programas de transferência de embriões em vacas taurinas. Porém, há escassez de trabalhos relatando efeitos sobre oócitos *in vivo*. Observações em novilhas, interessantes doadoras de oócitos em programas de aspiração folicular e produção *In vitro* de embriões, também não são freqüentes.

Desta forma, o objetivo central do presente trabalho foi verificar se, uma vez acrescida à dieta em alta concentração e por curto prazo, a uréia exerce efeito deletério sobre complexos cumulus-oócito recuperados *in vivo* de novilhas. Esta hipótese foi testada por meio do experimento descrito no capítulo 3 do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

BARRETO, A. G.; LOUVANDINI, H.; COSTA, C. P.; MCMANUS, C.; RUMPF, R. Uso da uréia como suplemento protéico na dieta de doadoras e receptoras de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 77-84, 2003.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p. 858-865, 1996.

DAWUDA, P. W.; SCARAMUZZI, R. J.; LEESE, H. J.; HALL, C. J.; PETERS, A. R.; DREW, S. B.; WATHES, D. C. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, n. 8, p. 1443-1455, 2002.

GARCIA-BOJALIL, C. M.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; DROST, M. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2537-2548, 1994.

INSTITUTO FNP. **ANUALPEC- Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP, 2007. 368 p.

MCEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; FINDLAY, P. A.; ROBERTSON, I. S. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 1-2, p. 71-90, 1997.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; GILBERT, R.; TOOLE, R.; BUTLER, W. R. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

RUSCHE, W. C.; COCHRAN, R. C.; CORAH, L. R.; STEVENSON, J. S.; HARMON, D. L.; BRANDT JR., R. T.; MINTON, J. E. Influence of source and amount of dietary protein on performance, blood metabolites, and reproductive function of primiparous beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 557-563, 1993.

SHORT, R. E.; ADAMS, R. C. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 68, n. 1, p. 29-39, 1988.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture- National Agricultural Statistics Service (USDA-NASS). **Red meat production**: federally inspected, commercial, and farm, by type, 2006. Disponível em: <<http://www.nass.usda.gov>>. Acesso em 23 jun 2007.

WILEY, J. S.; PETERSEN, M. K.; ANSOTEGUI, R. P.; BELLOWS, R. A. Production from first-calf beef heifers fed a maintenance or low level of prepartum nutrition and ruminally undegradable or degradable protein postpartum. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 11, p. 4279-429, 1991.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

Em dietas para ruminantes, fontes de nitrogênio não-protéico (NNP) são alternativas interessantes a fontes protéicas naturais, à medida que possuem elevado equivalente protéico e custo reduzido (LÓPEZ, 1984).

A uréia é a fonte de NNP mais utilizada em dietas para ruminantes (CURRIER et al., 2004). Seu emprego pode ser feito tanto em dietas visando o ganho de peso de novilhos na fase de recria (OLIVEIRA et al., 2006) e terminação (DETMANN et al., 2004), quanto para suplementar vacas de cria mantidas a pasto (PEIXOTO et al., 2006) e vacas doadoras de embriões (BARRETO et al., 2003; MIKKOLA et al., 2005).

Contudo, apesar de boa alternativa como complemento à proteína bruta (PB) da dieta, seu uso em determinadas situações foi associado à diminuição das taxas de produção de embriões viáveis em ovelhas (BISHONGA et al., 1994; MCEVOY et al., 1997) e vacas leiteiras (DAWUDA et al., 2002).

A hipótese formulada para explicar tais efeitos é a de que teor excessivo de uréia na dieta, acoplado à falta de carboidratos para produção de proteína microbiana no rúmen, aumenta a concentração de nitrogênio uréico plasmático (NUP). Esta situação poderia ser prejudicial para oócitos, útero e embriões (SINCLAIR et al., 2000).

Desta forma, foram abordados na presente revisão o metabolismo do nitrogênio pelos ruminantes, com ênfase no NUP e suas consequências para o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas.

2.2 METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RUMINANTES

Um dos sistemas nutricionais para ruminantes mais utilizados por nutricionistas no mundo é o proposto pelo National Research Council (NRC, 2001). Baseia-se no conceito de proteína metabolizável, que compreende a mistura de aminoácidos provenientes da digestão da proteína advinda dos microorganismos ruminais (proteína microbiana), proteína não degradada no rúmen advinda da dieta e proteína endógena (SANTOS; GRECO, 2007).

De acordo este sistema (NRC, 2001), pode-se então dividir a proteína bruta (PB) da dieta em duas frações, conforme a suscetibilidade à degradação ruminal: a proteína degradável no rúmen (PDR) e a fração que escapa à ação dos microorganismos ruminais e segue em direção ao intestino delgado, a proteína não-degradável no rúmen (PNDR).

Basicamente, o que difere a suscetibilidade à degradação ruminal é a estrutura terciária e quaternária de cada proteína, uma vez que determinadas estruturas parecem impedir ou dificultar o processo de ligação entre bactéria e proteína. Este processo é o mais importante na determinação da taxa de degradação protéica no rúmen (NRC, 2001).

Assim posto, os ruminantes necessitam de proteína na dieta como fonte de nitrogênio para a produção de proteína microbiana no rúmen (BRODERICK, 1996). Esta é o principal componente da proteína metabolizável na maioria das situações produtivas (SANTOS; GRECO, 2007).

Considerada fração imediatamente solúvel em água ou fração “A” pelo sistema CNCPS (FOX et al., 1992), a uréia também pode fornecer nitrogênio para a produção de proteína microbiana, pois possui o nitrogênio em sua molécula sob a forma de dois grupos amina (LEHNINGER, 1986).

Os ruminantes, por estarem associados simbioticamente com a microbiota ruminal (RUSSELL; RYCHLIK, 2001), dispõem da urease microbiana e, sendo assim, são aptos a aproveitarem a uréia como fonte de nitrogênio para síntese de proteína microbiana. A urease, enzima produzida pela microbiota ruminal, provoca a ruptura das ligações da molécula da uréia juntamente com uma molécula de água, sendo produtos desta reação duas moléculas de amônia (NH_3) e uma molécula de dióxido de carbono (CO_2).

Nos mamíferos, a hidrólise da PNDR é realizada por enzimas proteolíticas produzidas nas células epiteliais do trato gastrointestinal (TGI) e do pâncreas (CHURCH, 1988). Apesar de possuírem a capacidade de digerir grandes moléculas de proteínas e tornarem-nas aptas para a absorção sob a forma de pequenas moléculas de aminoácidos para a síntese protéica, as

células dos mamíferos não são capazes de produzir a enzima urease para hidrólise da uréia (CHURCH, 1988). Dessa maneira, este composto é considerado indisponível como fonte de nitrogênio para animais não-ruminantes.

No sistema retículo-rúmen, a proteína consumida pelos ruminantes pode ser degradada por bactérias e protozoários a peptídeos, aminoácidos livres e finalmente a amônia. A microbiota e a microfauna ruminal valem-se do sistema de alimentação cruzada, ou seja, o produto final da digestão de uma determinada espécie é substrato para outra espécie (RUSSELL, 2002).

Peptídeos e aminoácidos são intermediários na conversão de proteína a amônia (LENG; NOLAN, 1984). Alguns peptídeos podem resistir à fermentação ruminal, passando assim intactos em direção ao abomaso (CHEN et al., 1984). No entanto, o destino mais comum dos mesmos, assim como dos aminoácidos advindos da proteólise bacteriana, é incorporação pelos microorganismos ruminais como proteína ou degradação à amônia (WALLACE, 1996).

No rúmen, a proteólise bacteriana da PDR começa com atividade extracelular da protease para produzir peptídeos, os quais são submetidos à hidrólise posterior dentro da bactéria, que originará aminoácidos como produtos finais (SWENSON; REECE, 1996). Espécies como *Peptostreptococcus anaerobius* e *Megasphaera elsdenii* possuem capacidade de desaminar aminoácidos e peptídeos de cadeia curta (RUSSELL, 2002). Quando a energia é limitante no sistema ou quando a taxa de degradação de peptídeos excede a taxa de assimilação de aminoácidos, o catabolismo de peptídeos leva a excesso de produção de amônia ruminal e baixa retenção microbiana de nitrogênio (WALLACE, 1996).

Algumas bactérias celulolíticas não são capazes de aproveitar aminoácidos e peptídeos e necessitam de amônia e ácidos graxos para produzirem proteína (CUNNIGHAM, 2004). Esta amônia provém da desaminação dos aminoácidos provenientes da digestão protéica, ou seja, estes sofrem a retirada de seu grupo amina e dão origem a amônia, alguns ácidos metabólicos e dióxido de carbono (LENG; NOLAN, 1984; WALLACE; COTTA, 1988). A uréia, fonte de NNP, é hidrolisada pela urease microbiana a amônia, que por sua vez também serve como doadora de nitrogênio para produção de proteína microbiana (BRODERICK, 1996).

Parte da amônia produzida pela desaminação dos aminoácidos dietéticos e NNP degradados no rúmen pode escapar à captura da microbiota, difundir-se pela parede ruminal e ser captada pelo fígado por meio de sua eficiente circulação portal (CUNNIGHAM, 2004).

Tal escape é maior se houver pouca disponibilidade de energia no rúmen para produção de proteína microbiana (RUSSELL et al., 1992). Alguns autores já observaram melhor crescimento e fermentação bacteriana quando as taxas de fermentação de amido e proteína são sincronizadas no rúmen, em dietas chamadas síncronas (NOCEK; RUSSELL, 1988; HOOVER; STOKES, 1991; BRODERICK, 2003). Sinclair et al. (2000), trabalhando com dietas síncronas e assíncronas, reportaram aumento no teor de uréia plasmática em novilhas submetidas à dieta com alto teor de uréia e amido (assíncrona) em comparação à dieta síncrona. A concentração plasmática de propionato também foi maior para a dieta síncrona (SINCLAIR et al., 2000).

A amônia é considerada um composto tóxico, principalmente em virtude da rápida captação da mesma por tecidos cerebrais (BARTLEY et al., 1981). Também pode causar irritação do parênquima pulmonar, edema no órgão, levando a quadro de desidratação em bovinos (KOPCHA, 1987). Kitamura et al. (2002) associaram a ocorrência de tremores a concentrações de amônia em torno de 1,5 mg/dL. Devido à alta toxicidade de amônia, principalmente a tecidos nervosos (LEHNINGER, 1986), há a necessidade de um mecanismo que a torne uma molécula não-tóxica. Tal mecanismo consiste na conversão de amônia a uréia.

Este processo começa nas mitocôndrias dos hepatócitos, pela via de Krebs-Henseleit, com gasto de três moléculas de ATP por molécula de uréia produzida (VISEK, 1979). Segundo Butler (1998), a situação de balanço energético negativo em vacas leiteiras pode ser agravada por este custo adicional de energia no fígado.

A uréia produzida pode ser excretada pelos rins na urina, mas, nos ruminantes, há mecanismos de retorno da mesma ao rúmen como, por exemplo, via saliva ou transferência via epitélio ruminal (CUNNIGHAM, 2004). A concentração de uréia na saliva corresponde de 30 a 60% de sua concentração sanguínea e a transferência através do epitélio ruminal ocorre provavelmente por difusão passiva (NOLAN, 1993).

No caso da uréia ser reciclada ao rúmen, esta é rapidamente convertida em amônia, pois a atividade ureática realizada pelas bactérias habitantes da parede ruminal é intensa (SWENSON; REECE, 1996). Sendo assim, a amônia tem nova chance de ser utilizada na síntese de proteína microbiana. Este processo possibilita que os ruminantes sejam eficientes conservadores de nitrogênio (CUNNIGHAM, 2004).

2.3 NITROGÊNIO URÉICO PLASMÁTICO

Obtida da fermentação de proteínas degradáveis no rúmen e da hidrólise de uréia, advinda da dieta ou reciclada, a amônia ruminal é absorvida pela parede do órgão na sua forma molecular, em maior intensidade quanto maior for o pH ruminal (BARTLEY et al., 1976; SWENSON; REECE, 1996). A partir desta absorção, será conduzida ao fígado, onde é transformada em uréia.

Uma vez circulante, a uréia pode ser facilmente determinada no plasma ou soro dos animais. Através desta determinação, se quantifica o nitrogênio circulante proveniente da uréia, denominado nitrogênio uréico plasmático (NUP).

O NUP fornece informações relevantes. Roseler et al. (1993) afirmaram que o nitrogênio advindo da degradação protéica ruminal é o principal contribuidor para a uréia plasmática. Além de ser a variável mais utilizada em diferentes estudos, pode ser bom indicador da proteína não utilizada pelo animal (STAPLES et al., 1993), da taxa de PB dietária em relação à matéria orgânica fermentável no rúmen (OLTNER; EMANUELSON; WIKTORSSON, 1985) e do metabolismo protéico pós-ruminal (HIGGINBOTHAM; HUBER; WALLENTINE, 1989). É um bom indicativo também da degradabilidade da proteína no rúmen (ROSELER et al., 1993).

Concentrações plasmáticas de uréia, expressas na forma do NUP, podem ser utilizadas para monitorar o consumo de proteína dietética, uma vez que o consumo excessivo de proteína verdadeira ou NNP pode afetar o desempenho reprodutivo do animal, elevar sua exigência energética e aumentar o custo da ração (BRODERICK; CLAYTON, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2004).

Como o NUP tem sido associado negativamente com o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, um dos aspectos estudados foi a concentração mínima do mesmo que seria prejudicial a estes animais.

Butler (1998) sugeriu a concentração de 19 mg/dL como sendo o limiar entre baixa e alta concentração de NUP. Ferguson et al. (1988, 1993) relataram diminuição nas taxas de concepção de rebanhos leiteiros, cujos animais apresentaram teores de NUP superiores a 20 mg/dL. Sinclair, Sinclair e Robinson (2000) afirmaram que, a partir de 19 mg de NUP por dL de sangue, há possibilidade de prejuízo para o desempenho reprodutivo animal, como insuficiência luteal e perdas embrionárias.

Em vacas leiteiras, Butler, Calaman e Beam (1996) associaram teores de NUP superiores a 19 mg/dL com diminuição de 17 pontos percentuais na taxa de prenhez destes animais. Estudando a mesma categoria, McCormick et al. (1999) observaram diminuição de 22 pontos percentuais na taxa de prenhez em animais com teores de 25 mg/dL de NUP em média. No estudo de McCormick et al. (1999) os teores de 20,1 e 18,5 mg/dL de NUP não foram associados com menores taxas de prenhez.

Contudo, não somente estabelecimento de um determinado teor de NUP mínimo prejudicial à reprodução de fêmeas bovinas é relevante, mas também a categoria animal a ser estudada. Garcia-Bojalil et al. (1994) não observaram diferenças na qualidade e quantidade de embriões obtidos de vacas Holandesas superovuladas alimentadas com 12,3 ou 27,4% de PB. Estes animais encontraram-se não-lactantes no experimento e apesar de os animais com alta PB terem apresentado aumento de 117% em relação aos teores de NUP do grupo com baixa PB, não foi possível demonstrar diferenças.

Em relação à primíparas, Rusche et al. (1993) observaram que vacas Angus alimentadas com 12 ou 17% de PB não apresentaram diferenças quanto a taxa de concepção, a despeito de terem apresentado em média teores de NUP de 14,8 e 28,9 mg/dL, respectivamente.

Outro aspecto a ser considerado é a relação entre o teor de uréia no sangue e no fluido folicular, um transudato do plasma sanguíneo (EDWARDS, 1974). Como os oócitos estão imersos no fluido folicular, relações entre os mesmos podem ser observadas. Além desta marcante influência, a composição bioquímica dos fluidos reprodutivos é dinâmica, sendo influenciada pela fase do ciclo estral e pela dieta a qual o animal está submetido (JORDAN et al., 1983; ELROD; BUTLER, 1993). De fato, Iwata et al. (2006) reportaram correlação negativa entre desenvolvimento dos embriões provenientes de oócitos extraídos de folículos com alta concentração de uréia em seu fluido.

Também Hammon, Holyoak e Dhiman (2005) associaram positivamente o NUP e o nitrogênio uréico do fluido folicular (NUFF) de vacas leiteiras separadas, de maneira retrospectiva, entre grupos de alto (≥ 20 mg/dL) e baixo (≤ 20 mg/dL) teor de NUP. O coeficiente de determinação entre o NUP e NUFF foi alto ($R^2 = 0,86$) e houve aumento significativo ($P < 0,01$) do NUFF para vacas de alto NUP.

Apesar de pouco reportada na literatura, associação entre composição do fluido folicular e desenvolvimento dos gametas e embriões originados dos mesmos fornecem informações de grande relevância, pois os processos de maturação, fecundação e

desenvolvimento inicial de embriões são modulados pelo microambiente que os circunda (HAMMON; WANG; HOLYOAK, 2000).

2.4 RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS BOVINAS

A maioria das observações que relacionaram metabolismo do nitrogênio com o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas foi realizada com vacas leiteiras. A relação inversa entre taxa de concepção e produção leiteira ao longo de quatro décadas em rebanhos leiteiros do estado de Nova York foi apresentada por Butler (1998). Lucy (2001) também expressou preocupação com efeitos deletérios na reprodução em vacas leiteiras de alta produção.

Alguns autores atribuíram que o efeito do teor excessivo de PB na dieta de vacas leiteiras poderia ser indireto, pois o principal efeito seria do balanço energético negativo (BEN) apresentado por estes animais nos dois primeiros meses de lactação. Desta forma, o BEN seria agravado devido ao gasto energético adicional de detoxificação de amônia a uréia no fígado (BUTLER, 2000).

Em vacas de corte e leite, não obstante o status energético da vaca ser considerado o principal fator nutricional que influencia o processo reprodutivo (DUNN; MOSS, 1992; BOLAND; LONERGAN; O'CALLAGHAN, 2001), o nitrogênio dietético também tem seu papel neste contexto (SASSER et al., 1988).

Dunn e Moss (1992) reforçam essa idéia, ao recomendarem quantidades ideais de todos os micro e macronutrientes para que se obtenha um desempenho reprodutivo satisfatório em vacas de corte ou leite e que todos os nutrientes têm seu papel para tal, não havendo um ou outro mais relevante.

As causas subjacentes da ineficiência reprodutiva em vacas que apresentam altos teores de NUP ainda não foram bem esclarecidas. Assim, várias propostas para explicar este fenômeno foram formuladas na última década. Butler (1998), em revisão sobre o assunto, assinala que o estabelecimento da prenhez é uma sucessão de eventos ordenados, envolvendo diversos tipos de células agrupadas em diferentes tecidos e que amônia, uréia ou qualquer produto do metabolismo protéico podem atuar em qualquer uma dessas etapas.

Potencial mecanismo do excesso de nitrogênio sobre a reprodução é o efeito tóxico direto da amônia sobre o oócito, enquanto este ainda se encontra no folículo (DAWUDA et al., 2004).

A secreção de hormônios também pode sofrer alterações de acordo com a alimentação a qual o animal está submetido. Baixa concentração de progesterona foi associada com insucesso da gestação (GARCIA-WINDER et al., 1986; TAYLOR; RAJAMAHENDRAN, 1994) e alimentação com alto teor de PB foi associada a alteração no teor deste hormônio (SONDERMAN; LARSON, 1989).

A dieta também pode causar alterações na composição do fluido e no ambiente uterino. É sabido que o sucesso do desenvolvimento embrionário depende do ambiente luminal uterino que o embrião encontra (MCRAE, 1984). A implantação e o desenvolvimento embrionário inicial, bem como a manutenção da gestação são dependentes de comunicação materno-fetal intacta e qualquer alteração com que o embrião deparar-se podem ser decisivas para o insucesso de sua implantação no útero (WOLF et al., 2003).

2.4.1 Proteína bruta na dieta e qualidade oocitária e embrionária

Compostos nitrogenados, como a uréia e a amônia, são substâncias que podem afetar o desenvolvimento embrionário de mamíferos. Tal afirmação baseia-se em estudos *In vitro* e *in vivo*, nos quais a amônia gerada fisiologicamente pelo metabolismo celular e pelo catabolismo protéico foi tóxica a gametas e embriões murinos, ovinos e bovinos em cultura (GARDNER; LANE, 1993; MCEVOY et al., 1997; SINCLAIR et al., 1998).

Segundo Hammon et al. (1997), a maturação oocitária e o desenvolvimento inicial do embrião são modulados pelo micro ambiente que o circunda e este, por sua vez, é influenciado pelo nitrogênio dietético. Hammon, Holyoak e Dhiman (2005) verificaram estreita associação positiva entre NUP e NUFF e sugeriram que altas concentrações de uréia ou amônia nos fluidos reprodutivos (folicular e uterino) podem contribuir para a ineficiência reprodutiva de vacas leiteiras alimentadas com alto NUP. De fato, Iwata et al. (2006) reportaram correlação negativa entre desenvolvimento dos embriões provenientes de oócitos extraídos de folículos com alta concentração de uréia em seu fluido.

Dawuda et al. (2004), entretanto, não observaram nenhuma diferença significativa em relação à ovulação, formação e função do corpo lúteo entre vacas com alto NUP (alimentadas

com excesso de uréia) em relação às vacas controle, corroborando as considerações de Butler (1998), que afirmou que desenvolvimento folicular e ovulação de vacas leiteiras parecem não ser afetados por alimentação rica em PB.

Porém, aumento da concentração de $\text{PGF}_2\alpha$, em resposta ao aumento de uréia no meio foi observado por Gilbert et al. (1996), em ensaio *In vitro* de células endometriais de bovinos. Esses dados corroboraram as observações feitas por Mauer e Beier (1976) e Schrick, Inskeep e Butcher (1993), em cujos trabalhos foram associados positivamente altas concentrações de $\text{PGF}_2\alpha$ e prejuízos no desenvolvimento e viabilidade embrionários.

Estudada em sistemas *In vitro*, a presença de amônia no meio de cultura mostrou causar efeito deletério à fisiologia e bioquímica do embrião (ZANDER; THOMPSON; LANE, 2006). Hammon et al. (1997) estenderam o cultivo embrionário *In vitro* até o dia 12 e obtiveram menor taxa de blastocisto neste dia para os embriões cultivados com alta concentração (352 μM) de amônia no meio.

Já Gardner e Lane, (1993), Lane e Gardner (1994) e Lane e Gardner (2003) afirmaram que a amônia gerada pela desaminação espontânea dos aminoácidos contidos nos meios de cultivo dos embriões causou decréscimo nas taxas de clivagem e no número de blastócitos, assim como aumento de apoptose. Também, a exposição de zigotos e blastocistos murinos à amônia durante todo o período pré-implantação deprimiu taxas de implantação e desenvolvimento fetal, assim como aumentou a incidência de anormalidades fetais (LANE; GARDNER, 1994; LANE; GARDNER, 1995).

Ocon e Hansen (2003) não observaram diminuição na taxa de clivagem em oócitos maturados em meio contendo 0, 5, 7,5 ou 10 mM de uréia, equivalentes a concentração de NUP de 0, 14, 21 e 28 mg/dL. No entanto, houve diminuição na taxa de blastocistos, mas somente nos clivados submetidos à concentração de 7,5 mM. Em relação aos clivados submetidos a 10 mM, não houve diferença significativa, o que foi explicado pelos autores como um mecanismo natural que o embrião desenvolveria como forma de proteção a agressão do meio com uréia (OCON; HANSEN, 2003).

Em contrapartida, Hammon et al. (1999) observaram que altas concentrações de amônia (1400 μM) no meio de maturação dos oócitos bovinos não afetaram o subsequente desenvolvimento embrionário *In vitro*, até o dia 8 pós inseminação. Hammon, Wang e Holyoak (2000) não observaram diferenças significativas entre oócitos bovinos submetidos a diferentes concentrações de amônia no meio de maturação, no que concerne às taxas de clivagem e de blastocisto avaliadas.

Também Zander, Thompson e Lane (2006) não verificaram diferenças significativas nas taxas de desenvolvimento de embriões murinos submetidos a altas concentrações de amônia em diferentes momentos da produção *In vitro* de embriões. Contudo, observaram aumento de apoptose, denotada pela diminuição do número de células totais e da massa celular interna, nos blastocistos que foram expostos durante toda a PIV à alta concentração de amônia.

Dawuda et al. (2002) e Laven et al. (2004), trabalhando com vacas Holandesas lactantes, focaram os efeitos de dietas contendo excesso de uréia sobre a qualidade de embriões recuperados para serem transferidos. Ambos concluíram que há ressalvas do potencial efeito deletério da mesma sobre a qualidade embrionária.

Este possível efeito dar-se-ia dependendo de como e quando a uréia é introduzida na dieta do animal. Dawuda et al. (2002), quando trabalharam com vacas leiteiras em um programa de transferência de embriões (TE), concluíram que, quando a uréia foi introduzida na dieta das vacas à época da inseminação artificial (IA) até a colheita dos embriões, houve efeito deletério sobre a produção e qualidade destes. Porém, quando a mesma foi adicionada à dieta 10 dias antes da IA, não houve efeito sobre as mesmas variáveis.

Laven et al. (2004) corroboraram tais resultados, afirmando que uréia introduzida 10 dias antes da IA não prejudicou o crescimento embrionário, tampouco o desenvolvimento folicular, sugerindo que vacas leiteiras podem adaptar-se a quantidades crescentes de fontes nitrogenadas de rápida degradação ruminal, se estas forem administradas antes da IA.

Tais observações impulsionaram estudos na direção de que o ambiente uterino de vacas submetidas a dietas contendo alto teor de PB sofreria alterações e, assim, poderia ser inóspito ao embrião. De fato, Jordan et al. (1983) já haviam reportado maior concentração de uréia em secreção uterina de vacas alimentadas com 23% de PB do que com 12%. Estes autores também observaram concentrações alteradas de magnésio, potássio e fósforo na mesma secreção.

Rhoads et al. (2004) observaram concentração média de NUP de 22,6 mg/dL em vacas Holandesas e diminuição de 0,2 pontos percentuais no pH uterino seis horas após infusão parenteral de uréia, no 7º dia do ciclo estral. Também Elrod, Van Amburgh e Butler (1993) observaram diminuição no pH uterino em vacas leiteiras no início de lactação, alimentadas com 25% de PB a mais do que a recomendação, a despeito da fonte protéica ser ou não degradável no rúmen.

Ocon e Hansen (2003) adicionaram dimetadiona, um ácido fraco, ao meio de cultivo de embriões a 10, 15 ou 20 mM por oito dias. Verificaram que menos estruturas clivaram

quando submetidas às concentrações de 15 ou 20 mM. Em todos os tratamentos, houve menor taxa de desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto.

Na mesma direção, achado interessante foi o de Elrod e Butler (1993), que reportaram pH de 6,79 no útero de novilhas alimentadas com 21,8% de PB em relação às submetidas a dieta com 15,45% de PB, cujo pH uterino foi de 7,09 no 7º dia do ciclo estral. Neste mesmo estudo, os autores observaram também declínio de 21 pontos percentuais na taxa de concepção de novilhas Holandesas alimentadas com 21,8% de PB na dieta em relação a novilhas do grupo controle.

Em vacas leiteiras, Butler, Calaman e Beam (1996) associaram teores de NUP superiores a 19 mg/dL com diminuição de 17 pontos percentuais na taxa de prenhez destes animais. Estudando a mesma categoria, McCormick et al. (1999) observaram diminuição de 22 pontos percentuais na taxa de prenhez em animais com teores de 25 mg/dL de NUP em média.

No estudo de McCormick et al. (1999), os teores de 20,1 e 18,5 mg/dL de NUP não foram associados com menores taxas de prenhez, confirmando o que Butler (1998) sugerira como sendo o limiar entre baixa e alta concentração de NUP, a concentração de 19 mg/dL. Os achados de Ferguson et al. (1988) e Ferguson et al. (1993), que relataram diminuição nas taxas de concepção de rebanhos leiteiros cujos animais apresentaram teores de NUP superiores a 20 mg/dL, contribuíram para o estabelecimento de tal limiar. Também Sinclair, Sinclair e Robinson (2000) afirmaram que, a partir de 19 mg de NUP por dL de sangue, há possibilidade de prejuízo para o desempenho reprodutivo animal, como insuficiência luteal e perdas embrionárias.

Apesar de algumas mudanças observadas no ambiente uterino que poderiam inviabilizar a implantação do embrião, Laven, Biggadike e Allison (2002) reportaram resultados interessantes ao fornecer pastagem adubada com altos teores de nitrato a vacas leiteiras com cinco semanas de gestação, em média. Os valores de NUP foram maiores para o grupo de alto teor de nitrato em relação ao grupo controle. Não houve, porém, qualquer evidência de que o tratamento alto nitrato tenha influenciado negativamente o desenvolvimento ou causado menor taxa de sobrevivência embrionária. Também Rusche et al. (1993) observaram que vacas primíparas Angus alimentadas com 12 ou 17% de PB não apresentaram diferenças quanto à taxa de concepção, a despeito de terem apresentado em média teores de NUP de 14,8 e 28,9 mg/dL, respectivamente.

Apesar desta conclusão, Laven, Biggadike e Allison (2002), ao contrário de Butler (1998), sugeriram que o impacto do tratamento com alto nitrato na adubação do pasto poderia afetar a ovulação, a fecundação ou a fase inicial do desenvolvimento embrionário,

Em acordo, Rhoads et al. (2006), trabalhando com receptoras e doadoras de embriões submetidas a dietas com 15 ou 21% de PB, observaram efeito de dieta da doadora sobre taxa de prenhez e concluíram que altas concentrações de NUP devem prejudicar a viabilidade embrionária de vacas leiteiras lactantes por meio de efeitos sobre seus oócitos ou sobre seus embriões antes destes serem coletados.

Da mesma maneira, em experimento semelhante ao de Rhoads et al. (2006), Fahey, Boland e O'Callaghan (2001) não observaram em ovelhas efeito de dieta (0 ou 4% de uréia) da doadora ou receptora sobre taxa de prenhez. Em contrapartida, observaram diminuição no número de células totais nos embriões de doadoras alimentadas com uréia em relação aos animais do grupo controle.

2.4.2 Proteína bruta na dieta e secreção hormonal

Na literatura, há relatos sobre o efeito de dietas com alto teor de proteína bruta sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, principalmente em vacas leiteiras.

Os primeiros autores a relatarem esta associação foram Jordan e Swanson (1979), que observaram que vacas Holandesas lactantes alimentadas com 12,7% de PB na dieta apresentaram menor teor de LH circulante do que as alimentadas com 16,3 e 19,3% de PB. As vacas do grupo 12,75% de PB apresentaram menor período de serviço do que os outros dois grupos.

Já Blauwiekel, Kincaid e Reeves (1986) não observaram mudanças quanto ao padrão pulsátil de LH e concentração de receptores para GnRH na hipófise em vacas inteiras e ovariectomizadas alimentadas com 15 ou 25% de PB na dieta. Em acordo, Dawuda et al. (2004) também não observaram mudanças no padrão pulsátil de LH em vacas leiteiras alimentadas ou não com excesso de PDR.

Em relação à progesterona, Sonderman e Larson (1989) observaram menores concentrações deste hormônio em vacas leiteiras alimentadas com 20% de PB em relação às alimentadas com 14% de PB. Em acordo, Jordan e Swanson (1979) observaram, no 14º dia do

ciclo estral, menores teores plasmáticos de progesterona em vacas leiteiras em pico de lactação alimentadas com 19,3% de PB em relação às alimentadas com 12,7% de PB.

Uma vez que a presença de um corpo lúteo funcional que garanta concentrações elevadas deste hormônio é necessária à manutenção da gestação (Binelli, 2000), quaisquer alterações na concentração do mesmo podem ser prejudiciais às taxas de concepção. De fato Mann, Lamming e Fray (1995) constataram maiores concentrações plasmáticas de progesterona em vacas inseminadas e prenhes do que em vacas inseminadas e não-gestantes, 30 dias após a IA.

As concentrações plasmáticas de progesterona aumentam progressivamente nos três primeiros ciclos estrais da vaca no período pós-parto, e esse aumento gradativo pode ser diminuído em virtude do BEN que o animal apresenta nesta fase (VILLA-GODOY et al., 1988; SPICER; TUCKER; ADAMS, 1990).

Essa diminuição pode ser ainda mais notável se o BEN for acentuado em razão do custo energético da detoxificação da amônia que escapa do rúmen, em vacas alimentadas com concentrações altas de PB na dieta, segundo Staples et al. (1993). Butler (1998) concluiu que a redução de progesterona circulante durante o período pós monta ou IA parece ser um provável fator de redução da fertilidade de vacas alimentadas com alta PB na dieta, em relação ao desenvolvimento e sobrevivência embrionária.

Por outro lado, Rusche et al. (1993) não observaram diferenças nas concentrações plasmáticas de progesterona e LH de vacas primíparas de corte alimentadas com 12 ou 16% de PB. Blauwiekel, Kincaid e Reeves (1986) submeteram vacas Holandesas secas a 25% de PB na dieta e também não relataram diferenças nas concentrações plasmáticas de LH e progesterona. Elrod e Butler (1993) também não reportaram diferenças na concentração plasmática de progesterona em novilhas submetidas a 21,8% de PB na dieta em relação ao grupo que recebeu 15,45%, apesar de terem observado pH uterino mais ácido no grupo alimentado com 21,8% de PB.

Também em novilhas, Kane et al. (2004) não observaram diferenças nas concentrações plasmáticas de LH, quando estes animais foram mantidos a pasto e submetidos a três tipos de suplementação protéica (com uréia + baixo teor de PNDR, uréia + médio teor de PNDR e uréia + alto teor de PNDR). Porém, houve maior concentração plasmática de FSH nas novilhas dos tratamentos uréia + baixo e uréia + médio do que nas novilhas do tratamento uréia + alto.

Apesar de alguns autores não encontrarem diferenças nas concentrações plasmáticas das gonadotrofinas, Randel (1990), compilando dados de uma década sobre experimentos

envolvendo nutrição e reprodução de vacas, chegou à conclusão que há menor quantidade de pulsos de LH em vacas alimentadas com dietas deficitárias em energia ou proteína e sugeriu que, em decorrência da liberação de LH ser menor, provavelmente devida à baixa liberação de GnRH no hipotálamo, a gonadotrofina fica estocada na hipófise. Se o animal for desafiado com GnRH exógeno, haverá maior quantidade de gonadotrofina sendo liberada. A questão, segundo Randel (1990), daria-se-ia nas concentrações de gonadotrofinas e GnRH liberado do hipotálamo e não na quantidade de receptores de GnRH (MOSS et al., 1985; NOLAN et al., 1989; KANE et al., 2004).

Analisados coletivamente, os resultados destes estudos apontam para a direção de efeito adverso de dietas com alta proteína sobre o trato reprodutivo, ao invés de agir sobre o eixo hipotálamo-hipófise (DAWUDA et al., 2002), e que a nutrição, a não ser que seja radicalmente mudada, terá pequeno efeito sobre a secreção de gonadotrofinas (BOLAND; LONERGAN; O'CALLAGHAN, 2001).

REFERÊNCIAS

BARRETO, A. G.; LOUVANDINI, H.; COSTA, C. P.; MCMANUS, C.; RUMPF, R. Uso da uréia como suplemento protéico na dieta de doadoras e receptoras de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p.77-84, 2003.

BARTLEY, E. E.; AVERY, T. B.; NAGARAJA, T. G.; WATT, B. R.; DAVIDOVICH, A.; GALITZER, S.; LASSMAN, B. Ammonia toxicity in cattle. V. Ammonia concentration of lymph and portal, carotid and jugular blood after the ingestion of urea. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 494-498, 1981.

BARTLEY, E. E.; DAVIDOVICH, A.; BARR, G. W.; GRISFEL, G. W.; DAYTON, A. D.; DEYOE, C. W.; BECHTLE, R. M. Amonia toxicity in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000. p. 99-114.

BISHONGA, C.; ROBINSON, J. J.; MCEVOY, T. G.; AITKEN, R. P.; FINDLAY, P. A.; ROBERTSON, I. S. The effects of excess rumen degradable protein in ewes on ovulation rate, fertilization and embryo survival in vivo and during in vitro culture. **Animal Production**, v. 58, p. 447-456, 1994.

BLAUWIEKEL, R.; KINCAID, R. L.; REEVES, J. J. Effect of high crude protein on pituitary and ovarian function in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 2, p. 439-446, 1986.

BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1323-1340, 2001.

BRODERICK, G. A. Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. Introduction. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 4S, p. 1324S-1325S, 1996.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1370-1381, 2003.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutrition factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, 1997.

BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 1998.

BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 60-61, p. 449-457, 2000.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p. 858-865, 1996.

CHEN, G.; SNIFFEN, C. J.; RUSSELL, J. B. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: effects of protein quantity, protein solubility and feeding frequency. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 5, p. 983-992, 1987.

CHURCH, D. C. **Basic animal nutrition and feeding**. 3rd ed. New York: Wiley, 1988. 472 p.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579 p.

CURRIER, T. A.; BOHNERT, D. W.; FALCK, S. J.; BARTLE, S. J. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage. I. Effects on cow performance and the efficiency of nitrogen use in wethers. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 5, p. 1508-1517, 2004.

DAWUDA, P. M.; SCARAMUZZI, R. J.; DREW, S. B.; BIGGADIKE, H. J.; LAVEN, R. A.; ALLISON, R.; COLLINS, C. F.; WATHES, D. C. The effect of a diet containing excess quickly degradable nitrogen (QDN) on reproductive and metabolic hormonal profiles of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3, p. 195-208, 2004.

DAWUDA, P. W.; SCARAMUZZI, R. J.; LEESE, H. J.; HALL, C. J.; PETERS, A. R.; DREW, S. B.; WATHES, D. C. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, n. 8, p. 1443-1455, 2002.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; ZERVOUDAKIS, J. T.; CECON, P. R.; VALADARES FILHO, S. C.; GONÇALVES, L. C.; CABRAL, L. S.; MELO, A. J. N. Níveis de proteína

bruta em suplementos múltiplos para terminação em novilhos mestiços em pastejo durante a época seca; desempenho produtivo e características de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 169-180, 2004

DUNN, T. G.; MOSS, G. E. Effects of nutrient deficiencies and excess on reproductive efficiency on livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1580-1593, 1992.

EDWARDS, R. G. Follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 189-219, 1974.

ELROD, C. C.; BUTLER, W. R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 694-701, 1993.

ELROD, C. C.; VAN AMBURH, W. R.; BUTLER, W. R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 702-706, 1993.

FAHEY J.; BOLAND M. P.; O'CALLAGAHAN, D. The effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on early embryo survival and development in recipient ewes. **Animal Science**, v. 72, p. 395-400, 2001.

FERGUSON, J. D.; BLANCHARD, T.; GALLIGAN, D. T.; HOSHALL, D. C.; CHALUPA, W. Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 5, p. 659-661, 1988.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; BLANCHARD, T.; REEVES, M. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3742-3746, 1993.

FOX, D. G.; SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; RUSSELL, J. B.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3578-3596, 1992.

GARCIA-BOJALIL, C. M.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; DROST, M. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2537-2548, 1994.

GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P. E.; DEEVER, D. R.; SMITH, V. G.; LEWIS, G. S.; INSKEEP, E. K. Endocrine profiles associated with lifespan of induced corpora lutea in post partum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1352-1362, 1986.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Amino acids and ammonia regulate mouse embryo development in culture. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2, p. 377-385, 1993.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; RABUFFO, T. S.; CHANDLER, S. K. An *in vitro* model for the study of bovine endometrial physiology and pathophysiology. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 13., 1996, Sydney. **Proceedings...** Sydney: [s.n.], 1996. p. 2.

HAMMON, D. S.; HOLYOAK, G. R.; DHIMAN, T. R. Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 3-4, p. 195-204, 2005.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, R. G. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1, p. 1-8, 2000.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, R. G.; SHEROD-KNIGHT, J.; EVANS, R. C. Effects of high ammonia concentrations during IVM on oocyte maturation and *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 375, 1999.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; LIU, G.; WIEDMEIER, R. D.; HOLYOAK, R. G. Effects of ammonia on *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 321, 1997.

HIGGINBOTHAM, G. E.; HUBER, J. T.; WALLENTINE, M. V.; JOHNSTON, N. P.; ANDRUS, D. Influence of protein percentage and degradability on performance of lactating cows during moderate temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 7, p. 1818-1823, 1989.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, 1991.

IWATA, H.; INOUE, J.; KIMURA, K.; KUGE, T.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 3-4, p. 215-223, 2006.

JORDAN, E. R.; CHAPMAN, T. E.; HOLTAN, D. W.; SWANSON, L. V. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 9, p. 1854-1862, 1983.

JORDAN, E. R.; SWANSON, L. V. Effect of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein and albumin in the high-producing dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 58-63, 1979.

KANE, K. K.; HAWKINS, D. E.; PULSIPHER, G. D.; DENNISTON, D. J.; KREHBIEL, C. R.; THOMAS, M. G.; PETERSEN, M. K.; HALFFORD, D. M.; REMMENG, M. D.; ROBERTS, A. J.; KEISLER, D. H. Effects of increasing levels of undegradable intake protein on metabolic and endocrine factors in estrous cycling beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 1, p. 283-291, 2004.

KITAMURA, S. S. **Intoxicação por amônia em bovinos e ratos: o desempenho renal na intoxicação e o emprego de tratamentos alternativos**. 2002. 117f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

KOPCHA, M. Nutritional and metabolic diseases involving the nervous system. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 3, p. 119-135, 1987.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression, and subsequently alters fetal development in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1109-1117, 2003.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 102, n. 2, p. 305-312, 1994.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by in situ enzymatic conversion to glutamate. **Journal of Experimental Zoology part A: Comparative Experimental Biology**, v. 271, n. 5, p. 356-363, 1995.

LAVEN, R. A.; BIGGADIKE, H. J.; ALLISON, R. D. The effect of pasture nitrate concentration and concentrate intake after turnout on embryo growth and viability in the lactating dairy cow. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, n. 2, p. 111-115, 2002.

LAVEN, R. A.; DAWUDA, P. W.; SCARAMUZZI, R. J.; WATHES, D. C.; BIGGADIKE, H. J.; PETERS, A. R. The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1, p. 41-52, 2004.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 1.ed. São Paulo: Sarvier, 1986. 725 p.

LENG, R. A.; NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p. 1072-1089, 1984.

LÓPEZ, J. Uréia em rações para produção de leite. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 2, 1984, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1984. p. 200-225.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; FRAY, M. D. Plasma oestradiol during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 2, p. 121-131, 1995.

MAUER, R. R.; BEIER, H. M. Uterine proteins and development *in vitro* of rabbit preimplantation embryos. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 48, n. 1, p. 33-41, 1976.

MCCORMICK, M. E.; FRENCH, D. D.; BROWN, T. F.; CUOMO, G. J.; CHAPA, A. M.; FERNANDEZ, J. M.; BEATTY, J. F.; BLOUIN, D. C. Crude protein and rumen undegradable protein effects on reproduction and lactation performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2697-2708, 1999.

MCEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; FINDLAY, P. A.; ROBERTSON, I. S. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 1-2, p. 71-90, 1997.

MCRAE, A. C. The blood-uterine lumen barrier and its possible significance in early embryo development. **Oxford Reviews of Reproduction Biology**, v. 6, p. 129-173, 1984.

MIKKOLA, M.; MANTYSAARI, P.; YAMMIRANTA, N.; PEIPPO, J.; TAPONEN, J. Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3-4, p. 193-202, 2005.

MOSS, G. E.; PARFET, J. R.; MARVIN, C. A.; ALLRICH, R. D.; DIEKMAN, M. A. Pituitary concentrations of gonadotropins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 1, p. 285-293, 1985.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academies Press, 2001. 381 p.

NOCEK, J.; RUSSELL, J. B. Protein and carbohydrate as an integrated system. Relationship of ruminal availability to microbial contribution and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2070-2107, 1988.

NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 2, p. 227-246, 1993.

NOLAN, C. J.; BULL, R. C.; SASSER, R. G.; RUDER, C. A.; PANLASIGUI, P. M.; SCHOENEMANN, H. M.; REEVES, J. J. Postpartum reproduction in protein restricted beef cows: effect on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. **Journal of Animal Science** v. 66, n. 12, p. 3208-3217, 1989.

OCON, O. M.; HANSEN, P. J. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic ph. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1194-1200, 2003.

OLIVEIRA, E. R.; PAIVA, P. C. A.; BABILÔNIA, J. L.; MORON, I. R.; CARDOSO, R. C.; OLIVEIRA, J. A. Desempenho de novilhos suplementados com sal mineral protéico e energético em pastagem no período da seca. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 28, n. 3, p. 323-329, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. C.; PIRES, A. V.; FERNANDES, J. J. R.; SUSIN, I.; SANTOS, F. A. P.; ARAÚJO, R. C. Substituição total do farelo de soja por uréia ou amiréia, em dietas com alto teor de concentrado, sobre a amônia ruminal, os parâmetros sanguíneos e o metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 738-748, 2004.

OLTNER, R.; EMANUELSON, M.; WIKTORSSON, H. Urea concentration in milk in relation to milk yield, live weight, lactation numbers, and amount and composition of feed given to dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 12, n. 1, p. 47-57, 1985.

PEIXOTO, L. A. O.; BRONDANI, I. L.; NORNBERG, J. L.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; PAZINI, M.; CORADINI, M. T.; SANTOS, C. V. M. Perfil metabólico e taxas de concepção de vacas de corte mantidas em pastagem natural ou suplementadas com farelo de trigo com ou sem uréia. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1873-1877, 2006.

RANDEL, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 853-862, 1990.

RHOADS, M. L.; GILBERT, R. O.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2896-2901, 2004.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; GILBERT, R. .; TOOLE, R.; BUTLER, W. R. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

ROSELER, D. K.; FERGUSON, J. D.; SNIFFEN, C. J.; HERREMA, J. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. **Journal of Dairy Science** v. 76, n. 2, p. 525-534, 1993.

RUSCHE, W. C.; COCHRAN, R. C.; CORAH, L. R.; STEVENSON, J. S.; HARMON, D. L.; BRANDT JR., R. T.; MINTON, J. E. Influence of source and amount of dietary protein on performance, blood metabolites, and reproductive function of primiparous beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 557-563, 1993.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: [s.n], 2002. 119 p.

RUSSELL J. B.; O'CONNOR J. D.; FOX D. G.; VAN SOEST P. J.; SNIFFEN C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3351-3361, 1992.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001.

SANTOS, F. A. P.; GRECO, L. F. Digestão pós-ruminal de proteínas e exigências de aminoácidos para ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 1., 2007, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: [s.n], 2007. p. 122-159.

SASSER, R. G.; WILLIAMS, R. C.; BULL, C. A.; RUDER, C. A.; FALK, D. G. Postpartum reproductive performance in crude protein-restricted beef cows: return to estrus and conception. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 12, p. 3033-3039, 1988.

SCHRICK, F. N.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 3, p. 617-621, 1993.

SINCLAIR, K. D.; KURAN, M.; GEBBIE, F. E.; WEBB, R.; MCEVOY, T. G. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets different in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2670-2680, 2000.

SINCLAIR, K. D.; MCEVOY, T. G.; CAROLAN, C.; MAXFIELD, E. K.; MALTIN, C. A.; YOUNG, L. E.; WILMUT, I.; ROBINSON, J. J.; BROADBENT, P. J. Conceptus growth and development following the culture of ovine embryos in media supplemented with sera. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 218, 1998.

SINCLAIR, K. D.; SINCLAIR, L. A.; ROBINSON, J. J. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptive changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2659-2669, 2000.

SONDERMAN, J. P.; LARSON, L. L. Effect of dietary protein and exogenous gonadotropin-releasing hormone on circulating progesterone concentrations and performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 8, p. 2179-2183, 1989.

SPICER, L. J.; TUCKER, W. B.; ADAMS, G. D. Insulin-like growth factor-1 in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 929-937, 1990.

STAPLES, C. R.; GARCIA-BOJALIL, C. M.; OLDICK, B. S.; THATCHER, W. W.; RISCO, C. A. Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggested mechanism, and blood and milk urea measurements. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 4., 1993, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 1993.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p. 281-285, 1994.

VILLA-GODOY, A.; HUGHES, T. L.; EMERY, R. S.; CHAPIN, L. T.; FOGWELL, R. L. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 4, p. 1063-1072, 1988.

WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.

WALLACE, R. J. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1326S-1334S, 1996.

WALLACE, R. J.; COTTA, M. A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 217-250.

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPIANIER, R.; FROLICH, T.; HERRIER, A.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine- strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 276-289, 2003.

ZANDER, D. L.; THOMPSON, J. G.; LANE, M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 2, p. 288-294, 2006.

CAPÍTULO 3: ALIMENTAÇÃO EM CURTO PRAZO COM URÉIA PODE PREJUDICAR ECLOSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE NOVILHAS

Resumo

Foi verificado se alimentação com uréia oferecida por curto prazo a novilhas influencia a quantidade, qualidade e competência de seus complexos cumulus-oócito (CCO). Quarenta novilhas mestiças (280 ± 31 kg) foram alocadas em delineamento “cross-over” a um dos dois tratamentos: SEM URÉIA- SU (dieta basal) e COM URÉIA- U (dieta basal com 75 g de uréia/cabeça). A dieta basal consistiu em 5 kg de silagem de milho e 1 kg de concentrado diários/animal. Semanalmente, cinco animais foram alocados a cada tratamento. Foram mantidos a pasto e por seis dias receberam a respectiva dieta sem prévia adaptação. No sexto dia de oferecimento dos tratamentos, foram realizadas a aspiração folicular (OPU) e colheitas de sangue antes da alimentação e 3 horas após esta, para determinação dos teores plasmáticos de nitrogênio uréico, glicose e creatinina. Após a OPU, foram realizadas contagem total de CCO recuperados e classificação em grau I (excelente), grau II (bom), grau III (regular) e grau IV (inviável). Apenas os CCO grau I, II e III foram destinados à produção *In vitro* de embriões. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para as variáveis de CCO e embriões e ANOVA para medidas repetidas no tempo para as variáveis plasmáticas. Em relação ao NUP, houve interação entre tratamento e tempo de colheita ($P=0,04$) e aumento do teor ($P<0,01$) para os animais do tratamento U. Em relação à glicose, houve interação entre tratamento e tempo de colheita ($P<0,01$) e aumento do teor ($P<0,01$) para o tratamento U apenas às 3h. Não houve efeito de tratamento sobre o teor de creatinina. Não houve efeito de tratamento no tocante à quantidade e qualidade de CCO. Em relação às taxas de clivagem e blastocisto, não foi observado efeito de tratamento até o dia 9 após a inseminação *In vitro* (IIV). Porém, no 11º pós IIV houve diminuição ($P=0,04$) da taxa de blastocistos eclodidos para os animais do tratamento U (média $\pm$ EPM: SU=82,50% $\pm$ 0,05 vs. U=64,33% $\pm$ 0,07). A quantidade e qualidade dos CCO e taxa de produção de embriões de novilhas não foram influenciadas pelo tratamento com uréia sem prévia adaptação. Porém, houve redução da taxa de eclosão de blastocistos dos animais de elevado teor de NUP.

Palavras-chave: Complexo cumulus-oócito. Nitrogênio uréico plasmático. Novilhas. Produção *In vitro* de embriões. Uréia.

SHORT TERM UREA FEEDING OF HEIFERS MAY DAMAGE *IN VITRO* EMBRYO HATCHING

Abstract

It was verified if short term urea feeding would have an influence on the quantity, quality and competence of cumulus oocyte complexes (COC). Forty bovine crossbred heifers (280 ± 31 kg) were allocated following a cross-over design to one of two treatments: WITHOUT UREA- WU (basal diet) or WITH UREA-U (basal diet with 75 g of urea/animal). Basal diet consisted in 5 kg of corn silage and 1 kg of concentrate/animal/day). Every week, five animals were allocated to one of two treatments. Animals were kept on pasture and for six days received their respective diet without any adaptation period. On the sixth day of treatments' offer, ovum pick-up (OPU) was carried out and blood was sampled in fasting and 3 hours post-feeding in order to determine plasmatic levels of urea nitrogen, glucose and creatinine. After OPU, a count of total recovered COC per animal was carried out as well as classification as grade I (excellent), grade II (good), grade III (poor) and grade IV (very poor). Only COC grades I, II and III were used for *In vitro* embryo production. The ANOVA test was used to analyze COC data and repeated-measures ANOVA to analyze plasmatic data. With regard to PUN levels, there was an interaction between time of sampling and treatment ($P=0.04$) and an increase in levels ($P<0.01$) in heifers under treatment U. With regard to plasmatic glucose, there was an interaction between treatment and time of sampling ($P<0.01$) and an increase in levels ($P<0.01$) in heifers undergoing U treatment at the 3 hour time. No effect as a result of the treatment was observed regarding to creatinine. No treatment effect was observed regarding to quantity and quality of COC. In relation to cleavage and blastocyst rates, no treatment effect was observed until day 9 post *In vitro* insemination (IVI). However, on day 11 after IVI there was a decline ($P=0.04$) in hatched blastocyst rate in heifers undergoing U treatment (mean $\pm$ EPM: WU = $83.50\% \pm 0.05$ vs. U = $64.33\% \pm 0.07$). The total quantity and quality of COC and rates of embryo production were not influenced by short term urea feeding of heifers. However, there was a decline in hatched blastocyst ratio in animals with high PUN levels.

Keywords: Cumulus-oocyte complex. Heifers. *In vitro* embryo production. Plasmatic urea nitrogen. Urea.

3 INTRODUÇÃO

Dietas com alto teor de proteína bruta (PB) já foram associadas a alterações no desempenho reprodutivo de vacas lactantes (JORDAN; SWANSON, 1979; SONDERMAN; LARSON, 1989) e de ovelhas (BISHONGA et al., 1996; MCEVOY et al., 1997).

Uma das hipóteses geradas para explicar tal associação é de que o excesso de proteína degradável no rúmen (PDR) ou de nitrogênio não-protéico na dieta provoca aumento dos compostos nitrogenados, como a uréia e amônia plasmáticas (CUNNIGHAM, 2004), substâncias que podem atingir órgãos como útero e ovários.

De fato, Elrod e Butler (1993) reportaram aumento de 28% no nitrogênio advindo da uréia plasmática (NUP) de novilhas alimentadas com 21,8% de PB, sendo 82,5% desta degradável no rúmen (PDR), em relação a novilhas alimentadas com 15,4% de PB e 73% de PDR. Diminuição de 0,3 pontos percentuais no pH uterino foi associada com aumento de NUP neste estudo. Também Rhoads et al. (2004) verificaram aumento de NUP e diminuição no pH uterino de vacas lactantes submetidas à administração endovenosa de solução de uréia

Efeitos tóxicos diretos da amônia e uréia sobre o desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos também foram reportados *In vitro* e *in vivo*. Dawuda (2002) observaram diminuição na produção de embriões excelentes de vacas leiteiras submetidas a dietas com alta PB por sete dias (da inseminação até a colheita) em relação aos animais submetidos a um período maior à mesma dieta, sugerindo que os animais tendem a se adaptar a alta quantidade de uréia na dieta (250g/dia).

Rhoads et al. (2006) verificaram que embriões provenientes de doadoras com alto NUP, ao serem transferidos, resultaram em menores taxas da prenhez do que aqueles vindos de doadoras com moderado teor, sugerindo que o efeito deletério do NUP se concentra sobre oócitos ou embriões com menos de seis dias.

Em ensaios *In vitro* foi demonstrado que, quando uréia foi adicionada ao meio de maturação, a taxa de clivagem de embriões bovinos não foi alterada, enquanto que houve diminuição dos blastocistos obtidos no 8º dia após a inseminação (OCON; HANSEN, 2003).

Utilizando concentrações crescentes de amônia no meio de cultivo, Hammon et al. (1997) reportaram significativa diminuição na taxa de blastocisto observada no 12º dia após a fecundação *In vitro* (FIV), mas nenhum efeito sobre taxa de clivagem. Tal diminuição pareceu ser dose-dependente, segundo os autores. Não obstante, Hammon, Wang e Holyoak (2000)

não observaram nenhum efeito deletério na produção *In vitro* de embriões (PIV) quando amônia foi adicionada ao meio de maturação dos complexos cumulus-oócito (CCO).

Outras variáveis plasmáticas, como a glicose, podem estar associadas a aumento dos compostos nitrogenados circulantes. Hiperamonemia foi associada a desarranjos no metabolismo de glicose em bovinos (SPIRES; CLARK, 1979; FERNANDEZ et al., 1988) e hiperisulinemia foi associada a aumento a uréia plasmática (DAWUDA et al., 2002).

Também a creatinina, metabólito da creatina, pode sofrer influência da dieta. Moscardini et al. (1988) observaram maior excreção urinária de creatinina conforme aumento da PB dietética, apesar de Gregory et al. (2004) não relacionarem variações na creatinina sérica à dieta adotada.

A hipótese de que o NUP *per se* causa piora na qualidade oocitária não foi estudada até presente momento em novilhas de corte. Estas podem ser interessantes doadoras de oócitos em um programa de aspiração folicular (OPU) e produção *In vitro* de embriões (PIV), também por apresentarem número maior de oócitos totais recuperados (MERMILLOD et al., 1992; MORENO et al., 1992; RIZOS et al., 2005) e número maior de oócitos de excelente qualidade (RIZOS et al., 2005) em relação a vacas.

Valendo-se desta lacuna na literatura, este estudo foi proposto tendo como objetivo avaliar o efeito direto do aumento da PB e do NUP em novilhas mestiças de corte em relação à quantidade e qualidade de seus complexos cumulus-oócito (CCO) e sua competência em atingirem o estágio de blastocisto *In vitro*.

3.1 OBJETIVO

Foi objetivo deste trabalho testar-se a hipótese de que o fornecimento de dieta com alta quantidade de nitrogênio não-protéico (NNP) fornecida a novilhas mestiças por curto prazo aumenta o teor de NUP destes animais, o que prejudica a quantidade e qualidade dos CCO recuperados por OPU, bem como sua competência em atingir o estágio de blastocisto *In vitro*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais e instalações

O experimento foi realizado entre agosto e outubro de 2005, no Núcleo Biotecnológico de Reprodução Animal S/C Ltda., localizado na Fazenda Santa Virgínia, município de Cravinhos, SP.

Foram utilizadas quarenta novilhas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) de um ano de idade e pesando em média 280 ± 31 kg de peso vivo (PV). Os animais ficaram alojados em piquetes de 1,8 ha (5 animais/piquete) formados por *Brachiaria decumbens* e *Cynodon spp.* Cada piquete foi dotado de comedouro coletivo de 10 m de comprimento, espaço suficiente para que todos os animais tivessem adequado acesso aos alimentos fornecidos, enquanto que o bebedouro e o cocho para oferecimento de mistura mineral foram comuns aos dois piquetes utilizados no experimento. Os animais não selecionados em cada semana (subperíodo) foram mantidos em um piquete com as mesmas condições acima citadas e receberam diariamente silagem de milho (5 kg de matéria original/animal), água e suplemento mineral à vontade.

Por ocasião da época do ano em que foi conduzido o experimento, houve baixa oferta de pastagem. Nessa situação, a suplementação com fontes nitrogenadas torna-se interessante estratégia para que as perdas de peso vivo e condição corporal dos animais sejam minimizadas (DEL CURTO et al., 1990). Na figura 1, podem ser visualizados a condição da pastagem, os animais utilizados no experimento e o comedouro.

Figura 1 – **Painel superior:** animais utilizados no presente experimento e situação do pasto; **painel inferior:** comedouro disponível para cada cinco animais

Antes do experimento ter sido iniciado, os folículos ovarianos de todas as novilhas vinham sendo aspirados há aproximadamente 18 semanas, intervalo em que foram submetidas, em média, a $16 \pm 3,1$ sessões de OPU, com intervalo de $8,2 \pm 1,7$ dias entre as sessões. No presente trabalho, optou-se por continuar a periodicidade da realização da OPU adotada pela propriedade (uma sessão/semana), conforme Chaubal et al. (2006).

Durante o período pré-experimental, não havia registros precisos sobre presença ou ausência de folículos dominantes, corpos lúteos (CL) e anomalias do trato reprodutivo. Durante o período experimental, todos os folículos visíveis no ultra-som (> 2 mm) foram aspirados no momento da OPU e houve o registro da presença ou ausência de CL nos ovários das novilhas.

3.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento contou com dois tratamentos: SEM URÉIA (SU), que consistiu em 5 kg (matéria original) de silagem de milho e 1 kg (matéria original) de concentrado por animal diariamente e COM URÉIA (U), que consistiu nesta mesma dieta, porém acrescida de 75 g uréia por animal diariamente.

Os concentrados utilizados nas dietas foram constituídos de milho moído, farelo de soja, mistura mineral, cloreto de sódio e calcário. A diferença entre os dois foi a adição de 7,5% de uréia pecuária somente na fabricação do concentrado do tratamento U.

A composição bromatológica dos ingredientes que compuseram as dietas foi apresentada na tabela 1. As determinações de matéria seca, PB, extrato etéreo, matéria mineral, cálcio e fósforo foram realizadas segundo AOAC (1985), enquanto que fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina segundo Goering e Van Soest (1970). Proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) e proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) foram determinadas segundo Sniffen et al. (1992).

Tabela 1 – Composição bromatológica dos ingredientes utilizados na preparação das dietas experimentais

	Ingredientes		
	Silagem de milho	Concentrado com uréia	Concentrado sem uréia
Matéria seca (%)	28,49	87,70	87,74
Proteína bruta (% MS ¹)	7,67	53,90	33,38
PIDN ² (% MS)	2,18	4,33	3,81
PIDA ³ (% MS)	1,23	2,29	3,55
Extrato etéreo (% MS)	2,26	2,00	1,96
FDN ⁴ (% MS)	50,61	10,69	10,20
FDA ⁵ (% MS)	31,41	6,30	6,12
Lignina (% MS)	3,52	0,25	0,43
Matéria mineral (% MS)	3,96	12,37	12,55
Cálcio (% MS)	0,12	1,65	1,73
Fósforo (% MS)	0,16	0,96	1,05
NDT ⁶ (% MS)	56,08	71,12	69,69

(1) Porcentagens sobre a matéria seca do alimento. (2) Proteína insolúvel em detergente neutro. (3) Proteína insolúvel em detergente ácido. (4) Fibra em detergente neutro. (5) Fibra em detergente ácido. (6) Nutrientes digestíveis totais, segundo NRC (2001).

As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências para uma manutenção, que para novilhas de corte mestiças, 280 kg e pastejo contínuo foi estimada em 4,84 Mcal/dia, segundo o sistema CNCPS (2003).

Tal estratégia foi adotada pois a maioria dos trabalhos na literatura em que são descritos efeitos do nitrogênio em excesso na dieta sobre o desempenho reprodutivo foram realizados com vacas leiteiras. Estes animais, portanto, foram submetidos a dietas de forma a atender não somente as exigências de manutenção, como também de produção de leite, tornando-se difícil atribuir apenas ao excesso de nitrogênio na dieta algum efeito deletério à reprodução.

Desta forma, no presente trabalho, foi investigada a ação direta de excesso de nitrogênio na dieta, por meio de dieta de manutenção.

A composição e estimativas das dietas experimentais foram descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Descrição das dietas experimentais

Ingredientes (% MS ¹)	Dietas	
	Sem uréia	Com uréia
Silagem de milho	44,16	44,16
Concentrado	27,44	27,44
Milho moído	9,49	7,11
Farelo de soja	15,70	15,70
Mistura mineral	1,65	1,65
Sal branco	0,15	0,15
Calcário	0,45	0,45
Uréia pecuária	0,00	2,38
Forragem ²	28,40	28,40
Composição		
Matéria seca (%)	35,66	35,77
Proteína bruta (% MS)	13,40	19,80
FDA ³ (% MS)	27,98	27,86
FDN ⁴ (% MS)	46,18	45,89
CNF ⁵ (% MS)	15,76	23,75
Extrato etéreo (% MS)	2,20	2,13
Matéria mineral (% MS)	6,41	6,36
Cálcio (% MS)	0,59	0,59
Fósforo (% MS)	0,37	0,36
Estimativas ⁶		
NDT ⁷ (%)	58,84	56,90
ELm ⁸ (Mcal/kg MS)	1,24	1,19
ELg ⁹ (Mcal/kg MS)	0,79	0,76
PDR ¹⁰ (% MS)	7,46	13,77
PNDR ¹¹ (% MS)	5,92	5,79

(1) Porcentagens sobre a matéria seca do alimento. (2) Estimativa de consumo diário de 3 kg de matéria original/animal. (3) Fibra insolúvel em detergente ácido. (4) Fibra insolúvel em detergente neutro. (5) Carboidratos não-fibrosos. (6) Estimadas por NRC-Dairy Cattle, versão 1.0, 2001. (7) Nutrientes digestíveis totais. (8) Energia líquida para manutenção. (9) Energia líquida para ganho (10) Proteína degradável no rúmen. (11) Proteína não-degradável no rúmen.

O experimento durou 62 dias, divididos em dois períodos experimentais. Cada um dos períodos foi dividido em quatro subperíodos e cada subperíodo foi composto por seis dias de oferecimento dos tratamentos. Houve um intervalo de um dia entre um subperíodo e outro e de oito dias entre os dois períodos (Tabela 3).

Tabela 3 – Cronologia do experimento, representada por períodos, semanas datadas com o primeiro dia (começo do oferecimento dos tratamentos) e último dia (OPU e colheita de sangue), grupos de animais e tratamentos

Período ²	Subperíodo ³	Grupos de novilhas ¹							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Tratamentos ⁴							
I	5-10 ago.	SU	U	-	-	-	-	-	-
	12-17 ago.	-	-	SU	U	-	-	-	-
	19-24 ago.	-	-	-	-	SU	U	-	-
	26-31 ago.	-	-	-	-	-	-	SU	U
Intervalo entre períodos									
II	09-14 set.	U	SU	-	-	-	-	-	-
	16-21 set.	-	-	U	SU	-	-	-	-
	23-28 set.	-	-	-	-	U	SU	-	-
	29-04 out.	-	-	-	-	-	-	U	SU

(1) Cada grupo foi constituído por cinco animais. (2) Cada período foi composto por quatro subperíodos. (3) Cada subperíodo contou com seis dias de oferecimento dos tratamentos. (4) SU: Sem uréia; U: Com uréia.

Antes do começo do experimento, foram formados oito grupos de cinco animais cada um para receberem os tratamentos durante o primeiro período. Um dia antes do começo de cada subperíodo experimental, dois grupos designados ao determinado subperíodo foram separados do lote inteiro: cinco novilhas para receberem o tratamento SU e cinco novilhas para receberem o tratamento U. Ao término de cada subperíodo experimental, houve uma pausa de um dia pra o começo de um novo subperíodo, no qual outros dois grupos foram separados para receberem os tratamentos. Ao final do quarto subperíodo, quando as 40 novilhas já haviam sido utilizadas, houve a inversão de tratamentos entre os grupos, de forma que o grupo que havia recebido o tratamento SU no primeiro período recebesse o tratamento U no segundo período e vice-versa, caracterizando um delineamento alternado em sequência balanceada (“Cross-over”).

Desta forma, a unidade experimental (UE) foi a combinação entre animal e período e cada tratamento contou com 40 repetições (40 UE/tratamento), ou seja, 80 UE no total.

É importante salientar que houve um intervalo de tempo adequado (23 dias) entre a reutilização dos animais, para que fossem evitados efeitos cumulativos de tratamentos.

Durante os seis dias de cada subperíodo experimental, foram oferecidos 5 kg de silagem de milho e 1 kg de concentrado por animal, uma única vez ao dia, às 7 h. No sexto dia de oferecimento dos tratamentos, na parte da manhã, foram realizadas as colheitas de sangue

dos animais em dois tempos: antes da alimentação e 3 horas após a mesma, quando normalmente ocorre o pico de liberação de amônia no rúmen (BUTLER, 1998). À tarde, ao redor das 13 h, os animais foram submetidos à OPU. Concomitantemente à OPU, foi feita a seleção dos CCO recuperados (Figura 2).

Figura 2 - Esquema de um subperíodo do presente experimento, desde a distribuição dos animais aos tratamentos e o começo do oferecimento dos tratamentos, até a aspiração folicular (OPU) para produção de embriões *In vitro* e as colheitas de sangue para determinações de variáveis plasmáticas

3.2.3 Colheita de sangue e análises plasmáticas

No sexto e último dia de oferecimento dos tratamentos aos animais, foi feita a colheita de sangue para posterior determinação dos teores de NUP, glicose e creatinina. A colheita foi feita duas vezes na parte da manhã, portanto antes da OPU: ao redor das 6 h, antes dos animais receberem a alimentação, e decorridas três horas do arraçoamento, por volta das 11 h. Cada colheita de cada animal em cada um dos dois tempos foi chamada de subunidade experimental.

As colheitas foram feitas com os animais contidos em brete de segurança, onde se punccionou a veia jugular e obteve-se aproximadamente 9 mL de sangue de cada animal, por colheita. Utilizou-se sistema de colheita a vácuo (Vacuette[®], Greiner-Bio One[®], Americana, Brasil) com tubos descartáveis contendo como anticoagulante a heparina sódica para determinação de uréia e creatinina plasmáticas, e tubos contendo fluoreto de sódio, um sal inibidor da glicólise, para determinação de glicose plasmática. Imediatamente após o término da colheita, o sangue foi processado em centrífuga (Fanem Excelsa Baby[®], Fanem[®], Guarulhos, Brasil) a 1500 rpm por 15 minutos. Uma vez separado da fase sólida, o plasma foi acondicionado em tubos de 1 mL com tampa, identificados e armazenados em congelador a -20°C até o momento da realização das determinações de uréia, glicose e creatinina plasmáticas.

A uréia plasmática foi determinada por método enzimático-colorimétrico, por reação do íon amônio originado pela hidrólise da uréia pela urease e reação do amônio com hipoclorito de sódio formando indofenol (CHANEY; MARBACH, 1962), um composto de cor verde. Foram utilizados kit comercial (Laborlab[®], Guarulhos, Brasil), microplacas para ensaio ELISA com 96 poços de 500 µL de volume e leitor para microplaca de ELISA com filtro de 570 nm de comprimento de onda (Multiskan MS, Labsystems[®]) para leitura das absorbâncias do composto colorido formado no final da reação. Foi feita uma curva padrão de concentrações conhecidas, para que as concentrações desconhecidas das amostras fossem descobertas por interpolação das absorbâncias das mesmas, uma vez que a reação é linear até 250 mg de uréia/dL de plasma (HENRY, 1968). Em seguida, as concentrações de uréia foram multiplicadas pelo fator 0,47 (HALLET; COOK, 1971), produto que deu origem ao teor plasmático do nitrogênio advindo de uréia, o NUP.

A glicose plasmática também foi determinada por método enzimático-colorimétrico, pela oxidação da glicose a peróxido de hidrogênio e reação deste com 4-aminoantipirina e

fenol formando quinoneimina (TRINDER, 1969), um composto de cor rosa. Utilizaram-se kit comercial (Laborlab[®], Guarulhos, Brasil), microplacas para ensaio ELISA com 96 poços de 500 µL de volume e leitor para microplaca de ELISA com filtro de 450 nm de comprimento de onda (Multiskan MS, Labsystems[®]) para leitura das absorbâncias do composto colorido formado no final da reação. As concentrações de glicose nas amostras foram realizadas utilizando-se interpolação na curva padrão, como descrito para a uréia.

A creatinina plasmática foi determinada por método cinético-colorimétrico por reação com picrato em meio alcalino, descrito por Biggs e Cooper (1961), cujo composto final é de cor amarela. Para tal, utilizaram-se kit comercial (Laborlab[®], Guarulhos, Brasil), microplacas para ensaio ELISA com poços de 500 µL de volume e leitor para microplaca de ELISA com filtro de 510 nm de comprimento de onda (Multiskan MS, Labsystems[®]) para leitura das absorbâncias do composto colorido formado no final da reação. As concentrações de creatinina nas amostras foram realizadas utilizando-se interpolação na curva padrão, como descrito para a uréia.

3.2.4 Procedimento de aspiração folicular

O procedimento de OPU foi realizado no sexto dia de oferecimento dos tratamentos, no período da tarde, após as colheitas de sangue realizadas durante a manhã. Durante todo o experimento, este procedimento foi realizado pelo mesmo Médico Veterinário, treinado para a realização da técnica.

Cada novilha foi contida em brete de segurança, onde se realizou o esvaziamento do conteúdo fecal do reto e a higiene da região perineal. Em seguida à higiene, os animais foram anestesiados com 3 mL de cloridrato de lidocaína (20 mg de cloridrato de lidocaína/mL, Lidovet[®], Laboratório Bravet[®], Rio de Janeiro, Brasil), via epidural.

Utilizou-se para a OPU aparelho de ultra-sonografia Aloka[®] SSD 500 (Aloka[®] Co. Ltd., Wallingford, EUA), equipado com monitor e transdutor setorial de 5 MHz inserido no dispositivo-guia (Handle WTA[®] Watanabe Tecnologia Animal, Cravinhos, Brasil), agulha própria para OPU (7 cm de comprimento e 18G), sistema longo de recuperação e bomba de vácuo (Cook[®] Veterinary Products, Bloomington, EUA). O sistema de recuperação consistiu de manguito de silicone inserido dentro de mandril de aço inoxidável, que foi conectado a tubo cônico graduado de plástico de 50 mL, no qual o conteúdo aspirado dos folículos foi

recolhido. Dentro do sistema de recuperação, foi mantido constantemente fluxo de uma solução aquecida a 37°C, preparada com 1% de soro fetal bovino (Nutricell® Nutrientes Celulares, Campinas, Brasil), 0,05% de heparina sódica (Liquemine®, 5.000 UI/mL, Roche®, F. Hoffmann- La Roche® Ltda., Basiléia, Suíça) e 1% de antibiótico em 1 L de fosfato salino tamponado (PBS, DMPBS Flush®, Nutricell® Nutrientes Celulares, Campinas, Brasil).

Após a higiene e anestesia, o dispositivo-guia foi introduzido na vagina do animal e os ovários localizados. Foram aspirados todos os folículos visíveis (≥ 2 mm) no monitor do ultrassom dos dois ovários da cada novilha. A pressão de aspiração utilizada foi de 78 mmHG (em torno de 12 mL de água/minuto) e o conteúdo recuperado foi encaminhado ao laboratório em tubo graduado de 50 mL contendo a solução de PBS descrita acima, em temperatura entre 36 e 37°C, para rastreamento e seleção dos CCO.

3.2.5 Seleção dos oócitos

Após o procedimento da OPU, os CCO recuperados das novilhas foram encaminhados à seleção, feita durante todo o experimento pelo mesmo laboratorista. O conteúdo recuperado foi esvaziado em filtro de colheita de embriões (WTA® Watanabe Tecnologia Animal, Cravinhos, Brasil) e lavado com PBS aquecido, até que não houvesse mais traços de sangue e debris celulares. Após a lavagem e filtragem do conteúdo recuperado, passou-se o conteúdo retido no filtro para uma placa de Petri estéril de 60 mm de diâmetro para rastreamento dos CCO. A placa foi colocada sob lupa (Coleman®), onde foi contado o número total de CCO por animal. Na mesma ocasião, os CCO foram classificados segundo Stojkovic et al. (2001) em grau I (excelente: CCO com citoplasma homogêneo e com várias camadas compactas de células cumulus), grau II (bom: CCO com citoplasma homogêneo contendo apenas pequenas áreas de pigmentação irregular e camadas de células do cumulus compactas em menor quantidade do que o grau I) e grau III (regular: CCO com citoplasma heterogêneo, poucas camadas de células do cumulus e pequenas áreas da zona pelúcida desnudas). Os CCO com classificação de grau I até grau III foram considerados viáveis para a PIV. Os CCO classificados como expandidos, degenerados e atrésicos foram considerados grau IV e inviáveis para a PIV. Na figura 3, podem ser observados CCO classificados como descrito acima.

Figura 3 - Classificação de complexos cumulus-oócito (Fonte: STOJKOVIC et al., 2001)

3.2.6 Produção *In vitro* de embriões

Após a seleção, os CCO viáveis foram encaminhados ao laboratório de PIV, em criotubos contendo meio TCM 199 suplementado com tampão Hepes e 10% de soro fetal bovino (SFB), acondicionados em garrafa térmica com água a 37°C, para a etapa seguinte, a maturação *In vitro* (MIV).

Os CCO viáveis foram maturados em microgotas de 100 μ l em meio de maturação TCM 199, contendo sais de Earles, glutamina e NaHCO_3 suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 μg de FSH/mL, 50 μg de LH/mL e 1 μg de estradiol/mL. As microgotas foram cobertas com óleo mineral e em seguida, a placa foi levada à incubadora a 38,5°C, 5% CO_2 em ar e com máxima umidade, durante 22 a 24 horas.

Uma vez maturados, os CCO foram submetidos à fecundação *In vitro* (FIV), em microgotas de 100 μ l de meio TALP suplementado com heparina (10 $\mu\text{g/mL}$), piruvato (22 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$), albumina sérica bovina (BSA) sem ácidos graxos (6mg/mL) e solução de PHE (2 μM de penicilamina, 1 μM de hipotaurina e 0,25 μM de epinefrina). O sêmen utilizado durante todo o experimento foi do mesmo touro, da raça Nelore. As palhetas contendo o sêmen diluído foram descongeladas em banho-maria a 35°C durante 30 segundos e seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90) para obtenção dos espermatozoides móveis, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática final foi de 10^6 células/mL e, após 30 minutos de incubação dos espermatozoides, os CCO foram transferidos para as microgotas (20 CCO/gota), onde

permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 22 horas. O dia em que foi feita a FIV foi considerado dia 0.

Após os processos de MIV e FIV, os zigotos foram separados em grupos e co-cultivados com células da granulosa em meio CR2 suplementado com 5% de SFB e 30 mg BSA/mL (WATANABE et al., 1999). No dia 3, foi avaliada a taxa de clivagem, mesma ocasião em que se realizou a renovação de 50% do meio de cultura (*feeding*). No dia 6, realizou-se o segundo *feeding* e contagem de blastocistos, o que foi feito também no dia 7. No dia 9, foi realizada a contagem de blastocistos totais obtidos e no dia 11, foi feita a contagem de blastocistos eclodidos. A taxa de blastocistos eclodidos foi obtida pela razão entre o número de blastocistos eclodidos no dia 11 e o número de blastocistos totais no dia 9.

3.2.7 Análises estatísticas

As variáveis de OPU e PIV foram analisadas por análise de variância (ANOVA), sendo primeiramente verificadas para cada distribuição as premissas estatísticas de normalidade dos resíduos por teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias por teste de Hartley (SAS 1999). Estabeleceram-se como causas de variação os efeitos de tratamento e de período. Desta forma, o modelo proposto foi: **y= tratamento + período**, no qual “y” foi a variável-resposta estudada. Quando os dados apresentaram distribuição normal, procedeu-se ANOVA como método paramétrico de inferência. Ao contrário, quando se apresentaram distribuídos de maneira não-normal, os dados foram transformados para logaritmo ou raiz. Quando a transformação dos dados normalizou a distribuição dos mesmos, ANOVA foi feita com os dados transformados. Quando a distribuição dos dados não foi normalizada pelas transformações propostas, optou-se pelo teste não-paramétrico de ordem de Wilcoxon (SAS, 1999).

As variáveis plasmáticas foram analisadas como medidas repetidas no tempo (SAS, 1999). O modelo adotado foi: **y= tratamento + período + tempo + tempo*tratamento + tempo*período**, sendo “y” a variável-resposta, “tempo*tratamento” a interação entre tempo e tratamento e “tempo*período” a interação entre tempo e período. Quando houve efeito de interação entre tempo de colheita e tratamento, o efeito de tratamento foi obtido dentro de cada tempo.

Abaixo, na tabela 4, foi apresentada a tabela da ANOVA do modelo proposto. Para as variáveis de OPU e PIV, considerou-se apenas a parte superior da tabela 4, enquanto que para as variáveis plasmáticas, a tabela 4 inteira foi contemplada.

Tabela 4 – Análise de variância do modelo proposto, com causas de variação e graus de liberdade para as variáveis de OPU, PIV e plasmáticas

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Tratamento	1
Período	1
Resíduo A ¹	77
Unidades experimentais	79
Tempo	1
Tempo*Tratamento ²	1
Tempo*Período ³	1
Resíduo B ⁴	77
Subunidades experimentais	159

(1) Resíduo entre unidades experimentais. (2) Interação entre tempo de colheita e tratamento. (3). Interação entre tempo de colheita e período. (4) Resíduo das subunidades experimentais.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Nitrogênio uréico plasmático

Houve interação entre tratamento e tempo de colheita ($P=0,03$) para NUP. Em ambos os tempos de colheita, houve aumento ($P<0,01$) do teor de NUP para o tratamento U.

Na figura 4, foram representadas graficamente as diferenças dos teores entre tratamentos por tempo de colheita.

Figura 4 – Teores plasmáticos de nitrogênio uréico (médias $\pm$ EPM) nos dois tempos de colheita (* efeito de tratamento dentro de cada tempo de colheita; $P < 0,05$)

Esperava-se um aumento no teor de NUP nos animais do tratamento U, principalmente às 3h após alimentação, pois o pico de liberação de amônia no rúmen dá-se de 2 a 3 horas após ingestão da uréia (SINCLAIR; SINCLAIR; ROBINSON, 2000), como observaram McEvoy et al. (1997). Para os animais do tratamento SU, esperava-se que o teor de NUP se mantivesse ao redor do fisiológico, uma vez que as dietas foram formuladas para que a exigência do animal fosse suprida, sem desperdício da proteína fornecida.

No tempo de colheita 0 h, pôde-se observar que os animais submetidos ao tratamento U apresentaram teores superiores de NUP em relação aos do tratamento SU. A colheita deu-se no último dia de oferecimento dos tratamentos e mesmo a uréia sendo considerada uma fonte de rápida degradabilidade ruminal (LAVEN et al., 2004), o que remete a um comportamento com pico de liberação e subsequente diminuição, observou-se que os teores de NUP mantiveram-se altos para os animais do tratamento U, mesmo decorridas 24 horas do último oferecimento.

Isto sugere que o animal não utilizou todo o nitrogênio fornecido na dieta, pois o NUP é bom indicador de proteína não utilizada pelo animal (STAPLES et al., 1993). Às três horas após a alimentação, houve aumento de 11,99% no teor de NUP dos animais do tratamento U. Nos animais do tratamento SU houve aumento de apenas 1,32%, o que está em acordo com

Dawuda et al. (2002), que reportaram aumento nos teores de uréia e amônia plasmática às 3 horas após a alimentação, para vacas lactantes alimentadas com uréia em relação ao grupo sem uréia.

Também Sinclair et al. (2000) observaram aumento dos teores plasmáticos de amônia em novilhas submetidas à dieta assíncrona (alto teor de PDR), independente da fonte de carboidrato (rápida ou lentamente fermentável). Os teores chegaram ao pico às três horas após o arraçãoamento dos animais e caíram a teores basais passadas seis horas do mesmo. Para o grupo que recebeu dieta síncrona, não houve aumento pós-prandial de nenhum dos metabólitos. No presente experimento, em acordo com os achados de Sinclair et al. (2000), também houve aumento pós-prandial do teor de NUP dos animais U, aumento não observado para os animais SU.

Porém, um fato a ser observado é que, em média, não somente os teores de NUP do tratamento U foram altos, mas também do tratamento SU foram maiores dos que os teores considerados fisiológicos por Gregory et al. (2004) para esta categoria animal: 13,21 mg/dL para novilhas de 12 a 24 meses, em média. DiConstanzo, Williams e Keisler (1999) reportaram teores de NUP de 10,8 mg/dL em novilhos Angus alimentados com 4,4 g uréia/dia. Esta observação pode ser atribuída a um excesso de PDR, pois aproximadamente 70% da proteína do milho e do farelo de soja são degradáveis no rúmen (NRC, 2001).

Se o fornecimento de proteína superou a exigência do animal, o alto teor de NUP nos animais U também pode ser atribuído a não utilização de toda proteína sintetizada que, desaminada no fígado, também pode contribuir para aumento no teor de NUP. Não obstante, os teores do tratamento U encontraram-se significativamente superiores aos do tratamento SU e isto corrobora a eficiência do tratamento imposto.

Assim, foi observado aumento dos teores de NUP em ambos os tratamentos e os valores encontraram-se acima de 19 mg/dL, valor considerado para vacas leiteiras como sendo o limiar para problemas de ordem reprodutiva estarem associados (FERGUSON et al., 1993; BUTLER; CALAMAN; BEAM, 1996). Em acordo, Butler, Calaman e Beam (1996) considerariam os animais dos dois grupos deste experimento como candidatos à baixa taxa de concepção, por estarem acima do teor de NUP considerado aceitável (19 mg/dL).

Garcia-Bojalil et al. (1994), no entanto, não observaram nenhum efeito sobre qualidade embrionária em vacas que apresentaram teor de NUP em torno de 21 mg/dL, assim como os estudos já realizados por Howard et al. (1987) e Carroll et al. (1988), que obtiveram taxas semelhantes de prenhez para animais de baixo e alto (>24 mg/dL) NUP. Daí as

especulações de que o NUP agiria em ambiente uterino, implicando assim baixas taxas de prenhez em doadoras, argumento defendido por Elrod e Butler (1993).

O alto teor de NUP pode comprometer a qualidade de oócitos e embriões, afinal o fluido folicular é um transudato do plasma sanguíneo (EDWARDS, 1974) e o nitrogênio uréico do fluido folicular foi considerado bastante associado ($R^2 = 0,86$) ao NUP (HAMMON; WANG; HOLYOAK, 2000). Uma vez que a maturação oocitária e o desenvolvimento inicial do embrião são modulados pelo microambiente que os circunda (HAMMON; WANG; HOLYOAK, 2000), a observação feita poderia influenciar negativamente os oócitos e embriões dos animais de ambos os grupos.

3.3.2 Glicose plasmática

Em relação aos teores de glicose plasmática, houve interação entre tratamento e tempo de colheita ($P < 0,01$). Houve efeito de tratamento apenas no tempo 3 h após a alimentação. Na figura 5, podem ser observados os teores plasmáticos de glicose em função do tempo de colheita.

Figura 5 – Teores plasmáticos de glicose (médias $\pm$ EPM) nos dois tempos de colheita (* efeito de tratamento dentro de cada tempo de colheita; $P < 0,05$)

Era esperado que o teor de glicose plasmática para os animais do tratamento U fosse influenciado pelo aumento do teor de uréia plasmática, pois há relatos de associação entre altos teores plasmáticos de compostos nitrogenados (*e.g.*, amônia) e alteração do metabolismo de glicose em vacas (SPIRES; CLARK, 1979) e em novilhos (FERNANDEZ et al., 1988).

Em ovelhas, Barej, Ostaszewski e Pierzynowski (1987) observaram que, após infusão de cloreto de amônio e subsequente hiperamonemia, houve aumento do efluxo hepático de glicose, provavelmente via gliconeogênese. Já Fernandez et al. (1988) não verificaram diferenças entre efluxo hepático de glicose após infusão de cloreto de amônio em novilhos. A hiperglicemia observada no experimento de Fernandez et al. (1988) pode ter sido secundária à diminuição de liberação de insulina pancreática, e não em decorrência da maior produção de glicose hepática.

A inibição da concentração de insulina em meio com amônia foi observada no trabalho de Feldman e Lebowitz (1971) em células β do pâncreas de hamsters. Em ovelhas, Barej et al. (1974) e Schaller, Harmeyer e Scholz (1975) reportaram que a glicose plasmática aumentou e o efeito hipoglicêmico da insulina foi demasiadamente diminuído após administração intravenosa de cloreto de amônio. Pode ser observada na figura 5 a diminuição dos teores plasmáticos de glicose para o grupo SU após três horas da alimentação e sutil, apesar de não significativo, aumento para o grupo U. A elevada concentração de uréia plasmática pode ter inibido a liberação de insulina, o que pode ter proporcionado aumento da glicemia observada para os animais do tratamento U.

Apesar de alguns resultados ratificarem a teoria da hipoinsulinemia, Barej e Harmeyer (1979) não observaram nenhum efeito sobre o teor deste hormônio após infusão de cloreto de amônio em ovelhas, apesar de pico hiperglicêmico após a administração do mesmo. Fernandez et al. (1990), ao contrário de Barej, Ostaszewski e Pierzynowski (1987), reportaram diminuição do efluxo hepático de glicose ante a hiperamonemia induzida em bezerros e diminuição da resposta pancreática na liberação de insulina ante o estímulo com glicose, assim como Feldman e Lebowitz (1971) observaram em hamsters.

Fazendo uso de radioisótopos, Spires e Clark (1979) e Emmanuel e Edjtehadi (1981) obtiveram altos teores de glicose em vacas e ovelhas, respectivamente, diante de aumento de amônia circulante induzida por uréia. Estes autores especularam que haveria maior concentração circulante de glicose nesta situação porque haveria menor utilização da mesma por tecidos periféricos, e não por aumento de sua produção hepática via gliconeogênese. Estudos *In vitro* demonstraram que aumento dos teores de amônia no meio de cultivo reduziu a produção de glicose a partir do propionato (SPIRES; CLARK, 1979; AIELLO et al., 1985).

Segundo Fernandez et al. (1990), hiperglicemia secundária à hiperamonemia pode ser devida à menor liberação de insulina pelo pâncreas e menor captação de glicose pelos tecidos insulino-dependentes. No caso do presente experimento, houve aumento do teor plasmático de glicose para os animais do tratamento U às três horas após alimentação e estes mesmos animais tiveram maior concentração de NUP, o que corrobora os achados dos estudos citados acima, apesar de não ter sido mensurado o teor de amônia circulante.

No tocante a associação entre glicose, insulina e gametas, em novilhas com baixa condição corporal, submetidas à dieta equivalente a duas vezes sua exigência de manutenção, a quantidade de oócitos maduros após a maturação *In vitro* (MIV) foi maior do que em novilhas com moderada a alta condição corporal alimentadas com a mesma dieta. Animais hiperinsulinêmicos apresentaram menor número de oócitos maturados do que animais com normoinsulinemia (ADAMIAK et al., 2005).

3.3.3 Creatinina plasmática

A distribuição dos dados referentes aos teores plasmáticos de creatinina não respeitou as premissas de normalidade dos resíduos nem de homogeneidade das variâncias. Portanto, realizou-se o teste não-paramétrico de ordem de Wilcoxon (SAS, 1999), o mais recomendado para dois tratamentos nesta situação, para a análise desta variável resposta.

Não foi possível demonstrar diferenças entre os dois tratamentos. Em decorrência da distribuição não-normal das respostas, não foi possível estudar as causas de variação e interação entre as mesmas.

Na figura 6, foram ilustrados os teores plasmáticos de creatinina em cada tempo de colheita.

Figura 6 – Teores plasmáticos de creatinina (médias $\pm$ EPM) nos dois tempos de colheita (*efeito de tratamento dentro de cada tempo de colheita; $P < 0,05$)

A creatinina plasmática é uma substância nitrogenada não protéica, formada a partir do metabolismo muscular da creatina e da fosfocreatina, substâncias formadas no fígado a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina (LEHNINGER, 1986). Gregory et al. (2004) não relacionam alteração dos teores plasmáticos de creatinina a fatores como a dieta a qual o animal é submetido. Coto et al. (1988) não observaram variação na excreção urinária de creatinina em carneiros alimentados com dietas contendo diferentes teores de PB. Em vacas alimentadas com dietas contendo diversos valores de PB, a excreção de creatinina foi constante (SUSMEL et al., 1994). Porém, Vagnoni e Broderick (1997) reportaram aumento na excreção de creatinina à medida que houve inclusão de milho com alta umidade na dieta.

Segundo pode ser observado com os resultados do presente experimento, não houve diferença entre os tratamentos propostos no tocante ao teor plasmático de creatinina, mesmo com o aumento significativo do teor de NUP nos animais do tratamento U. Este fato corrobora a maioria dos estudos, que não relacionam teor de creatinina à dieta, mas somente à excreção endógena de nitrogênio (ØRSKOV; MACLEOD, 1982; RENNO et al., 2000).

3.3.4 Quantidade, qualidade e competência dos CCO recuperados

Os dados referentes à quantidade e qualidade dos CCO recuperados das novilhas, em números absolutos e como porcentagens sobre viáveis e sobre total de CCO recuperados, foram apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Complexos cumulus-oócito (CCO) recuperados por animal em cada tratamento e classificados segundo Stojkovic et al. (2001), com média, erro padrão da média (EPM) e probabilidade estatística para efeito de tratamento (P) pela análise de variância

CCO/animal	Tratamento		Média	EPM	P
	Sem uréia	Com uréia			
Grau I ¹ (n. ^o) ²	0,73	0,64	0,68	0,18	0,98
(% Viáveis) ³	8,47	8,16	8,32	1,56	0,95
(% Recuperados) ⁴	6,60	5,67	6,14	1,17	0,85
Grau II ⁵ (n. ^o)	0,98	0,56	0,77	0,14	0,17
(% Viáveis)	11,77	9,16	10,78	1,57	0,39
(% Recuperados)	9,29	6,65	7,98	1,15	0,21
Grau III ⁶ (n. ^o)	5,33	5,10	5,21	0,40	0,79
(% Viáveis)	79,75	82,08	81,00	2,45	0,54
(% Recuperados)	57,71	57,94	57,82	2,05	0,90
Total viáveis ⁷ (n. ^o)	7,03	6,31	6,67	0,58	0,36
(% Recuperados)	73,61	70,26	71,95	1,69	0,32
Grau IV ⁸ (n. ^o)	2,13	2,51	2,32	0,16	0,37
(% Recuperados)	26,39	29,74	28,05	1,69	0,32
Total recuperados ⁹ (n. ^o)	9,15	8,82	8,99	0,62	0,50

(1) CCO com citoplasma homogêneo e várias camadas compactas de células cumulus. (2) Número absoluto. (3) Porcentagem sobre total de CCO viáveis por animal. (4) Porcentagem sobre o total de CCO recuperados por animal. (5) CCO com pequenas áreas citoplasmáticas de pigmentação irregular e menor número de camadas de células cumulus do que o grau I. (6) CCO com citoplasma heterogêneo e poucas camadas de células do cumulus. (7) Grau I + Grau II + Grau III. (8) Citoplasma heterogeneamente pigmentado e cumulus ausente ou expandido. (9) Grau I + Grau II + Grau III + Grau IV.

Como pode ser observado na tabela 5, não houve efeito significativo de tratamento sobre nenhuma das variáveis-resposta estudadas. O número CCO totais recuperados por animal não foi afetado pela presença de uréia na dieta dos animais (P=0,50), assim como a quantidade de CCO considerados viáveis por animal, expressa tanto em número absoluto (P=0,36) quanto como porcentagem sobre CCO totais recuperados (P=0,32). Em relação à quantidade de CCO classificados como inviáveis, também não foi possível demonstrar

diferenças entre os tratamentos, tanto quando expresso em número absoluto ($P=0,37$) quanto em porcentagem sobre CCO totais recuperados ($P=0,32$).

Neste trabalho, a hipótese de que o excesso de nitrogênio ruminal, gerando alto teor de NUP, afeta a quantidade e qualidade dos CCO coletados foi rejeitada. Não deve ser omitida, no entanto, a limitação da inspeção visual dos CCO. A prova mais fidedigna de boa qualidade de um oócito é se o mesmo é capaz de se desenvolver, estabelecer um estado de prenhez e gerar um produto sadio, como alertam Lonergan et al. (2003).

Testando a competência de CCO coletados de novilhas submetidas à dieta com alta ou moderada PB, Sinclair et al. (2000) obtiveram CCO de folículos médios com menor competência a atingirem o estágio de blastocisto do que CCO provenientes de folículos maiores de doadoras com alto teor de amônia plasmática.

Hammon, Wang e Holyoak (2000) afirmaram que altas concentrações de amônia são negativamente associadas com tamanho do folículo, reiterando a conclusão de Pavlok et al. (1992), que afirmaram que oócitos provenientes de folículos menores são menos competentes que aqueles provenientes de folículos maiores.

Ocon e Hansen (2003), cultivando CCO *In vitro* em meio com concentrações de uréia que mimetizavam teores basal, moderado e alto de NUP, observaram menor taxa de blastocisto nos teores moderado e alto (14 e 21 mg/dL de NUP). Surpreendentemente, os CCO cultivados em meio com alto teor de uréia, correspondente a 28 mg/dL de NUP, apresentaram a melhor taxa de blastocisto obtida.

Uma possível explicação para este fenômeno seria que alto teor de uréia no meio desencadearia um processo de resistência à uréia, por inibir sua entrada na célula e/ou remoção da mesma do citoplasma (OCON; HANSEN, 2003). É sabido que há transporte de uréia via carreadores em células do córtex renal (VERKMAN; DIX; SEIFTER, 1985), mas desconhece-se esta informação aplicada a oócitos e embriões, até o presente momento.

Há muitas evidências de que a origem do oócito é crucial para determinar a habilidade deste em desenvolver-se até o estágio de blastocisto (LONERGAN et al., 2003). Assim, se houver alterações no oócito ainda quando este se encontra dentro do folículo, estas podem ser prejudiciais ao desenvolvimento futuro do oócito a embrião.

Neste contexto, convém ser lembrada a íntima relação entre oócito e fluido folicular. Hammon, Holyoak e Dhiman (2005) associaram positivamente o NUP e o nitrogênio uréico do fluido folicular (NUFF) de vacas leiteiras separadas, de maneira retrospectiva, entre grupos de alto (≥ 20 mg/dL) e baixo (≤ 20 mg/dL) teor de NUP. O coeficiente de determinação entre o NUP e NUFF foi alto ($R^2 = 0,86$) e houve diferença ($P<0,001$) entre vacas de baixo e alto

NUP (17,00 vs. 22,36 mg/dL, respectivamente). Iwata et al. (2006) obtiveram coeficiente de correlação negativo de 0,37 entre NUFF e taxa de blastocisto no dia 8 após a FIV e concluíram que o NUFF pode ser estabelecido como preditor da competência oocitária. Estas observações são de grande relevância, afinal a maturação e fertilização do oócito, assim como o desenvolvimento inicial do embrião são modulados pelo microambiente que os circunda (HAMMON; WANG; HOLYOAK, 2000).

A composição bioquímica dos fluidos reprodutivos (*e.g.*, fluidos folicular e uterino) é dinâmica e sofre variações durante o ciclo estral dos animais e também de acordo com a alimentação dos mesmos (ELROD; BUTLER, 1993; JORDAN et al., 1983). A alimentação com alta quantidade de PB pode alterar o ambiente uterino reduzindo as concentrações de magnésio, potássio e fósforo nas secreções uterinas, segundo Jordan et al. (1983).

O pH uterino também pode sofrer conseqüências ante dietas mal balanceadas. Elrod e Butler (1993) verificaram diminuição de 0,3 unidade percentuais no pH uterino, o que é impediante ao crescimento de embriões murinos *In vitro* (EDWARDS et al., 1998). Na mesma série de experimentos, Elrod, Van Amburgh e Butler (1993) verificaram que o efeito de alta ingestão de PB ateu-se à acidificação do meio uterino e que nenhum outro fluido corpóreo mensurado (saliva, fluido intrauterino, sangue e pH urinário) sofreu alterações com o excesso.

No presente estudo, como o NUP dos animais submetidos ao tratamento U foi 25,67 e 48,70% maior do que os teores correspondentes dos animais do tratamento SU, nos tempos 0 e 3 h. respectivamente, poderia se esperar uma mudança na composição do fluido folicular dos animais pertencentes aos diferentes grupos. Apesar de no presente experimento não ter sido possível a recuperação do fluido folicular, cabe esta informação.

Contudo, há resultados conflitantes na literatura. Garcia-Bojalil et al. (1994) não observaram diferenças no desenvolvimento folicular de vacas secas alimentadas com alto teor de PB na dieta, apesar da diferença significativa entre os teores de NUP dos animais alimentados com alta ou baixa PB. Laven et al. (2004) não observaram diferenças significativas no tocante ao desenvolvimento folicular em vacas leiteiras alimentadas com 250 g de uréia/dia. Apesar da grande quantidade de uréia na dieta dos animais, estes reportaram teores de NUP menores (23,12 mg/dL) do que os obtidos no presente estudo e ressaltaram que o máximo teor de NUP fora obtido no sétimo dia de oferecimento da dieta com uréia.

Este último aspecto citado também é interessante à medida que demonstra que os animais podem adaptar-se a quantidades de uréia na dieta, como sugere Dawuda et al. (2002). Em um primeiro momento, de sete dias segundo Laven et al. (2004), haveria um pico de

NUP. Depois o animal regularia o teor do mesmo através de seus mecanismos fisiológicos como excreção e capacidade de detoxificação hepática.

Quando foram analisados os dados correspondentes aos CCO classificados por qualidade segundo o critério de Stojkovic et al. (2001), também não foi possível demonstrar efeito de tratamento em relação ao número absoluto e nem em relação às porcentagens de CCO grau I, grau II, grau III sobre o total de CCO viáveis. A porcentagem de CCO classificados por qualidade sobre o total de CCO recuperados também não diferiu estatisticamente entre os dois tratamentos.

3.3.5 Produção *In vitro* de embriões

A seguir, na tabela 6, podem ser observados os dados referentes à PIV.

Tabela 6 – Número e taxas de estruturas clivadas no dia 3 após FIV, de blastocistos nos dias 6, 7 e 9 após FIV e de blastocistos eclodidos no dia 11 após FIV, com média, erro padrão da média (EPM) e probabilidade estatística para efeito de tratamento (P) pela análise de variância

		Tratamento		Média	EPM	P
		Sem uréia	Com uréia			
Clivados	Número ¹	4,38	4,10	4,20	0,49	0,77
	% Viáveis ²	57,45	58,83	58,13	2,33	0,73
	% Total ³	42,69	41,84	42,27	1,98	0,83
Blast. d 6	Número	1,90	1,74	1,82	0,26	0,76
	% Viáveis	26,05	21,79	23,95	2,20	0,34
	% Total	19,58	15,65	17,64	1,68	0,24
Blast. d 7	Número	2,45	2,46	2,46	0,35	0,99
	% Viáveis	33,13	34,33	33,73	2,82	0,84
	% Total	24,99	24,01	24,50	2,20	0,81
Blast. d 9	Número	2,58	2,59	2,58	0,36	0,99
	% Viáveis	33,63	36,64	35,11	2,72	0,59
	% Total	25,35	25,45	25,40	2,14	0,99
Blast. Eclod.	Número	2,33	2,31	2,32	0,34	0,97
	% Viáveis	30,18	31,48	30,82	2,52	0,81
	% Total	22,74	22,23	22,49	1,98	0,87
Taxa Eclosão ⁴		82,50	64,33	73,53	0,04	0,04

(1) Total de estruturas contadas, em número absoluto; (2) Número absoluto/CCO classificados viáveis; (3) Número absoluto/Total de CCO recuperados. (4) Razão entre blastocistos eclodidos no dia 11 pós FIV e blastocistos totais no dia 9 pós FIV.

Como pode ser observado na tabela 6, em relação ao número de estruturas obtidas a partir do dia 3 após a inseminação *In vitro* e suas relações com o número de CCO considerados viáveis e total de CCO recuperados, não foi possível observar efeito de tratamento para nenhuma destas variáveis resposta. Houve efeito de tratamento ($P=0,04$) para taxa de blastocistos eclodidos sobre blastocistos totais no dia 9 após a FIV, havendo diminuição de 22,02% na taxa do grupo U em relação ao grupo controle.

Foi objetivo do presente trabalho verificar se há alteração no desenvolvimento embrionário *In vitro*, no tocante à competência em atingir o estágio de blastocisto, decorrente da alimentação de doadoras de oócitos submetidas à alimentação com alta quantidade de nitrogênio não-protéico, feita a curto prazo. O único efeito de tratamento observado foi menor taxa de eclosão dos blastocistos, no 11º após a FIV, sugerindo que, se houver efeito deletério da uréia em excesso no plasma, este se manifesta depois das primeiras clivagens, próximo à implantação uterina.

Em embriões ovinos, McEvoy et al. (1997) observaram que, no 4º dia após a inseminação das ovelhas, a avaliação dos embriões revelou que os embriões coletados de ovelhas alimentadas com 30 g de uréia por dia apresentaram-se retardados em relação aos das ovelhas que receberam 0 ou 15 g de uréia/dia. Após três dias de cultivo, 0% dos embriões coletados das ovelhas do grupo 30 g eram viáveis, contra 70 e 66% dos grupos controle e 15 g, respectivamente (MCEVOY et al., 1997), sugerindo um efeito deletério que se acentua ao longo do desenvolvimento embrionário. Blanchard et al. (1990) observaram mau desenvolvimento e degeneração precoce de embriões provenientes de vacas leiteiras alimentadas com alta quantidade da proteína degradável no rúmen.

Em novilhas, Sinclair et al (2000) reportaram menor taxa de blastocisto derivados de CCO de novilhas alimentadas com dietas geradoras de alto teor de amônia plasmática em relação às submetidas a dieta geradora de baixa amônia no plasma. Butler (1998) compilando uma série de estudos que versaram sobre alimentação com alto teor de PB e qualidade de embriões, concluiu que a influência da dieta depende do estágio fisiológico em que o animal se encontra, sendo as vacas leiteiras mais suscetíveis ao aumento do NUP do que vacas secas ou novilhas, devido ao incremento do balanço energético negativo advindo da detoxificação hepática de amônia a uréia.

Esta explicação não é tida como a principal para explicação do fenômeno, segundo Di Marco et al. (1998) e Sinclair et al. (2000), que sugerem menor utilização da proteína degradável no rúmen e desarranjos no metabolismo intermediário, como diminuição nos teores de insulina pós-prandial em animais com alto teor circulante de amônia. O fato é que

realmente parece haver diferenças quanto ao estágio fisiológico em que o animal se encontra, como no estudo de Garcia-Bojalil et al. (1994), que não observaram efeitos deletérios a embriões provenientes de doadoras não-lactantes, alimentadas com 27,4% de PB, combinação de nitrogênio advindo de fonte protéica (farelo de soja) ou não (uréia).

A estratégia de adição de compostos nitrogenados no meio de cultura de embriões, em diferentes etapas do desenvolvimento, tem auxiliado na elucidação dos achados de diversos estudos. De Wit, Cesar e Kruip (2001), estudando o efeito da adição ou não de uréia à concentração de 6 mM no meio de maturação de CCO, verificaram que nas primeiras 8 horas da MIV houve maiores taxas de condensação da cromatina e rompimento da vesícula germinativa para os CCO que receberam o tratamento com uréia. O rompimento da vesícula germinativa é primeiro evento da maturação nuclear (BERTAGNOLLI et al., 2004), que resulta na etapa da metáfase I. Porém, neste mesmo estudo, a segregação das cromátides e extrusão do corpúsculo polar pareceram ser mais lentas na presença de uréia no meio da MIV, o que resultou em maior porcentagem de oócitos presos em metáfase I ou telófase e uma menor porcentagem de oócitos em metáfase II após 24 horas de maturação, ou seja, há uma aceleração no desenvolvimento em um primeiro momento, mas que não resulta em maior taxa de desenvolvimento. No geral, os autores perceberam grandes diferenças quanto ao progresso nuclear dos CCO maturados na presença ou na ausência de uréia no meio MIV (DE WIT; CESAR; KRUIP, 2001).

Pela suposição de Kubiak et al. (1992), tida como plausível para De Wit, Cesar e Kruip (2001), a uréia inibiria a polimerização da tubulina em microtúbulos, o que é necessário para que a célula em meiose segregue os cromossomos e expulse o corpúsculo polar, podendo então completar o processo meiótico.

No caso do presente experimento, apesar de não se tratar de adição de uréia *In vitro*, parece que os dados não corroboram a teoria destes autores, já que os CCO de ambos os tratamentos desenvolveram-se similarmente até o dia 9 após a FIV. Apenas no dia 11, houve diminuição na taxa de eclosão dos blastocistos. Hammon et al. (1997) obtiveram resultados semelhantes ao do presente experimento, pois reportaram diminuição na taxa de blastocistos eclodidos no dia 12 após a FIV nos embriões que foram tratados com amônia no meio de cultivo. Os mesmos autores também não observaram diminuição nas taxas de clivagem nem quando a amônia foi adicionada ao meio de cultivo, nem quando a amônia foi acrescida a meio de maturação.

Em acordo, Ocon e Hansen (2003) não observaram diferenças nas taxas de clivagem quando uréia foi adicionada no meio de maturação às concentrações de 0, 5, 7,5 e 10 μ M de

uréia (0, 14, 21 e 28 mg de nitrogênio uréico por dL, respectivamente). Não obstante, reportaram diminuição na taxa de blastocisto no dia 8 após a FIV entre os CCOs maturados com a adição de 7,5 μ M de uréia no meio. Em um segundo experimento com meio de maturação modificado e adição das mesmas concentrações de uréia do primeiro experimento, não houve diminuição nas taxas de blastocisto, apesar de os autores reportarem diminuição nas taxas de clivagem para os CCO que receberam a máxima concentração de uréia (10 μ M) disponível (OCON; HANSEN, 2003).

Gardner e Lane (1993) e McEvoy et al. (1997) chegaram à conclusão que amônia é tóxica a embriões murinos e ovinos, respectivamente. Esta conclusão não foi calcada pelo ponto de vista da nutrição protéica e sim pelo desenvolvimento embrionário *In vitro*, afinal os teores de amônia no meio de cultura aumentam substancialmente em decorrência da deaminação dos aminoácidos utilizados no meio, principalmente glutamina.

Em alguns casos, diminuição da taxa de clivagem embrionária, diminuição de células embrionárias e aumento de apoptose em embriões expostos a altas concentrações de amônia foram relatadas (LANE; GARDNER, 2003). Porém, Gardner e Lane (1993), McEvoy et al. (1997) e Lane e Gardner (2003) alertaram que o efeito da amônia dependeria da duração da exposição das estruturas à mesma, do estágio de desenvolvimento do embrião e da concentração de amônia ao qual a estrutura é exposta. De fato, a porcentagem de embriões clivados que se desenvolveram até blastocisto, taxa esta verificada no dia 8 após a FIV, foi de 13,6, 20,9, 23,6, 10,8, 12,0, 14,1% para concentrações de amônia no meio FIV de 0, 29, 88, 132, 176, 356 μ M, segundo reportaram Hammon, Wang e Holyoak (2000). Estes mesmos autores, no mesmo trabalho, observaram comportamento semelhante de desenvolvimento dos blastocistos em eclosão no dia 10 após a FIV, ou seja, a menor concentração de amônia levou a menores taxas de eclosão, concentrações médias a melhoraram e altas concentrações a diminuíram. Este efeito benéfico da amônia já havia sido reportado por McEvoy et al. (1997), que perceberam que embriões de ovinos expostos à elevada concentração de amônia no fluido útero-ovidutal a partir do 3º dia após a inseminação desenvolveram-se mais rapidamente e obtiveram atividade metabólica mais alta quando comparados a embriões expostos a menores concentrações de amônia no fluido ovidutal.

Sob condições normais, o fígado converte amônia, advinda do catabolismo protéico no rúmen, a um composto não tóxico, a uréia. Este mecanismo restringe o efeito tóxico da amônia no organismo, protegendo-o. Mas não somente a amônia possui efeito sobre embriões, mas a uréia por si só também já mostrou causar algumas alterações como, por exemplo, alterações no pH do fluido folicular (ELROD; VAN AMBURGH; BUTLER, 1993).

Os animais que receberam o tratamento U apresentaram teores de NUP superiores aos animais do tratamento controle. Porém, os animais do tratamento SU também apresentaram NUP em teor superior ao considerado deletério a vacas leiteiras, o de 19 mg/dL de plasma (BUTLER, 1998).

Os embriões provenientes dos COC dos animais de ambos os grupos apresentaram perfis semelhantes de desenvolvimento até o dia 9 após a FIV. No 11º, no entanto, houve menor número de estruturas eclodidas para os animais do grupo U em relação ao controle (82,50 vs. 64,33%, em média, respectivamente). Isto denota que os embriões do grupo com mais alto teor de NUP, provenientes de oócitos que sofreram maior exposição a este metabólito, tiveram seu desenvolvimento tolhido, ainda que somente manifestado mais tardiamente. Porém, Rhoads et al. (2006) concluíram que altas concentrações de NUP podem ser associadas com decréscimo da viabilidade embrionária através de efeitos exercidos no oócito ou no embrião antes deste ser recuperado do útero, a partir do 7º dia após inseminação da fêmea, devido a maior taxa de prenhez resultante de embriões recuperados de doadoras com moderado NUP em relação a doadoras com alto NUP (35 vs. 11%, respectivamente). Não pode ser esquecido o fato de que neste presente experimento, a categoria animal é diferente da que Rhoads et al. (2006) utilizaram no ensaio, pois Butler (1998) alerta para o fato de que o NUP teria seu efeito deletério acentuado em animais com balanço energético negativo, pelo alto custo energético de detoxificação da amônia no fígado. Como foram utilizadas novilhas, portanto não gestantes e não lactantes, não haveria esta efeito acentuado, apesar de alguns animais terem perdido peso durante o experimento (dados não apresentados).

Também, o efeito da alimentação com uréia em curto prazo oferecida a animais sem prévia adaptação, pode ter contribuído para altas concentrações do metabólito NUP e também para os efeitos sobre oócitos ainda dentro de folículos. Laven et al. (2004) concluíram que vacas lactantes podem se adaptar a quantidades crescentes de uréia se o oferecimento da mesma começar até 10 dias antes da inseminação, sem prejuízo para os embriões coletados em esquema de TE. Os autores não preconizaram inclusão gradual de uréia na dieta de doadoras de embriões, apenas descreveram que a quantidade utilizada na dieta, de 250 g/animal/dia, resultou em teores de NUP de até 23,12 mg/dL, concentração inferior a encontrada na média do grupo U do presente estudo.

3.4 CONCLUSÃO

O teor de nitrogênio uréico plasmático de novilhas foi elevado pelo fornecimento de dieta contendo 75 g de uréia, feito por curto prazo e sem prévia adaptação dos animais.

O aumento no teor de NUP não foi associado com efeitos deletérios na quantidade e qualidade de complexos cumulus-oócito recuperados *in vivo* de novilhas

Não houve efeito deletério de tratamento no desenvolvimento *In vitro* dos CCO com relação às taxas de clivagem e blastocisto até o dia 9 após a inseminação *In vitro*.

No dia 11 após a inseminação *In vitro*, houve menor taxa de eclosão dos blastocistos produzidos dos CCO das novilhas alimentadas com uréia em relação às aquelas que não ingeriram uréia.

REFERÊNCIAS

ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 918-926, 2005.

AIELLO, R. J.; FINK, B. R.; MEACHAM, C. A.; ARMENTANO, L. E. Gluconeogenesis in isolated goat hepatocytes and their responses to calcium, ammonia, and other key metabolites. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 140, 1985. Supplement, 1.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington: AOAC, 1985. 1051 p.

BAREJ, W.; GARWACKI, S.; KULASEK, G.; WIECHETEK, U. Influence of ammonia on glucose metabolism in sheep loaded with insulin or glucagons. **Acta Physiologica Polonica**, v. 25, n. 2, 167-174, 1974.

BAREJ, W.; HARMEYER, J. Effect of hyperammonemia on blood glucose and plasma insulin levels in sheep. **Quartely Journal of Experimental Physiology**, v. 64, p. 31-37, 1979.

BAREJ, W.; OSTASZWESKI, P.; PIERZYNOWSKI, G. Urea and glucose formation in ovine liver after ammonia and lactate loading in vivo. **Annals of Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1987.

BERTAGNOLLI, A. C.; GONÇALVES, P. B. D.; GIOMETTI, I. C.; COSTA, L. F. S.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, I. D. V.; BARRETO, K. P.; EMANUELLI, I. P.; BORGES, L. F. K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 488-496, 2004.

BIGGS, H. G.; COOPER, J. M. Modified folin methods for the measurement of urinary creatinine and creatine. **Clinical Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 655-664, 1961.

BISHONGA, C.; ROBINSON, J. J.; MCEVOY, T. G.; FINDLAY, P.; AITEN, R. P.; ROBERTSON, I. Excess dietary urea intake in ewes and its effects on ovulation rate and embryo development. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 3, p. 139-151, 1996.

BLANCHARD, T.; FERGUSON, J. D.; LOVE, L.; TAKEDA, T.; HENDERSON, B.; HASLER, J.; CHALUPA, W. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 6, p. 905-908, 1990.

BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 1998.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p. 858-865, 1996.

CARROLL, D. J.; BARTON, B. A.; ANDERSON, G. W.; SMITH, R. D. Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 12, p. 3470-3481, 1988.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 130-146, 1962.

CHAUBAL, S. A.; MOLINA, J. A.; OHLRICHS, C. L.; FERRE, L. B.; FABER, D. C.; BOLS, P. E. J.; RIESEN, J. W.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1631-1648, 2006.

CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM. Versão 5.0. Ithaca: Cornell University, 2003.

COTO, G.; RODRIGUES, M. M.; INFANTE, F. P. The effect of increasing consumption of concentrates, creatinin, creatine and allantoin in the urine of rams fed hay. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 22, p. 279-284, 1988.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579 p.

DAWUDA, P. W.; SCARAMUZZI, R.J.; LEESE, H. J.; HALL, C. J.; PETERS, A. R.; DREW, S. B.; WATHES, D. C. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, n. 8, p. 1443-1455, 2002.

DE WIT, A. A. C.; CESAR, M. L. F.; KRUIP, T. A. M. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 8, p. 1800-1804, 2001.

DEL CURTO, T.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R.; BEHARKA, A.A.; VANZANT, E.S.; JOHNSON, D.E. Supplementation of dormant tallgrass-prairie forage. II. Performance and forage utilization characteristics in grazing beef cattle receiving supplements of different protein concentrations. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 2, p. 532-542, 1990.

DI MARCO, O. N.; CASTIÑEIRAS, P.; AELLO, M. S. Ruminal ammonia concentration and energy expenditure of cattle estimated by the carbon dioxide entry rate technique. **Animal Science**, v. 67, 435-443, 1998.

DICONSTANZO, A.; WILLIAMS, J. E.; KEISLER, D. H. Effects of short or long term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolic concentrations in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 11, p. 3050-3056, 1999.

EDWARDS, L. J.; WILLIAMS, D. A.; GARDNER, D. K. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acid act as a buffers of intracellular pH. **Human Reproduction**, v. 13, p. 3441-3448, 1998.

EDWARDS, R. G. Follicular fluid. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 37, p. 189-219, 1974.

ELROD, C. C.; BUTLER, W. R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 694-701, 1993.

ELROD, C. C.; VAN AMBURH, W. R.; BUTLER, W. R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 702-706, 1993.

EMMANUEL, B.; EDJTEHADI, M. Glucose biokenetics in normal and urea treated sheep (*Ovis aries*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 68, n. 4, p. 555-560, 1981.

FELDMAN, J. U.; LEBOWITZ, H. E. Ammonium ion, modulator of insulin secretion. **American Journal of Physiology**, v. 221, n. 4, p. 1027-1032, 1971.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; BLANCHARD, T.; REEVES, M. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3742-3746, 1993.

FERNANDEZ, J. M.; CROOM, W. J.; JOHNSON, A. D.; JAQUETTE, R. D.; EDENS, F. W. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentrations. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 12, 3259-3266, 1988.

FERNANDEZ, J. M.; CROOM, W. J.; TATE, L. P.; JOHNSON, A. D. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on hepatic and portal-drained visceral flux of metabolites and regulatory hormones. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 6, p. 1726-1742, 1990.

GARCIA-BOJALIL, C. M.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; DROST, M. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2537-2548, 1994.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Amino acids and ammonia regulate mouse embryo development in culture. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2, p. 377-385, 1993.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage and fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). **Agricultural Handbook**, 379. Washington: USDA, 1970.

GREGORY, L.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; ARAÚJO, W. P.; BIRGEL, E. H. Valores de referência dos teores séricos da uréia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 339-345, 2004.

HALLET, C. J.; COOK, J. G. H. Enzymatic colorimetric determination of blood urea nitrogen. **Chimical Acta**, v. 35, p. 33, 1971.

HAMMON, D. S.; HOLYOAK, G. R.; DHIMAN, T. R. Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 3-4, p. 195-204, 2005.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, R. G. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1, p. 1-8, 2000.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; LIU, G.; WIEDMEIER, R. D.; HOLYOAK, R. G. Effects of ammonia on *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 321, 1997.

HENRY, R. J. **Clinical chemistry**: principles and technics. Hagerstown: Harper & Row, 1968. 1128 p.

HOWARD, H. J.; AALSETH, E. P.; ADAMS, G. D.; BUSH, L. J.; MCNEW, R. W.; DAWSON, L. J. Influence of dietary protein on reproductive performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 8, p. 1563, 1987.

IWATA, H.; INOUE, J.; KIMURA, K.; KUGE, T.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 3-4, p. 215–223, 2006.

JORDAN, E. R.; CHAPMAN, T. E.; HOLTAN, D. W.; SWANSON, L. V. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 9, p. 1854-1862, 1983.

JORDAN, E. R.; SWANSON, L. V. Effect of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein and albumin in the high-producing dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 58-63, 1979.

KUBIAK, J. Z.; WEBER, M.; GÉRAUD, G.; MARO, B. Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in Mouse oocytes. **Journal of Cell Science**, v. 102, n. 3, p. 457-467, 1992.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression, and subsequently alters fetal development in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1109-1117, 2003.

LAVEN, R. A.; DAWUDA, P. W.; SCARAMUZZI, R. J.; WATHES, D. C.; BIGGADIKE, H. J.; PETERS, A. R. The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1, p. 41-52, 2004.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Sarvier, 1986. 725 p.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 259-267, 2003.

MCEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; FINDLAY, P. A.; ROBERTSON, I. S. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 1-2, p. 71-90, 1997.

MERMILLOD, P.; WILS, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 717-723, 1992.

MORENO, J. F.; TUREZYNSKI, C. J.; FLORES-FOXWORTH, G.; KRAEMER, D. C. Influence of parity of the donor and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes from ovarian follicles aspirated post-mortem. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 1, p. 169, 1992.

MOSCARDINI, S.; WRIGHT, T. C.; LUIMES, P. H.; MCBRIDE, B. W.; SUSMEL, D. P. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on purine derivate and urea nitrogen: comparison with predictions from Cornell Net Carbohydrate and protein system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2421-2329, 1998.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy Press, 2001. 381 p.

OCÓN, O. M.; HANSEN, P. J. Disruption of Bovine Oocytes and Preimplantation Embryos by Urea and Acidic pH. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1194-1200, 2003.

ØRSKOV, E. R.; MACLEOD, N. A. The determination of the minimal nitrogen excretion in steers and dairy cows and physiological and practical implication. **British Journal of Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 625-636, 1982.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1992.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I.; SILVA, J. F.; C.; CECON, P. R.; GONÇALVES, L. C.; DIAS, H. L. C.; LINHARES, R. S. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1235-1243, 2000.

RHOADS, M. L.; GILBERT, R. O.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2896-2901, 2004.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; GILBERT, R. .; TOOLE, R.; BUTLER, W. R. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELL, K. J.; MACSIURTAIN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 939-949, 2005.

SHALLER, K.; HARMEYER, J.; SCHOLZ, H. Effekt von Hyperammonämie auf die Insulinsekretion bei Schafen. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 82, p. 429-472, 1975.

SINCLAIR, K. D.; KURAN, M.; GEBBIE, F. E.; WEBB, R.; MCEVOY, T. G. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets different in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2670-2680, 2000.

SINCLAIR, K. D.; SINCLAIR, L. A.; ROBINSON, J. J. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptive changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2659-2669, 2000.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

SONDERMAN, J. P.; LARSON, L. L. Effect of dietary protein and exogenous gonadotropin-releasing hormone on circulating progesterone concentrations and performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 8, p. 2179-2183, 1989.

SPIRES, H. R.; CLARK, J. H. Effect of intraruminal urea administration on glucose metabolism in dairy steers. **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 1438-1447, 1979.

STAPLES, C. R.; GARCIA-BOJALIL, C. M.; OLDICK, B. S.; THATCHER, W. W.; RISCO, C. A. Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggested mechanism, and blood and milk urea measurements. In: ANNUAL FLORIDA

RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 4., 1993, Gainesville. **Proceedings...**
Gainesville: University of Florida, 1993.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's guide**: Statistics. Versão 8. Cary: SAS, 1999.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHATCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture.. *Biology of Reproduction*, Estados Unidos, v. 64, p. 904-909, 2001. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.

SUSMEL, P.; STEFANON, B.; PLAZZOTTA, E.; SPANGHERO M.; MILLS C. R. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. **Journal of Agricultural Science**, v. 123, n. 2, p. 257-266, 1994.

TRINDER P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxigen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 24-26, 1969.

VAGNONI, D. B.; BRODERICK, G. A. Effects of supplementation of energy or ruminally undegraded protein to lactating cows fed alfalfa hay or silage. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1703-1712, 1997.

VERKMANN, A. S.; DIX, J. A.; SEIFTER, J. L. Water and urea transport in renal microvillus membrane vesicles. **American Journal of Physiology**, v. 248, n. 5, p. F650-F655, 1985. Pt, 2.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LOBO, R. B. The influence of B2 and a modified CR-2 medium on the in vitro production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 259, 1999.

CAPÍTULO 4

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A uréia é um bom complemento nitrogenado a ser utilizado na suplementação de bovinos mantidos a pasto ou confinados e de diversas categorias, por possuir alto equivalente protéico e baixo custo. Este trabalho foi proposto com o objetivo de se verificar se a alimentação com uréia, feita por curto prazo, prejudica o desempenho de novilhas doadoras de oócitos para PIV.

O aumento do teor de uréia plasmática, comumente expresso em NUP, é associado ao desempenho reprodutivo alterado de fêmeas bovinas, verificado por diminuição na concepção, diminuição na qualidade embrionária e alteração de hormônios diretamente ligados à manutenção da prenhez, como a progesterona. A maioria destas observações foi feita com vacas lactantes de alta produção. De fato, o estado de balanço energético negativo pode ser acentuado quando associado à alimentação com teor elevado de proteína, oferecida visando alta produção leiteira. A hipótese para esta observação é que há sobrecarga a órgãos-alvo, como o fígado, gerando alto custo energético ao animal.

Com a finalidade de dirimir dúvidas sobre estes efeitos, observações em fêmeas bovinas não gestantes e não lactantes se fazem necessárias para esclarecer se realmente há efeito direto de PDR e aumento de NUP sobre útero, folículos, oócitos, embriões e corpos lúteos.

Demonstrou-se no presente trabalho que houve aumento do NUP nos animais submetidos à dieta com uréia, oferecida sem prévia adaptação e por curto período de tempo. As novilhas que não ingeriram uréia apresentaram concentração de NUP menor, porém acima dos valores considerados fisiológicos. Como as colheitas foram pontuais, não havendo a realização de uma curva da concentração de NUP ao longo do dia, não foi possível identificar se houve diminuição do NUP horas depois do pico esperado de liberação amoniacal no rúmen. Mas, o fato do teor de NUP estar elevado, mesmo decorridas muitas horas após a alimentação, pode indicar a reciclagem da uréia de volta ao rúmen e a falta de carboidrato disponível no órgão para produção de proteína microbiana. Possivelmente, a uréia foi desaminada, em um ciclo que várias vezes se repetiu.

Aparentemente, os animais do grupo controle não ingeriram quantidade suficiente de carboidratos para aproveitamento da amônia gerada no rúmen, que foi rapidamente absorvida, levada aos hepatócitos, onde foi transformada em uréia. No entanto, estes animais tiveram à disposição pastagem de baixa qualidade, lentamente fermentada no rúmen e que poderia suprir, ainda que lentamente, esqueleto de carbono para aproveitamento da amônia gerada. Nesta hipótese, não era esperado teor tão elevado de NUP antes da alimentação.

Não obstante, às três horas após a alimentação, as novilhas alimentadas com uréia apresentaram maior concentração de NUP do que antes da alimentação, o que não ocorreu nos animais do tratamento controle, ressaltando a efetividade do modelo experimental utilizado.

Em relação à glicose plasmática, os animais do tratamento com uréia apresentaram maior teor de glicose em relação aos animais sem uréia às três horas após a alimentação, o que também aponta para um efeito metabólico do alto teor de uréia no sangue, podendo até se estender para teores de insulina e moléculas *insulin-like* (e.g., IGF), conhecidas por seu papel mitogênico e anti-apoptótico.

Como as novilhas utilizadas neste experimento vinham sendo mantidas a pasto, recebendo apenas silagem como suplementação, não era esperado um excelente desempenho no tocante à quantidade e qualidade de oócitos recuperados. A média de 8,99 oócitos recuperados por animal foi considerada boa para os animais de ambos os tratamentos, enquanto que a média de 0,68 oócito grau I por animal (7,5% do total recuperado) foi considerada baixa em relação à relatada na literatura.

Já houve relatos de diminuição na taxa de prenhez em receptoras, gestantes de embriões gerados em doadoras alimentadas com alta quantidade de proteína degradável no rúmen (PDR), a despeito do tipo de dieta que receberam. Diante destas observações, foi concluído que embriões gerados nas doadoras alimentadas com alto teor de PDR sofreram ações anteriormente a colheita ou então que os oócitos foram afetados ainda dentro do folículo.

Realmente, nas células de folículos pré-ovulatórios de mulheres, há evidências de ausência de ciclo de uréia, o mesmo ciclo pela qual a tóxica amônia é transformada em uréia, denotando fragilidade no metabolismo de compostos nitrogenados. Não obstante, também em mulheres, a concentração de glutamato já foi associada negativamente com a concentração de glutamina, tanto mensurados em plasma quanto em fluido folicular, o que de certa forma indica que a amônia gerada no sistema é capturada na molécula de glutamina. Também, a concentração de glutamato foi maior em fluido folicular do que no plasma. Tais observações

levam à conclusão de que pode haver maior suscetibilidade das células à amônia, mas há um mecanismo de proteção que não permite a molécula de amônia circular livremente.

Contudo, neste estudo, não foi possível obter evidência de ação da uréia plasmática sobre gametas, baseando-se na inspeção visual dos complexos cumulus-oócito recuperados.

A taxa de clivagem foi considerada média em relação às taxas citadas na literatura (em torno de 73%) e esperava-se uma menor taxa de clivagem nos animais alimentados com uréia, pois houve relatos na literatura de que alimentação com alta PB foi associada com decréscimo da taxa de clivagem e proliferação celular.

Entretanto, no 11º dia após a inseminação *In vitro*, houve diferenciação entre tratamentos em relação à taxa de blastocistos eclodidos sobre total de blastocistos. A sensibilidade de embriões bovinos a compostos nitrogenados já foi demonstrada *In vitro*, apesar de conhecer-se apenas um relato de diminuição na taxa de eclosão em resposta ao aumento de concentração amoniacal no meio de cultivo. Tal evidência pode ser devida à incompetência do embrião em excretar a uréia acumulada no citoplasma, por deficiência na transcrição de proteína carreadora ou também pela hipótese, já testada e aceita, de associação entre uréia em excesso no meio de cultivo e ausência de formação de citoesqueleto, necessário ao processo de eclosão.

Não obstante, alguns autores creditam a diminuição na taxa de concepção em vacas alimentadas com alto teor de PB a alterações no ambiente uterino, conforme aumento do NUP, ao redor do momento de implantação do embrião.

De qualquer forma, faz-se necessário muito critério na utilização de uréia como fonte de nitrogênio não-protéico na alimentação de vacas e novilhas, em programas de transferência de embriões ou aspiração folicular *In vivo* para PIV.

A condição de exposição do animal à uréia é o fator determinante que separa a possibilidade de oferecimento de fonte nitrogenada, da possibilidade de intoxicação e perdas. Tanto a categoria animal à qual é oferecida, como a dose e a estratégia com que é oferecida são fatores que determinam a condição de exposição.

Sobre a categoria animal, vacas leiteiras parecem ser muito influenciadas, principalmente durante o intervalo parto-concepção, quando as maiores produções leiteiras são esperadas. Em vacas e novilhas de corte, o suprimento de fonte energética associada ao fornecimento de uréia é indispensável para o sucesso da estratégia de alimentação.

Em relação à dose e estratégia de alimentação, o período de adaptação, ou seja, inclusão gradativa de uréia na dieta de fêmeas bovinas, ainda é a melhor opção que as mesmas não apresentem picos de uréia plasmática, podendo assim serem prevenidos efeitos da ação da

mesma sobre útero, folículos, oócitos e embriões. A época de introdução da uréia na dieta também deve ser oportuna, evitando-se introdução da mesma ao redor do momento da inseminação.

Também, a administração de dieta total como forma de arração pode atenuar os efeitos de fonte de rápida degradação de nitrogênio como a uréia, pois tendo carboidrato na dieta o suficiente para combinar-se com o grupo amina, formando assim aminoácidos e proteína microbiana, haverá menos amônia livre no rúmen. Quanto menos amônia atingir a circulação, resultará em menor formação de uréia no fígado e conseqüentemente menos uréia circulante. Esta, por sua vez, pode atingir o útero, folículos e embriões, estruturas que parecem não possuir mecanismos de detoxificação.

Em síntese, a maioria dos autores defende uma destas duas teorias: efeito da uréia nos folículos, nos oócitos após a ovulação ou nos zigotos, ou efeito da uréia no útero, cujas condições em virtude da exposição podem ser inóspitas ao embrião no momento da implantação, causando perda embrionária precoce. No presente estudo, foi aceita a hipótese de suscetibilidade oocitária à exposição *In vivo* à ureia, uma vez que *In vitro* não houve exposição à mesma. Tal efeito, contudo, traduziu-se em resposta no 11º dia de cultivo, quando houve diminuição da taxa de eclosão de blastocistos, reiterando uma das teorias já propostas. Logo, a ação ocorre em estádios iniciais, ainda no gameta, e a expressão da resposta dá-se em momento mais tardio, já na implantação uterina. A observação foi feita em uma fase não muito estudada na PIV, já que a transferência ou congelamento do embrião dá-se no dia 6 ou 7 após a IIV. Porém, foi decidido que a observação seria feita até o 11º dia de cultivo, pois já houve relatos na literatura de alterações em desenvolvimento embrionário tardio.

Não obstante, no 11º após a IIV, houve diferença entre oócitos expostos a teores superiores de NUP.

Em conclusão, foi proposto um modelo pelo qual o aumento do teor de NUP pode influenciar a diminuição da eclosão dos blastocistos gerados de oócitos provenientes de novilhas alimentadas com uréia (Figura 1).

Figura 1 – 1) A amônia ruminal, oriunda da hidrólise da uréia, é carregada ao fígado, onde é transformada a uréia. 2) A uréia plasmática pode ser reciclada ao rúmen ou, se em excesso, distribuída a diversos tecidos e células do organismo. No fígado, aminoácidos são desaminados. Amônia resultante pode ser incorporada à glutamina, um aminoácido carreador. 3) A glutamina pode chegar ao fluído folicular, um transudato do plasma. A uréia também pode chegar ao fluído folicular no qual o oócito está imerso e também pode atingir o útero, alterando sua composição e meio. No corpo lúteo, pode haver diminuição da produção de progesterona, em resposta ao aumento da concentração amoniacal. **Mecanismo hipotético de ação da uréia sobre a reprodução.** 4) A uréia pode impedir a polimerização da tubulina do citoesqueleto, o que impede a meiose do oócito. 5) Mesmo se a meiose for completada e o oócito maduro for fecundado, a uréia pode aumentar a taxa de apoptose do zigoto até o estágio de oito células. 6) Alta concentração intracelular de uréia pode inibir a transcrição de proteínas carreadoras de uréia para fora do meio intracelular, mantendo-a dentro do embrião, e fazendo com que esta atue sobre o mesmo por meio de processos como o descrito nos itens 4 e 5, podendo diminuir a taxa de blastocistos e eclosão dos mesmos.