

FLÁVIO ROCHA ALVES

Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas

FLÁVIO ROCHA ALVES

Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza
Rodrigues

Pirassununga

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.1905 FMVZ	<p>Alves, Flávio Rocha</p> <p>Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas / Flávio Rocha Alves. – Pirassununga: R. A. Flávio, 2007. 79 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2007.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.</p> <p>1. Embrião. 2. Nelore. 3. Nitrogênio uréico plasmático (NUP). 4. Proteína bruta (PB). 5. Uréia. I. Título.</p>
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

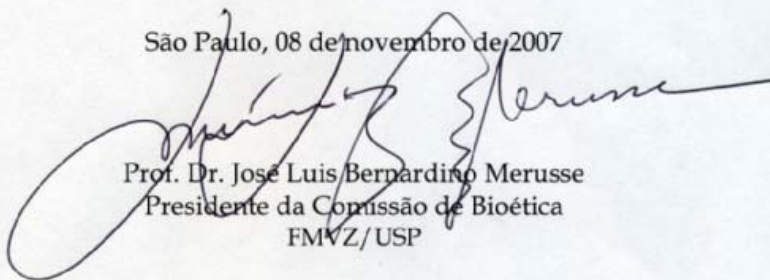
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fornecimento de dietas com alto teor de nitrogênio não-protéico em diferentes fases do ciclo estral e possíveis efeitos na produção e qualidade de embriões em fêmeas bovinas superovuladas", protocolo nº876/2006, utilizando 68 (sessenta e oito) bovinos, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Supply of high non-protein nitrogen (NPN) diets to superovulated beef cows at different periods of the oestrus cycle on yield and quality of recovered embryos", protocol number 876/2006, utilizing 68 (sixty eight) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 08 de novembro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALVES, Flávio Rocha

Título: Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Roque e Marlene, que desde o início, às custas da abdicação de determinadas situações e luxos, lutaram para que eu tivesse uma boa formação acadêmica, me oferecendo totais condições de encarar a profissão de médico veterinário e o desafio de uma pós-graduação. Espero um dia retribuir tudo o que fizeram por mim esses anos todos.

Dedico também ao meu irmão, Marcio, pelo companheirismo e atenção em todos os momentos necessários.

AGRADECIMENTOS

"No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim"

Fernando Sabino

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade de realizar a graduação e, agora, o mestrado, partilhando de toda a infra-estrutura e também do conhecimento gerado nesta escola.

Ao Professor Paulo Henrique Mazza Rodrigues, pela orientação exercida durante estes últimos dois anos e durante toda a graduação, disponibilizando-me oportunidades de vivência, aprendizagem e profissionalismo.

A todo o corpo docente do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), Prof. Gobesso, Profa. Maria de Fátima, Prof. Messias, Prof. Augusto, Prof. Aníbal, Prof. Romualdo e, em especial aos Prof. Marcos Veiga, Prof. Francisco Rennó e Prof. Luis Felipe, que sempre se mostraram dispostos, durante todo o mestrado, a solucionar dúvidas e questionamentos que me surgiam.

Ao Professor Rubens Paes de Arruda do Departamento de Reprodução Animal (VRA) por me disponibilizar moradia na casa do NAPGAMA, duante estes dois anos, mesmo não pertencendo ao quadro de pós-graduandos do VRA.

Ao Professor Pietro Sampaio Baruselli do Departamento de Reprodução Animal (VRA) por me auxiliar na montagem do protocolo de superovulação e colheita dos embriões.

Ao Professor João Negrão da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos por disponibilizar o Laboratório de Fisiologia (FZEA – USP) para a realização de análises plasmáticas e à técnica Sandra, pela ajuda na execução das análises.

Ao Professor Guilherme de Paula Nogueira do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) por disponibilizar o Laboratório de Endocrinologia para a realização de análises hormonais.

Ao Dr. João Demarchi, por disponibilizar a Fazenda da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) de Andradina e oferecer todos os recursos e infra-estrutura necessária para a execução deste estudo.

Ao Ari, Gilson, Simi e Isabel, técnicos do Laboratório de Bromatologia (VNP – FMVZ – USP) pela imensurável ajuda nas análises bromatológicas das dietas e análises plasmáticas.

Um profundo agradecimento ao Claudiney de Melo Martins que realizou a colheita e análise dos embriões e também aos amigos Jaqueline Aguiar Rodrigues e Fernando do Amaral Braga, que auxiliaram na análise dos embriões e sem os quais seria impossível realizá-lo.

A todos os pesquisadores do APTA de Andradina, em especial ao Dr. Ricardo Lopes Dias Costa que auxiliou profundamente na execução do experimento. Também, a todos os funcionários do APTA de Andradina, em especial ao Médico Veterinário Adílson e toda a sua equipe pelo grande auxílio no experimento.

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.

A Cris, Alessandra e Zequinha, secretários do VNP, pela pronta disposição dispendida.

Aos amigos de Pós-Graduação do VNP, pela alegre convivência que temos. Em especial aos grandes companheiros de orientador, Fernanda (Xeila), Walter e Carol e o agregado Samuel. Também não posso esquecer de agradecer também a Carolina Fernanda, Daniel (Emú), Diego, Estelinha, Rafael, Riquelme, Francine,

Felipão, Aline, Vinícius, Willian, Andréia, Ariana, Pascoal, Zé Ésler, Milton, Jefferson, Camila, Cris, Bruna, Waleska, Alessandra, Renata e Brunão.

Ao pessoal da casa do NAPGAMA, Fernando (Culhão), Fabiana (Martini), André (Simprão), Simone, Felipe (Foca) e Fernando Pardo pela agradável convivência e incontáveis momentos alegres que vivecíamos juntos nesta casa!

E a todos que porventura tenha esquecido de agradecer. Muito obrigado!

RESUMO

ALVES, F. R. **Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas.** [Effect of short term non-protein nitrogen (NPN) feeding to superovulated beef cows without previous adaptation, at different periods of the oestrus cycle on yield, quality and development degree of recovered embryos]. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

Níveis elevados de proteína bruta (PB) na dieta de ruminantes têm sido associado com comprometimento na fertilidade devido, principalmente, a elevação da concentração do nitrogênio uréico plasmático (NUP). Objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral, a fêmeas bovinas superovuladas quanto à produção, qualidade e ao grau de desenvolvimento de embriões recuperados. Sessenta e oito vacas da raça Nelore com escore corporal de 7,56 e peso médio de 557,6 kg foram distribuídas em três tratamentos: controle (C), uréia antes do dia 0 (UA; fornecimento de dieta com uréia do dia -5 ao dia 0) e uréia depois do dia 0 (UD; fornecimento de dieta com uréia do dia 0 ao dia 5). As vacas foram mantidas em piquetes com pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e receberam diariamente, 3,0 kg/animal de concentrado durante 16 dias. Foram formulados dois concentrados, sendo que as dietas totais (concentrado + consumo estimado de pastagem) continham 12,0% (dieta controle) e 14,6% de PB (dieta com NNP). A diferença na PB entre as dietas foi o acréscimo de 100g/vaca/dia de uréia. Os animais foram sincronizados, superovulados e inseminados. Sete dias (dia 7) após a inseminação (dia 0), realizou-se a colheita e análise dos embriões quanto à qualidade e ao grau de desenvolvimento. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -5, 0 e 5 para mensurações das concentrações de NUP, glicose, insulina e progesterona. Houve efeito significativo dos tratamentos sobre a concentração médias de NUP no dia -5 (C = 16,18^{ab}, UA = 17,72^a e UD = 14,47^b mg/dL; P = 0,0007), no dia 0 (C = 18,95^b, UA = 22,71^a e UD = 21,15^{ab} mg/dL; P = 0,0010) e no dia 5 (C = 20,93^a, UA = 19,08^b

e UD = 21,51^a mg/dL; P = 0,0022). Quanto às concentrações de glicose, insulina e progesterona não houve efeito dos tratamentos. Não houve efeito significativo nem da inclusão da uréia e nem do momento da inclusão da uréia sobre o total de estruturas recuperadas, total de estruturas fecundadas e de embriões viáveis. Porém, houve efeito do momento de inclusão da uréia sobre a porcentagem de estruturas fecundadas em relação ao total de estruturas recuperadas (UA = 75,3 vs. UD = 50,7%) e sobre a porcentagem de embriões viáveis em relação ao total de estruturas recuperadas (UA = 73,2 vs. UD = 39,4%). O tratamento UD acarretou em menor capacidade de fecundação do oócito em relação ao tratamento UA, havendo redução de aproximadamente 32,7% na proporção de oócitos fecundados sobre o total de estruturas recuperadas deste tratamento.

Palavras-chave: Embrião. Nelore. Nitrogênio uréico plasmático (NUP). Proteína bruta (PB). Uréia.

ABSTRACT

ALVES, F. R. **Effect of short term non-protein nitrogen (NPN) feeding to superovulated beef cows without previous adaptation, at different periods of the oestrus cycle on yield, quality and development degree of recovered embryos.** [Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NPN) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas]. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

High levels of crude protein (CP) in ruminant diets were associated with detrimental effect on fertility, mainly, due to the rise of plasmatic urea nitrogen (PUN) concentration. The aim of this study was to verify the effects of short term non-protein nitrogen feeding at different periods of the oestrus cycle in superovulated cows without previous adaptation on yield, quality and development degree of recovered embryos. Sixty eight Nelore cows with body condition score of 7.56 and body weight of 557.6 kg were divided in three different groups: control (C), urea before day 0 (UB; urea supply from day -5 to day 0) and urea after day 0 (UA; urea supply from day 0 to day 5). Animals were grazing in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pasture and received 3.0 kg/animal/day of concentrate during 16 days. Two concentrates were formulated and the total diets (concentrate + estimate forage intake) had 12.0% (control diet) and 14.6% of CP (NPN diet). The difference in CP between diets was the addition of 100g/cow/day of urea. Animals were synchronized, superovulated and inseminated. The embryos were collected seven days (day 7) after insemination (day 0) and quality and development degree were also evaluated. Blood samples were collected on day -5, 0 and 5 for measurement of PUN, glucose, insulin and progesterone. There was significant effect of treatments on average PUN concentration at day -5 (C = 16.18^{ab}, UB = 17.72^a and UA = 14.47^b mg/dL; P = 0.0007), at day 0 (C = 18.95^b, UB = 22.71^a and UA = 21.15^{ab} mg/dL; P = 0.0010) and at day 5 (C = 20.93^a, UB = 19.08^b and UA = 21.51^a mg/dL; P = 0.0022). For glucose, insulin and progesterone there was no effect of treatments. It was observed neither effect of urea inclusion nor the moment of urea inclusion in diet on the total number of recovered structures, total number of fertilized structures and total number of viable

embryos. However, it was observed effect of the moment of urea inclusion on the rate of fertilized structures in relation to the total number of recovered structures (UB = 75.3 vs. UA = 50.7%) and on the rate of viable embryos in relation to the total number of recovered structures (UB = 73.2 vs. UA = 39.4%). The UA treatment lead to lowest fertilizing oocyte capacity in relation to UB treatment with an approximate reduction of 32.7% on oocytes fertilized proportion over the total recovered structures in this treatment.

Key words: Crude Protein (CP). Embryo. Nelore. Plasmatic urea nitrogen (PUN).
Urea.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporções de ingredientes utilizados (estimados) e composição bromatológica das dietas, com base na matéria seca.....	42
Tabela 2 – Composição bromatológica da <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	42
Tabela 3 – Proporções de ingredientes utilizados e composição bromatológica dos concentrados, com base na matéria seca	43
Tabela 4 – Esquema de análise de variância para delineamento em blocos.....	48
Tabela 5 – Esquema de análise de variância para delineamento em blocos com as medidas repetidas no tempo (0, 3 e 6h)	48
Tabela 6 – Teores de nitrogênio uréico plasmático (NUP) em mg/dL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas.	49
Tabela 7 – Teores de glicose em mg/dL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas. ...	50
Tabela 8 – Teores de insulina em μ UI/mL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas. ...	51
Tabela 9 – Teores de progesterona em ng/mL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas.	51
Tabela 10 – Número médio de estruturas recuperadas e sua classificação em números absolutos, porcentagens em relação ao total de estruturas recuperadas, fecundadas e viáveis, coeficientes de variação (CV) e probabilidades dos contrastes ortogonais (C_1 e C_2).	52

LISTA DE ABREVIATURAS

BEN	Balanço energético negativo
CMS	Consumo de matéria seca
EE	Extrato etéreo
EL _l	Energia líquida de lactação
EM	Energia metabolizável
FDA	Fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	Fibra insolúvel em detergente neutro
FSH	Hormônio folículo estimulante
IA	Inseminação artificial
LH	Hormônio luteinizante
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NUP	Nitrogênio uréico plasmático
NUL	Nitrogênio uréico no leite
PB	Proteína bruta
PDR	Proteína degradável no rúmen
PNDR	Proteína não-degradável no rúmen
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
P4	Progesterona
TE	Transferência de embriões
Vs.	<i>versus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Nitrogênio Alimentar	18
2.2 Metabolismo do nitrogênio nos ruminantes	19
2.3 Uréia e seu metabolismo em ruminantes	21
2.4 Avaliação do perfil protéico do rebanho	22
2.5 Efeitos da uréia sobre o consumo de alimentos	24
2.6 Excesso de PB na dieta e efeitos adversos na reprodução	25
2.7 Alta concentração de NUP e ambiente uterino	28
2.8 Efeitos do alto NUP sobre os hormônios reprodutivos	37
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Animais e delineamento experimental	40
4.2 Tratamentos	40
4.3 Período experimental	43
4.4 Sincronização do ciclo estral com superovulação e inseminação em tempo fixo	44
4.5 Colheita de sangue para determinação de parâmetros séricos e plasmáticos	44
4.6 Colheita e análise dos embriões	46
4.7 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Alimentar rebanhos leiteiros e de corte a baixo custo é uma das formas de garantir melhor rentabilidade na produção de leite e carne. Da mesma forma, para manter níveis elevados de produção de bovinos destinados às práticas das biotecnologias da reprodução, como fertilização *in vitro* (FIV) ou transferência de embriões (TE), são necessários níveis adequados de energia e proteína na dieta. Entre as fontes de nitrogênio não-protéico (NNP), a uréia é a mais comum e de custo mais acessível (EZEQUIEL et al., 2001). Além disso, a incorporação de quantidades máximas de NNP nas rações de vacas leiteiras tem demonstrado redução nos custos, sem diminuir a produtividade ou comprometer a saúde de bovinos (HUBER; KUNG, 1981; SANTOS et al., 1998b).

Assim, a uréia tem sido muito utilizada como suplemento protéico na alimentação de ruminantes. Entretanto, é pouco utilizada em programas de TE por desencadear aumento na concentração de N uréico no plasma (BARRETO et al., 2003).

Concentrações plasmáticas de nitrogênio uréico (NUP) maiores que 19 mg/dL têm sido associados com diminuição na eficiência reprodutiva, principalmente em rebanhos leiteiros (BUTLER et al., 1996). Menores taxas de prenhez e menor eficiência reprodutiva podem ser ocasionadas pelo uso inadequado de NNP e alto teor de proteína bruta (PB) na alimentação.

Em trabalho recente, foi evidenciado que o aumento de uréia no plasma pode desencadear mudanças nos folículos e oócitos, diminuindo a qualidade e, portanto, a viabilidade destes (ARMSTRONG et al., 2001). Entretanto, dados relacionando eficiência reprodutiva e nutrição são controversos. Kenny et al. (2002) mostraram que a utilização de uréia na dieta não interfere nos parâmetros reprodutivos do rebanho.

A grande maioria dos trabalhos que relacionam diminuição da eficiência reprodutiva e elevadas concentrações de NUP são realizados com vacas leiteiras de alta produção, recebendo dietas com alta teor de PB. Contudo, esta categoria animal possui, no período peri-parto, balanço energético negativo bastante intensificado (TAMMINGA, 2006) que pode ser acentuado pelo elevado consumo de PB. Além

disso, esta categoria também possui elevada ingestão de matéria seca (IMS) que tem sido relacionada com diminuição nas concentrações sistêmicas dos hormônios esteroidais, progesterona (P4) e estrógeno (E2) (SANGSRITAVONG et al., 2002), hormônios reconhecidamente importantes na função reprodutiva.

Logo, demonstrar a relação entre o aumento de PB na dieta e o aumento do N uréico sistêmico, assim como relacioná-los à degradabilidade da proteína, e uma possível menor produção quantitativa e qualitativa de embriões é de extrema relevância para maximização da produção em animais ruminantes.

Neste contexto, o presente estudo utilizou vacas da raça Nelore sob pastejo em *Brachiaria brizantha* recebendo suplementação contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Durante as últimas décadas, a produção de leite tem aumentado significativamente, devido a fatores como seleção genética intensa, manejo nutricional avançado, melhorias no controle de doenças, assim como melhoria em outras práticas de manejo (PIRES; SUSIN, 1997). Com o aumento do número de animais nos rebanhos leiteiros, sistemas de manejo alimentar intensivo são adotados e necessários para a maximização da produção de leite. Isto, de maneira geral, leva a decréscimo na fertilidade dos rebanhos (ROBINSON, 1996; LARSON et al., 1997; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; BUTLER, 2000; DAWUDA et al., 2002). Um exemplo claro pode ser observado nos rebanhos leiteiros de Nova York, que apresentaram decréscimo na taxa de concepção ao primeiro serviço, de 66% em 1951 para 40% em 1995. Porém, neste mesmo período, a produção de leite dobrou (BUTLER; SMITH, 1989).

A reprodução em mamíferos é um complicado processo que somente ocorre quando há harmonia entre condições ambientais, físicas e dietéticas (BRONSON, 1985). O consumo excessivo ou deficiente de energia, proteína, vitaminas, macro e microminerais têm sido relacionados com desempenho reprodutivo deficiente. Entretanto, entre os estudos na literatura, as respostas na reprodução a um inadequado ou excessivo consumo de nutrientes são raramente consistentes (PIRES; SUSIN, 1997; DAWUDA et al., 2004).

2.1 Nitrogênio Alimentar

O nitrogênio dietético é normalmente classificado em componentes protéicos e não-protéicos. Nos componentes não-protéicos incluem-se os aminoácidos livres, peptídeos, ácidos nucléicos, amônia livre, sais de amônio, uréia, biureto, nitrato, assim como outros componentes que contém nitrogênio (HUBER; KUNG, 1981). Entre as fontes de NNP, a uréia é a de uso mais comum em programas de alimentação, provavelmente por ser a fonte de custo mais acessível (SANTOS et al.,

1998a; EZEQUIEL et al., 2001). Ainda, há fontes endógenas que incluem as células de descamação e a uréia que entra no rúmen através do epitélio ruminal ou pela saliva. Com exceção de algumas proteínas e de nitrogênio associado com a fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), estas fontes de nitrogênio apresentam alta solubilidade e tornam-se rapidamente suscetíveis à degradação no rúmen (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

2.2 Metabolismo do nitrogênio nos ruminantes

O nitrogênio utilizado pelo ruminante pode ser advindo da dieta, da reciclagem de nitrogênio (uréia) ou endógeno (células de descamação). A proteína da dieta é dividida em proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não-degradável no rúmen (PNDR), sendo a PDR composta por NNP e proteína verdadeira. A proteína verdadeira é degradada em peptídeos e aminoácidos, sendo desaminada a amônia ou incorporada a proteína microbiana. O NNP é composto pelo nitrogênio presente no ácido dextrorribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), amônia, aminoácidos e em pequenos peptídeos, sendo utilizados principalmente para o crescimento microbiano (BACH et al., 2005).

O metabolismo do nitrogênio no rúmen pode ser dividido em dois eventos distintos: a degradação da proteína, que providencia fonte de nitrogênio para as bactérias, e a síntese protéica microbiana (BACH et al., 2005).

O primeiro passo para a degradação da proteína no rúmen envolve o ataque das bactérias sobre as partículas dos alimentos, seguido pela atividade das proteases bacterianas (BROCK et al., 1982). Um grande número de diferentes espécies microbianas formam uma consorciação, agindo simbioticamente para degradar e fermentar os nutrientes, incluindo a proteína. Os produtos resultantes deste processo são os peptídeos e aminoácidos (BACH et al., 2005).

Parte da PDR é convertida a proteína microbiana, 75% consistindo em aminoácidos e 25% de não-aminoácidos, principalmente os ácidos nucléicos que são excretados na urina. A quantidade de PDR que é convertida em proteína microbiana depende do nível de PB na dieta, da proporção de PDR na PB, da

disponibilidade de quantidade suficiente de carboidratos degradáveis no rúmen e da eficiência da produção de proteína microbiana (TAMMINGA, 2006).

Os peptídeos e aminoácidos resultantes da atividade proteolítica extracelular no rúmen são transportados para dentro das células microbianas. Os peptídeos podem ser ainda degradados em aminoácidos e, posteriormente, serem incorporados à proteína microbiana ou ainda desaminados a ácidos graxos voláteis (AGV), gás carbônico (CO_2) e amônia (TAMMINGA¹, 1979; apud BACH et al., 2005, p.13). No entanto, os peptídeos e aminoácidos para serem absorvidos pelas células microbianas dependem da disponibilidade de energia (carboidratos). Se há energia disponível, os aminoácidos serão transaminados ou usados diretamente para a síntese de proteína microbiana. Entretanto, se a energia for limitante, os aminoácidos serão desaminados e seu esqueleto carbônico será fermentado em AGV (BACH et al., 2005).

A amônia é um dos principais componentes do metabolismo do N nos ruminantes. Quase a totalidade das bactérias celulolíticas preferem ou requerem N na forma de amônia (RUSSELL et al., 1992), formando uma ligação entre a transformação das fontes de N para amônia e a fermentação da fibra. Os protozoários ruminais também contribuem no oferecimento de amônia diretamente pela degradação da proteína ingerida (JOUANY, 1996) ou indiretamente por alterar o perfil bacteriano (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

O pH fisiológico do rúmen é usualmente duas ou mais unidades de pH menor do que o pKa da amônia, logo, praticamente toda a amônia (NH_3) no rúmen encontra-se na forma protonada, NH_4^+ (amônio). A protonação e desprotonação da amônia providenciam um mecanismo para a movimentação destas moléculas pelas membranas e faz da amônia um importante intermediário da regulação ácido-base, como também do metabolismo do nitrogênio. A amônia é absorvida, ou passa por difusão, por todo o trato digestório do ruminante. A quantidade de N absorvido como amônia varia em torno de 16 a 73% do N ingerido, podendo ser várias vezes maior que a quantidade do N absorvido como aminoácidos. A elevação transitória, pós-prandial ou crônica das concentrações de amônia na circulação sanguínea periférica pode refletir a liberação esplênica de amônia ou, mais provavelmente, reflete a

¹TAMMINGA, S. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 1615–1630, 1979.

difusão da amônia diretamente do trato digestório para a circulação (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

Assim como os outros mamíferos, os ruminantes dependem do fígado para a detoxificação da amônia absorvida, sintetizando uréia e prevenindo que o excesso de N torne-se tóxico. A capacidade do fígado para realizar esta função raramente é excedida, a não ser quando há excesso de uréia dietética ou fonte similar de N rapidamente degradável (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

2.3 Uréia e seu metabolismo em ruminantes

A uréia disponível ao animal pode ter origem endógena ou exógena. A uréia exógena, fornecida ao ruminante como fonte de nitrogênio para os microrganismos ruminais, é um composto quaternário constituído por nitrogênio, oxigênio, carbono e hidrogênio ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) (SCHMIDT-NIELSEN, 1996; NELSON; COX, 2000).

A uréia pode ser proveniente do metabolismo protéico de duas formas. A primeira é devido à desaminação e ao metabolismo dos aminoácidos. Estes aminoácidos são provenientes da proteína não degradável no rúmen (PNDR), proteína microbiana e reservas corporais. A segunda forma proveniente do metabolismo protéico ocorre durante o processo de fermentação ruminal, quando a proteína degradável no rúmen (PDR) é degradada à amônia e esta é utilizada como substrato para a síntese protéica microbiana. O excesso de PDR na dieta produz excesso de amônia no rúmen que acaba excedendo a capacidade de incorporação pelos microrganismos ruminais. Antes da difusão pelo epitélio, o íon amônio é convertido em amônia na parede do trato, difunde-se para dentro das células do epitélio como amônia e, então, é protonado para formar novamente o íon amônio (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999). Esta amônia atravessa o epitélio do rúmen, atinge a circulação e no fígado sofre a conversão em uréia (GUSTAFSSON; PALMQVIST, 1993; BUTLER et al., 1996; BUTLER, 1998). A quantidade de amônia produzida e a quantidade que escapa da fermentação ruminal e é convertida em uréia refletem diretamente a PDR dietética e a disponibilidade de carboidratos

fermentáveis para prover o crescimento da microbiota ruminal e a síntese protéica (BUTLER, 1998).

A uréia formada endógenamente pode ser eliminada via urina, retornar ao rúmen pela saliva ou por difusão pelo epitélio ruminal (VISEK, 1984).

Quando há falta de PDR, a urease de bactérias aderidas ao epitélio ruminal entram em contato com a uréia da circulação, levando a sua hidrólise, desdobrando-a em CO₂ e amônia para dentro do rúmen. Possivelmente, a hidrólise da uréia ocorre durante sua passagem pelo epitélio ruminal em decorrência da ação da urease bacteriana que penetra no tecido, o que de certa forma acelera a difusão desta para o rúmen (HOUPPT, 1970). Quando o fígado excede sua capacidade de conversão, as concentrações de amônia no sangue elevam-se, ocasionando uma alcalose sistêmica. A amônia é rapidamente absorvida pelo cérebro, sendo que os transtornos no sistema nervoso central são sintomas de intoxicação (EMERICK, 1993).

2.4 Avaliação do perfil protéico do rebanho

Três pontos principais de aplicação prática relativos ao uso de NNP em ruminantes que devem ser respeitados são 1) sincronização da fermentação de carboidratos e N no rúmen, 2) NUP como uma conveniente mensuração do status protéico e 3) fluxo de N pelos sistemas ambientais. A sincronização da fermentação ruminal melhora a digestão da fibra, aumenta a saída da biomassa microbiana (ênfase na proteína microbiana) e diminui a absorção de amônia (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

O metabolismo de N em bovinos envolve o suprimento de nutrientes para os microorganismos ruminais, assim como para o animal. A eficiência da nutrição protéica é uma função do suprimento de N ao rúmen e ao animal. Conseqüentemente, um método acurado de predição da nutrição protéica deve ser considerado (ROSELER et al., 1993).

Um sistema que demonstre o padrão de nutrição protéica dos animais é de extrema importância, pois sua utilização apresenta vários benefícios, entre eles economia nos custos com alimentação. A amônia ruminal, uréia no sangue ou

plasma e uréia no leite estão altamente correlacionadas, podendo ser utilizadas para monitoramento do perfil da dieta (DePETERS; FERGUSON, 1992; BRODERICK; CLAYTON, 1997). A capacidade de se mensurar o N uréico no leite, plasma ou urina permite que as fazendas leiteiras controlem a eficiência da utilização do N (ROSELER et al., 1993). O uso da concentração da N uréico no leite tem como objetivo básico demonstrar o perfil de nutrição protéica dos animais de maneira pouco invasiva.

O nitrogênio uréico plasmático (NUP) reflete o não aproveitamento da PB da dieta em vacas leiteiras. Adicionalmente, o NUP é influenciado pela PDR em animais alimentados com dietas isonitrogenadas. Além disso, animais alimentados com excessiva PNDR apresentaram concentrações de NUP aumentadas em 3 mg/dL (ROSELER et al., 1993). Higginbotham et al. (1989a,b) demonstraram aumento de 2,6 mg/dL do N uréico no sangue, em vacas alimentadas com dietas isonitrogenadas e isocalóricas, quando aumentaram a PDR de 58 para 65% da PB da dieta.

O excesso de N ruminal e pós ruminal é eliminado pelo mesmo processo de síntese hepática de uréia. Deste modo, o excesso de proteína, quer seja esta PDR ou PNDR, irá elevar o NUP.

Fatores nutricionais e do animal que influenciam a variabilidade das concentrações de N uréico incluem peso vivo, produção de leite, conteúdo de PB na dieta, ingestão de proteína degradável, ingestão de matéria seca (MS) e a relação energia fermentável da dieta/ingestão de MS (BRODERICK; CLAYTON, 1997).

A velocidade com que os teores de amônia plasmática elevam-se depende, sobretudo, da taxa de liberação do nitrogênio no rúmen. A uréia proveniente da dieta tem exatamente a característica de prover liberação bem rápida deste nitrogênio, independente da fonte de carboidrato presente na dieta (fibra ou amido), elevando também rapidamente as concentrações de amônia e, posteriormente, da uréia no plasma (SINCLAIR et al., 2000a).

O pico da uréia no plasma ocorre entre 1,5 a 2,0 horas após o pico da concentração da amônia no rúmen e de 2,0 a 4,0 horas após a ingestão do alimento (GUSTAFSSON; PALMQUIST, 1993).

As dosagens do NUP (nitrogênio uréico plasmático) ou do NUL (nitrogênio uréico no leite) constituem uma informação útil para o estudo das relações entre metabolismo protéico da dieta e eficiência reprodutiva (BUTLER, 2004). Em muitos estudos, o aumento das concentrações de NUP ou NUL teve relação com a

diminuição da fertilidade em vacas leiteiras, tanto em rebanhos criados em confinamento como a pasto (LARSON et al., 1997; BUTLER, 1998; WESTWOOD et al., 1998; LAVEN; DREW, 1999; WITTEWER et al., 1999).

Ao estudar os possíveis efeitos tóxicos da amônia em novilhos, Fernandez et al. (1988) relataram que a hiperglicemia observada durante a hiperamonemia pode ser resultado de uma sub-utilização da glicose pelos tecidos sensíveis à insulina. Estes autores acreditam que esta hiperglicemia é decorrente da redução na relação entre insulina:glucagon, estimulando a gliconeogênese, assim como a glicogenólise. A concentração de glicose sanguínea está inversamente relacionada à mobilização de gordura corporal armazenada, assim, quando a concentração de glicose encontra-se normal, a concentração de ácidos graxos não-esterificados é baixa (SWENSON; REECE, 1996). Contudo, esta supressão da insulina pode estar sendo causada pela diminuição na taxa de ingestão de alimento e não diretamente pela hiperamonemia, mas estes dados são bastante inconsistentes na literatura (SINCLAIR et al., 2000a).

2.5 Efeitos da uréia sobre o consumo de alimentos

Kenny et al. (2002a), quando forneceram 240 g/dia de uréia para novilhas de corte, observaram redução na ingestão diária de matéria seca. Conrad et al. (1977) também demonstraram redução no apetite de vacas recebendo elevadas quantidades de NNP. Geralmente, altos níveis de amônia plasmática não resultam necessariamente em diminuição da ingestão diária, mas estão associados com menor taxa de ingestão/hora e redução do tamanho do primeiro bocado (KÖSTER et al., 1997). Sinclair et al. (2000a) também encontraram redução no tamanho do bocado quando novilhas receberam dietas geradoras de alta concentração de amônia plasmática.

Os mecanismos que modificam o comportamento de ingestão não estão bem estabelecidos, mas é provável que sejam operados no sistema nervoso central como resposta ao rápido aumento dos níveis de amônia plasmática após a alimentação. Uma possibilidade é que a excessiva amônia no plasma atravesse a barreira

hemato-encefálica, inibindo a ação excitatória de aminoácidos sobre o sistema nervoso central, o glutamato e o aspartato, que são intermediários do metabolismo da amônia no cérebro e poderosos estimulantes de apetite por ação no hipotálamo, além do glutamato ser co-expressado com o neuropeptídeo Y (NPY), outro poderoso estimulante do apetite (SINCLAIR et al., 2000a).

Logo, esta modificação no padrão de consumo de alimentos torna-se um mecanismo que os ruminantes utilizam, já que não há descrição de mecanismo metabólico compensatório, para tentar controlar os níveis de amônia no plasma, mesmo que de forma insuficiente. Também é possível que o efeito depressivo da inclusão da uréia na ingestão de MS seja resultado da redução da aceitabilidade da dieta (KENNY et al., 2002a).

2.6 Excesso de PB na dieta e efeitos adversos na reprodução

A concepção e o estabelecimento da gestação representam uma evolução ordenada de eventos e processos interligados no interior do aparelho reprodutivo: o desenvolvimento folicular resultando na ovulação, a fertilização do oócito, o transporte e o desenvolvimento do embrião, o reconhecimento materno da gestação e a implantação no útero (BUTLER, 2004). Desbalanços na nutrição materna, especialmente no metabolismo do nitrogênio, durante os períodos de crescimento do oócito e/ou fertilização podem predispor o zigoto, o embrião pré-implantado ou o concepto a falhas no seu desenvolvimento (POWELL et al., 2006).

Vários trabalhos têm mostrado os efeitos da concentração de proteína bruta e sua relação com a reprodução, principalmente, de vacas leiteiras. A alta produção leiteira em vacas é dependente de altos níveis de proteína como também de energia na dieta (BUTLER, 2000). Dietas com excesso de proteína resultam em altas concentrações de uréia no sangue, leite ou urina. Altas concentrações de uréia endógena tem sido associadas à queda da fertilidade (FERGUSON; CHALUPA, 1989; BUTLER, 1998), redução na disponibilidade de energia, poluição ambiental (TAMMINGA, 1992) e perdas econômicas.

O NRC (1989) recomenda que vacas leiteiras de alta produção devam receber dietas com 17 a 18% de PB, 35% de PNDR e 65% de PDR. Mas alguns

estudos têm sugerido que níveis iguais ou maiores que estes podem causar efeitos deletérios na fertilidade (FERGUSON; CHALUPA, 1989; BUTLER et al., 1996; RHOADS et al., 2004).

Ferguson e Chalupa (1989), ao revisarem trabalhos sobre o impacto da nutrição protéica sobre a reprodução, observaram que o aumento de PB na dieta aumenta o número de serviços por concepção, assim como o número de dias vazios, na maioria dos trabalhos estudados.

Da mesma forma, a comparação entre dietas contendo 15,5% e 21,8% de PB, sendo este aumento proveniente da incorporação de uréia na alimentação de novilhas holandesas, demonstrou diminuição da taxa de concepção ao primeiro serviço de 82 para 61% (ELROD; BUTLER, 1993).

Vacas alimentadas com excesso de PB (23,1%) têm o intervalo parto-concepção em média 15,1 dias mais longo do que vacas recebendo nível moderado de PB (19,3%). Seguindo a mesma tendência, também ocorre aumento do intervalo parto-primeira cobertura em 9,3 dias no grupo tratado com maior PB (McCORMICK et al., 1999). Achados similares foram reportados por Jordan e Swanson (1979), que encontraram aumento linear no intervalo parto-concepção (de 69 para 106 dias) quando a proteína dietética aumentou de 12,7 para 19,3%.

Entretanto, o alto nível de PB na dieta não é o principal responsável pela baixa fertilidade apontada nestes trabalhos. McCormick et al. (1999) reportaram em vacas holandesas em lactação recebendo dietas com alto teor de PB (23,1%) ou moderado teor de PB (19,3%), menor taxa de prenhez à primeira cobertura (24,1 vs. 41,0%) e menor taxa de prenhez total (53,4 vs. 75,4%) nas vacas alimentadas com alta PB. Entretanto, quando estes autores compararam dietas de PB semelhantes (17,7 vs. 17,2%), mas de degradabilidades ruminais diferentes, não houve diferenças na taxa de prenhez, mas houve aumento na perda embrionária no grupo com maiores teores de PDR.

Decréscimos na taxa de concepção, aumento no número de dias em serviço e aumento no número de serviços por concepção têm sido relatados em vacas leiteiras alimentadas com excesso de PDR (BUTLER et al., 1996). Da mesma forma, Ferguson et al. (1986), assim como Folman et al. (1973), acreditam que a degradabilidade da proteína utilizada está incluída entre os vários fatores que influenciam o desempenho reprodutivo. Ferguson e Chalupa (1989) demonstraram

que o tipo, assim como a quantidade de proteína na alimentação, explicam muito das variações na taxa de concepção.

Os altos níveis de PDR são associados com alterações na fisiologia ovariana e uterina, resultando em uma insuficiência luteal e perda embrionária (decréscimos de até 20% na taxa de prenhez) quando o NUP e o NUL ultrapassam os 19 mg/dL (BUTLER et al., 1996).

Rajala-Schultz et al. (2001), ao estudarem a relação entre a quantidade de NUL e a fertilidade de vacas leiteiras, demonstraram que o aumento de NUL está negativamente relacionado à fertilidade do rebanho e associado a um menor risco de detecção de prenhez.

Concentrações de NUL maiores que 21 mg/dL foram associados com retorno ao estro 21 dias após a cobertura (LARSON et al., 1997). Mais recentemente, um grande estudo de campo sugeriu que a taxa de prenhez diminuiu com níveis de NUL ainda menores (15,4 mg/dL), onde as vacas com concentrações de NUL abaixo de 10 mg/dL são duas vezes e meia mais prováveis de serem detectadas prenhes do que vacas com concentrações acima de 15,4 mg/dL (RAJALA-SCHULTZ et al., 2001).

Elrod e Butler (1993), separando taxas de concepção por faixas de NUP em novilhas, encontraram nas faixas < 9,9, de 9,9 a 16, e > 16 mg/dL, 87,5, 72,5 e 42,8% de taxa de concepção, com as menores taxas associadas as maiores concentrações de NUP.

Além da quantidade de PDR na dieta, outro fator direto que causa elevação nas concentrações do NUP é a falta de sincronia entre a velocidade de degradação do nitrogênio e da fermentação da energia no rúmen (KENNY et al., 2002a; TAMMINGA, 2006). Sinclair et al. (2000a), ao estudarem a relação entre fonte de carboidrato na dieta [fibra (F) ou amido (A)] e sincronia de liberação de energia e nitrogênio no rúmen [sincronia (S) ou assincronia (A)], observaram que nas novilhas que receberam fibra e com assincronia de liberação apresentaram maiores concentrações de NUP do que nos outros grupos (21,4 vs. 18,9, 18,6 e 18,3 mg/dL para F-A, A-S, A-A e F-S, respectivamente). Já as concentrações de amônia plasmática foram significativamente bem maiores nos grupos com assincronia da liberação de nitrogênio, independentemente da fonte de carboidrato.

Um mecanismo proposto para a possível influência negativa da PB sobre a fertilidade é que o excesso de PB ingerida desencadeie aumento na concentração

de N uréico no rúmen, assim como no sangue e em outros órgãos, devido a característica da uréia de difundir-se rapidamente em todos os tecidos, inclusive no útero, oviduto e ovários, resultando em efeitos tóxicos no espermatozóide, óvulo e no desenvolvimento embrionário (JORDAN; SWANSON, 1979; CHALUPA, 1984; ELROD; BUTLER, 1993; ELROD et al., 1993).

Por outro lado, com a proximidade do parto em vacas leiteiras, há uma elevação abrupta da demanda metabólica pelos nutrientes acumulados (reservas corporais e massa fetal) e rápida metabolização do estoques de lipídios e proteínas para suportar o repentino aumento da produção leiteira (BAUMAN; CURRIE, 1980). Este rápido aumento nas exigências resulta no balanço energético negativo (BEN) que se inicia poucos dias antes do parto e alcança seu ponto mais negativo aproximadamente duas semanas após o parto (BUTLER; SMITH, 1989; BELL, 1995). A extensiva mobilização de gordura em animais com acentuado BEN causa efeitos danosos sobre a função do fígado devido ao acúmulo de ácidos graxos não-esterificados (AGNEs) de cadeia longa, prejudicando a detoxificação da amônia em uréia (TAMMINGA, 2006). Além disso, o BEN pode ser exacerbado pela alta PB na dieta devido ao alto custo energético da detoxificação da amônia que escapa do rúmen (STAPLES et al.², 1993; apud BUTLER, 1998, p. 7).

A grande inconsistência e pouca repetibilidade dos efeitos reprodutivos do excesso de PDR nesses trabalhos podem dever-se aos diferentes balanços energéticos dos animais entre os estudos e não ao efeito direto do excesso de PB na dieta (BUTLER, 2000).

2.7 Alta concentração de NUP e ambiente uterino

O bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez depende do ambiente uterino. O ambiente luminal uterino é dinâmico, com diferenças marcantes de secreção durante o ciclo estral, devido à regulação dos esteróides ovarianos. No

²STAPLES, 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. **Proceeding...** Gainesville: University of Flórida, 1993. p. 37-51.

início da prenhez, a sinalização local dos blastocistos modifica ainda mais o ambiente uterino e induz a secreção de proteínas específicas pelo epitélio uterino (MCRAE³, 1984; apud BUTLER, 2004, p. 102). Ainda, Hammon et al. (1997) afirmaram que a maturação e a fertilização do oócito bem como o desenvolvimento inicial do embrião são modulados pelo seu microambiente, que é bastante influenciado pela ingestão do nitrogênio dietético.

Relação positiva entre a ingestão de PB e a concentração de N uréico no trato reprodutivo, semelhantemente ao que ocorre com a concentração no plasma, leite e urina, foi demonstrada por Carroll et al. (1988). Neste experimento foi demonstrada diferença na concentração de N uréico no muco vaginal entre os animais que recebiam dietas com baixo e alto teor de PB (8,2 vs. 20,9 mg/dL, respectivamente). Jordan et al. (1983), Holtz et al. (1986) e Johnson et al. (1986) também observaram que o aumento da ingestão de PB desencadeava aumento do N uréico no trato reprodutivo.

Sinclair et al. (2000b) encontraram maior concentração de amônia no fluido folicular em novilhas recebendo dietas geradoras de alta amônia ruminal (267 vs. 205 nmol/mL) do que nas novilhas que receberam dietas com baixa geração de amônia ruminal. Adicionalmente, a concentração da amônia no fluido folicular é maior que a concentração de amônia no plasma. Já a concentração da mesma no fluido folicular é inversamente relacionada ao tamanho do folículo (HAMMON et al., 2000a; SINCLAIR et al., 2000b).

Hammon et al. (2005) encontraram maiores teores de amônia (339,0 vs. 93,9 $\mu\text{mol/L}$) e de nitrogênio uréico (22,4 vs. 17,0 mg/dL) no fluido folicular em vacas com alto NUP (>20 mg/dL) do que nas com menor NUP (<20 mg/dL) no dia do estro (dia 0). Além disso, os autores encontraram alta correlação entre o NUP e o nitrogênio uréico no fluido folicular ($r^2 = 0,86$). Em outro experimento promovido pelos mesmos autores e com os mesmos grupos experimentais, observaram maiores teores de nitrogênio uréico no fluido uterino no dia 0 (26,9 vs. 20,4 mg/dL) e no dia 7 (26,5 vs. 21,4 mg/dL) no grupo com alto NUP e também obtiveram maiores teores de amônia no fluido uterino no dia 7 (1562 vs. 1082 $\mu\text{mol/L}$), mas não no dia 0, no grupo do alto NUP. McEvoy et al. (1997) também encontraram maiores concentrações de amônia

³ MCRAE, A. C. The blood-uterine lumen barrier and its possible significance in early embryo development. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v. 6, p. 129-173, 1984.

no fluido uterino de ovelhas recebendo dieta com uréia comparando-as com a dieta controle.

Hammon et al. (2005) encontraram associação entre a alta concentração do NUP e maior concentração de amônia no fluido uterino no dia 7, mas não no dia 0 (dia do estro). Entretanto, estes dados não são conclusivos em relação ao aumento de PB na dieta e comprometimento no desempenho reprodutivo. Carroll et al. (1988) relataram que as vacas que conceberam ou não ao primeiro serviço apresentavam semelhante concentração de N uréico no plasma (16,2 vs. 16,7 mg/dL), assim como no trato reprodutivo (15,3 vs. 16,3 mg/dL).

A elevada concentração de amônia nos fluidos reprodutivos pode ser um dos fatores que afetam o desenvolvimento embrionário e resultam em diminuição da eficiência reprodutiva (MCEVOY et al., 1997; HAMMON et al., 2005). Apesar da concentração da amônia e/ou uréia nos fluidos reprodutivos ser relacionado à ingestão de proteína e aos níveis de NUP, o mecanismo exato responsável pelas elevadas concentrações de amônia e/ou uréia nos fluidos folicular e uterino é desconhecido.

Outras investigações têm demonstrado uma ligação entre altos níveis de amônia e pobre desenvolvimento embrionário *in vitro* em alguns meios de cultivo (GARDNER; LANE, 1993; GARDNER et al., 1994). A presença de amônia em meio de cultivo *in vitro* tem efeito danoso sobre a fisiologia e a bioquímica do embrião. Entretanto, o estágio em que o embrião é mais sensível a este efeito é desconhecido (ZANDER et al., 2006).

Alguns autores afirmam que a uréia impede o desenvolvimento do embrião por atuar durante a maturação dos oócitos e não após a fertilização (DE WIT et al., 2001; OCON; HANSEN, 2003). Os níveis de uréia utilizados foram os mesmos que reduzem a fertilidade em vacas (BUTLER et al., 1996; BODE et al., 2001). A uréia também acelera a eclosão dos blastocistos, o que poderia provocar assincronia entre o embrião e o ambiente uterino (BUTLER, 2004).

Gardner e Lane (1993) reportaram que a amônia reduziu a formação de blastocistos e diminuiu o número de células de embriões de camundongos produzidos *in vitro*. Em um trabalho posterior, relataram que a amônia no meio de cultivo de embriões reduziu a implantação, retardou o crescimento fetal e induziu exencefalia fetal em embriões de camundongos (LANE; GARDNER, 1994).

Sinclair et al. (2000b) relataram que, na realização de cultivo de oócitos *in vitro*, a taxa de clivagem e a produção de blastocistos foram reduzidas quando os oócitos eram derivados de novilhas que receberam dietas com maior taxa de liberação de amônia ruminal. Além disso, poucos blastocistos foram produzidos da clivagem de oócitos provenientes de folículos de tamanho médio (>4 – 8 mm) das novilhas ofertadas com essa dieta.

Hammon et al. (2000b), utilizando produção de embriões *in vitro*, demonstraram que a exposição de embriões bovinos a concentrações de amônia maiores do que 88 $\mu\text{mol/L}$ resultou em retardo no desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto. Da mesma forma, Gardner e Lane (1993) observaram redução do número de células de blastocistos em moderadas concentrações de amônia (75 $\mu\text{mol/L}$) em embriões de camundongos FIV. Ocon e Hansen (2003) também observaram que concentrações de 21 mg/dL de uréia em meios de maturação, diminuí a proporção de oócitos que desenvolvem-se até o estágio de blastocisto.

Hammon et al. (2000b) afirmaram ainda que o efeito da amônia sobre a viabilidade do oócito de bovinos *in vitro* depende do momento e da duração da exposição e da concentração da amônia utilizada.

Armstrong et al. (2001) observaram que o aumento da concentração de uréia no plasma diminuiu a qualidade dos oócitos. Estes concluíram ainda que os efeitos negativos da elevação da uréia sistêmica eram evidentes, principalmente durante a maturação do oócito, assim como na fertilização.

Allegrucci et al. (2005) sugeriram que o período de crescimento do oócito anterior ao estabelecimento da responsividade dos folículos antrais ao FSH (hormônio folículo estimulante) é importante ao determinar a expressão do gene que codifica o IGF2R (Receptor do fator de crescimento ligado à insulina tipo II) e, além disso, pode ser sensível ao metabolismo do nitrogênio materno. Elevadas concentrações de uréia plasmáticas em ovelhas causaram alterações no desenvolvimento de embriões pré-implantados, interação entre diferentes tipos de sistema de cultivo embrionário *in vitro* e subsequentes taxas de prenhez e influenciaram a expressão de um importante gene, codificador do IGF2R em tecidos fetais. A falha na expressão deste gene é bastante relatado em embriões manipulados *in vitro* (POWELL et al., 2006).

Zander et al. (2006) afirmaram que uma curta exposição de embriões à amônia durante o estágio de pré-compactação, especialmente entre zigoto e duas células, pode resultar em significantes distúrbios na posterior expressão gênica e desenvolvimento do feto e isto indica que a amônia pode causar uma mudança irreversível no embrião.

Já Hammon et al. (2000a), pesquisando o efeito de várias concentrações de amônia (de 29 a 356 $\mu\text{mol/L}$) em meios de maturação de oócitos durante 24 horas, não encontraram diferenças significativas na taxa de clivagem, no número de ovos degenerados, no desenvolvimento de mórulas e blastocistos, ou no desenvolvimento dos blastocistos expandidos e eclodidos.

Foram pesquisados os efeitos do consumo elevado de proteína no desenvolvimento inicial do embrião em vacas leiteiras. Vacas lactantes superovuladas (40-60 dias pós-parto) receberam dietas que resultaram em NUP elevado ($> 19 \text{ mg/dL}$) ou intermediário ($< 19 \text{ mg/dL}$) e os embriões foram coletados 7 dias após a insmeinação artificial (IA) (RHOADS et al., 2006). Os embriões foram transferidos para novilhas leiteiras receptoras também alimentadas com dietas com elevadas ou intermediárias concentrações de NUP, mas com “status” energético positivo. A taxa de prenhez foi menor nas receptoras após a transferência dos embriões coletados das vacas com elevado NUP em comparação as com NUP intermediário (11% vs. 35%, respectivamente).

McEvoy et al. (1997) recuperaram embriões com menor desenvolvimento (menor número de células) de ovelhas recebendo dietas com 30 g diárias de uréia do que nas ovelhas que receberam 15 ou 0 g/dia de uréia. Além disso, Berardinelli et al. (2001), alimentando ovelhas com ingestão em excesso de PDR, encontraram impedimento do transporte do embrião pelo útero, sendo a maioria dos embriões encontrados na ampola. Depois disso, o transporte e desenvolvimento do embrião no oviduto foi acelerado.

Laven et al. (2002) não encontraram efeitos sobre a taxa de prenhez em animais com elevadas concentrações de NUP após o estabelecimento da prenhez.

Esses resultados indicam que os efeitos prejudiciais das elevadas concentrações de NUP ocorrem antes do dia 7 (considerando que a ovulação ocorre entre o dia 0 e o dia 1), podendo afetar o desenvolvimento dos oócitos nos folículos ovarianos ou durante o desenvolvimento e transporte do embrião pelo oviduto (BUTLER, 2004; RHOADS et al., 2006).

Um possível mecanismo para explicar a associação entre elevado NUP e diminuição da eficiência reprodutiva foi proposto por Rhoads et al. (2004), que afirmaram que o aumento do NUP, provocado pela infusão intravenosa de uréia por um curto espaço de tempo, pode afetar diretamente o ambiente uterino por provocar diminuição do pH uterino durante a fase luteal do ciclo estral. Bode et al. (2000) infundindo uréia pela via intravenosa também encontraram redução do pH uterino após 12 horas em vacas lactantes. Eldor e Butler (1993) e Elrod et al. (1993) relataram que o excesso de PDR diminuiu significativamente o pH uterino no dia 7 do ciclo estral, porém não encontraram diferença durante o estro. Esses resultados indicam claramente que as concentrações de NUP de 12 a 24 mg/dL são capazes de afetar diretamente a função uterina (BUTLER, 2004).

Além disso, estudos *in vitro* com cultivos de células endometriais bovinas têm demonstrado que a uréia altera o gradiente do pH e aumenta a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, que pode interferir com o desenvolvimento do embrião e sua viabilidade (BUTLER, 1998). Entretanto, Rhoads et al. (2004) não encontraram alterações na concentração de prostaglandina no fluido uterino recuperado em vacas recebendo infusão intravenosa de uréia.

Alteração da composição iônica do fluido uterino durante a fase luteínica do ciclo estral, mas não no estro, também foi relatada como um possível efeito deletério do excesso de proteína na alimentação (JORDAN et al., 1983). Neste estudo, houve diminuição dos íons Mg, K e PO_4 na mucosa uterina durante a fase luteínica em vacas alimentadas com 23% de PB. Ainda, o menor pH uterino pode ser resultante de uma inibição da anidrase carbônica presente no endométrio, a qual é sensível a alterações na sua composição iônica (ROWLETT et al., 1991).

Kenny et al. (2002b) encontraram elevadas concentrações de uréia no plasma e no fluido coletado do oviduto, após vacas primíparas terem recebido infusões de uréia por 420 min, mas não observaram efeito da infusão de uréia sobre as concentrações dos íons Mg, Na ou K, obtidas do fluido do oviduto, havendo alteração apenas na concentração do íon Ca que se apresentou diminuída e tendo correlação negativa ($r = -0,68$) com a concentração de uréia plasmática. Estes autores afirmam ainda que os resultados encontrados por Jordan et al. (1983) podem ter sido prejudicados pela utilização de cateterização crônica dos ovidutos, exteriorização da cânula pelo fato do fluido estar sendo coletado por vários dias ou

semanas, provavelmente trazendo artefatos e/ou causando perdas nos constituintes do fluido.

A relação entre o NUP e o pH uterino indica que mesmo dietas com teores relativamente baixos de PDR podem influenciar o ambiente uterino, quando as concentrações de NUP elevam-se, resultando em toxicidade aos gametas ou embriões e diminuindo a eficiência reprodutiva (ELROD et al., 1993; HAMMON et al., 2005).

A diminuição do pH uterino no dia 7 do ciclo estral, como reportado por Elrod e Butler (1993), em vacas alimentadas com alta proteína pode explicar, em parte, a elevação da amônia nos fluidos uterinos de vacas com alto NUP (HAMMON et al., 2005). Elrod e Butler (1993) reportaram que a excreção urinária de amônia, mas não a de uréia, foi elevada em vacas alimentadas com alta proteína. Logo, sugerem que a glutamina, um carreador não-tóxico e de alta afinidade pela amônia circulante (e também de qualquer grupo de aminoácidos) tenha relação com a elevada concentração de amônia na urina. A função da glutamina é transportar a amônia para o fígado para a síntese da uréia e para outros tecidos para biossíntese de aminoácidos. Além disso, a glutamina é uma importante fonte de energia para um grande número de células, incluindo oócitos (KIRSHER; BAVISTER, 1998), embriões no estágio de blastocisto (HE et al., 2007) e pré-implantados (GARDNER, 1998). Fahning et al.⁴ (1967; apud HAMMON et al., 2005, p. 10) demonstraram que a concentração de glutamina nos fluidos uterinos, mas não na circulação, de vacas eram três vezes menores durante os dias 5 a 7 do ciclo estral, comparado ao dia 1, sugerindo que a glutamina é utilizada pelo tecido uterino na fase inicial do diestro do ciclo estral. Neste período, há evidências que a glutamina pode ser utilizada pelos tecidos reprodutivos, podendo resultar em liberação de grandes quantidades do íon amônio nos fluidos reprodutivos e circulação e, grande parte, é excretada na urina (DIMSKI, 1994). Dessa forma, a glutamina pode agir com um carreador de amônia em vacas com altos teores de NUP e que a utilização da glutamina no útero pode servir como fonte do íon amônio nos fluidos uterinos destas vacas (HAMMON et al., 2005).

Como a ionização da amônia é pH dependente, uma diferença no pH entre os dois compartimentos fluidos pode criar um gradiente de amônia transformando-a no

⁴FAHNING, J. D.; SCHULTZ, R. H.; GRAHAM, E. F. The free amino acid content of the uterine fluids and blood serum in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, n. 2, p. 229-236, 1967.

íon amônio dentro do compartimento fluido (no caso, fluido uterino) com menor pH (VISEK, 1984; MARTINELLE; HÄGGSTRÖM, 1993). A diferença entre o pH do sangue (7,39) e do fluido uterino (6,85) em vacas com elevada concentração de NUP pode contribuir para o acúmulo do íon amônio no ambiente uterino durante a fase luteal do ciclo estral.

Por outro lado, esta mudança no pH uterino poderia ser resultado da mudança na razão amônia/amônio nos fluidos uterinos. Um aumento do íon amônio relativamente à amônia no fluido uterino durante a fase luteal resultaria na diminuição do pH (HAMMON et al., 2005).

Vários estudos demonstraram decréscimo do desempenho reprodutivo quando do aumento do teor de proteína na dieta (JORDAN; SWANSON, 1979; CLAYPOOL et al., 1980; EDWARDS et al., 1980; FOLMAN et al., 1981; KAIM et al., 1983; FERGUSON et al., 1986; ELROD; BUTLER, 1993; BUTLER et al., 1996; RAJALA-SCHULTZ et al., 2001; RHOADS et al., 2006). O mesmo não foi relatado por outros autores (HOLTZ et al., 1986; HOWARD et al., 1987; CARROL et al., 1988; GATH et al., 1999; KENNY et al., 2002a; DAWUDA et al., 2004).

Um estudo do rebanho de Michigan não encontrou associação entre a utilização de uréia na alimentação e a eficiência reprodutiva em gado leiteiro (RYDER et al., 1972).

A uréia *per se* pode não ser o fator causal, ou pode ser que os problemas de fertilidade sejam dependentes da natureza do padrão diário de consumo da PDR (SINCLAIR et al., 2000a).

Concordando com este pressuposto, Dawuda et al. (2004) encontraram que, apesar das vacas do grupo com excesso de proteína rapidamente degradável no rúmen terem maiores níveis de uréia plasmática comparando-as com as do grupo controle, não houve efeitos do excesso de uréia durante 17 dias sobre parâmetros reprodutivos e metabólicos mensurados. Não houve diferenças nem no número de vacas que ovularam nem no número de folículos pequenos (<5,0mm) e de médio a grandes (>5,0mm) e, também, não houve diferenças nas concentrações de P4, E2, LH (hormônio luteinizante), GH (hormônio do crescimento), insulina e IGF-1 (fator de crescimento ligado à insulina tipo I) entre os grupos estudados.

Larson et al. (1997) propuseram que altas concentrações de NUL no momento da inseminação das vacas podem causar falhas na fertilização ou perda embrionária antes do reconhecimento materno da prenhez. Enfatizando esta

proposta, Dawuda et al. (2002) ao fornecerem dietas com 250 g diárias de uréia durante sete (iniciado no dia da inseminação) ou dezessete dias (iniciado 10 dias antes da inseminação), recuperaram menor número de embriões por vaca e menor quantidade total de embriões no grupo de tempo mais curto de oferecimento da uréia.

Dawuda et al. (2004) afirmaram que a redução da fertilidade associada com o aumento da ingestão de nitrogênio somente ocorre se a ovulação, inseminação e implantação ocorrer dentro de 10 dias do aumento da ingestão de proteína. Passados mais de 10 dias, a ovulação normal e posterior fertilização podem ser restabelecidas na presença de alta ingestão de proteína, talvez porque algum eventual efeito tóxico da proteína seja prevenido como resultado de adaptação homeostática promovida pelo animal.

Laven et al. (2004) sugerem que vacas leiteiras podem se adaptar aos aumentos do nitrogênio rapidamente degradável no rúmen se este aumento ocorrer por pelo menos 10 dias antes da inseminação. Entretanto, estas dietas podem causar redução da fertilidade quando introduzidas em períodos críticos, por exemplo, quando são inseminadas, mas não há redução quando introduzido em estágios mais iniciais (LAVEN et al., 2007).

Esta hipótese pode ser confirmada pelos estudos que não encontraram relação entre alta PB na dieta e infertilidade em bovinos, onde o período de fornecimento das dietas experimentais foi por 120 dias (KENNY et al., 2001), 50 dias (KENNY et al., 2002a), 47 dias (GATH et al., 1999) ou 17 dias (DAWUDA et al., 2002).

Esta mesma opinião não é compartilhada por Sinclair et al. (2000a), onde afirmam que não houve indícios de nenhum mecanismo de adaptação metabólica significativa à dieta geradora de altos níveis de amônia plasmática em novilhas, durante as quatro semanas de período experimental.

Hammon et al. (2000b) afirmaram que é possível que curtos períodos de exposição à amônia durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial modulem o metabolismo embrionário. McEvoy et al. (1997) hipotetizaram que o micro-ambiente uterino contendo elevadas concentrações de amônia pode contribuir para a reprogramação do embrião durante os estágios mais iniciais do desenvolvimento embrionário.

2.8 Efeitos do alto NUP sobre os hormônios reprodutivos

Níveis mais altos de progesterona no plasma minimizam alguns efeitos adversos do NUP sobre a fertilidade após a inseminação artificial (IA) em vacas leiteiras (BUTLER et al., 2001).

Larson et al. (1997) encontraram valores maiores de NUL (23,3 mg/dL) em vacas com baixos valores de progesterona no dia 21 após a IA (< 2,0 ng/mL). Essa observação está em conformidade com a idéia de que os efeitos persistentes do BEN, como a menor concentração de progesterona no plasma, podem aumentar a sensibilidade do útero à uréia (BUTLER et al., 2001), além de que o desenvolvimento embrionário é associado com alta progesterona (MAURER; ECHTERNKAMP, 1982).

Como resultado da alta ingestão de proteína bruta, o aumento do NUP pode interferir com a indução das ações da progesterona sobre o microambiente uterino e, desse modo, causar condições sub-ótimas para suportar o desenvolvimento embrionário (BUTLER, 2001).

McCormick et al. (1999) encontraram diminuição nas concentrações de progesterona do dia 5 ao dia 15 pós-IA (5,97 vs. 9,31 ng/mL, respectivamente) em vacas recebendo dietas com alto teor de PB (23,1%) comparado ao grupo com teores moderados de PB (19,3%). Já Garcia-Bojalil et al. (1998) tiveram como achados em ovários de vacas holandesas alimentadas com dietas contendo 11,1% de PDR maior número de corpos lúteos (CL) e CL de maior tamanho do que em vacas alimentadas com dietas com 15,3% de PDR. Essas diferenças na atividade do CL resultaram em picos de P4 de 8,1 ng/mL para vacas com baixo teor de PDR contrastando com 3,9 ng/mL para as vacas do grupo com alto PDR.

Jordan et al. (1983) propõem que a alta concentração de N uréico ou de amônia sistêmicos podem levar à diminuição na ligação entre o LH e seus receptores ovarianos, desencadeando um decréscimo na concentração de progesterona no plasma, assim como queda da fertilidade.

Contrariamente, a concentração plasmática de progesterona aumentou, entre o dia 4 e dia 11 (dia 0 = estro), em novilhas recebendo dietas geradoras de alta

amônia ruminal, quando comparada às novilhas recebendo dietas geradoras de baixa amônia ruminal (SINCLAIR et al., 2000b). Da mesma forma, Berardinelli et al. (2001) obtiveram uma mudança de concentração de progesterona do dia 3 ao dia 5 mais rápida e alcançando maior concentração no dia 5 pós-cobertura em ovelhas recebendo dietas com alta PB em relação a ovelhas recebendo a dieta controle (moderada PB).

Já Rhoads et al. (2004), infundindo uréia por via intravenosa em vacas no dia 7 após o estro, não encontraram diferenças na concentração plasmática de progesterona em comparação com as vacas que receberam infusão de solução salina.

Alterações no eixo hipotalamo-hipófise-ovário são bastante inconsistentes na literatura e não parecem ser responsáveis por muito dos efeitos da proteína na reprodução (DAWUDA et al., 2002; DAWUDA et al., 2004).

É importante ressaltar que a baixa fertilidade de vacas reflete a combinação de efeitos de um ambiente uterino que é dependente de progesterona, mas com rendimento sub-ótimo por ação de um balanço energético negativo ou problemas pós-parto que são acentuados pelo efeito da uréia resultante da ingestão da alta proteína dietética (BUTLER, 1998).

Neste contexto, insere-se o presente trabalho procurando isolar o efeito da alta PB na dieta sobre a eficiência reprodutiva, sendo o primeiro estudo a utilizar vacas da raça Nelore a pasto para testar a hipótese de que o fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral irá causar diminuição na produção, qualidade e no grau de desenvolvimento de embriões provenientes de fêmeas bovinas superovuladas.

3 OBJETIVOS

Objetivou-se neste trabalho verificar os efeitos da utilização de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas superovuladas na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões e concentrações sistêmicas de N uréico, glicose, insulina e progesterona.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

Este trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pólo Regional Extremo Oeste, localizada no município de Andradina (SP). Foram utilizadas sessenta e oito vacas da raça Nelore não-gestantes e não-lactantes com escore de condição corporal de 7,56 ($\pm 0,92$) (1 = magra; 9 = gorda), pesando 557,6 ($\pm 101,1$) kg, as quais foram mantidas em piquetes providos de cochos e bebedouros com pastagem da espécie *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, sendo os blocos formados em função do grupo de colheita de embriões. Foram formados 3 períodos de colheita, o primeiro foi composto por 19 animais, o segundo com 20 e o último, com 29 animais. Os três tratamentos foram casualizados entre os animais de cada período.

4.2 Tratamentos

Foram formulados dois concentrados experimentais iso-energéticos, com diferentes quantidades e degradabilidades da proteína bruta (PB). A dieta controle possuía teor de PB de 12,0% e teor de PDR de 70% da PB. A dieta com NNP possuía maior teor de PB (14,6%) e de PDR (76%), onde parte da PB era uréia, equivalente à adição de 100 g/vaca diários (Tabela 1).

De acordo com a época do fornecimento do concentrado com NNP foram formados mais dois grupos experimentais. O primeiro grupo recebeu o concentrado NNP nos cinco dias que antecedem o dia 0 do protocolo de superovulação, do dia -5 ao dia 0, onde o dia 0 é o dia da inseminação. O segundo grupo recebeu o

concentrado NNP durante cinco dias, iniciado no dia 0 do protocolo de superovulação, ou seja, do dia 0 ao dia 5.

Logo, os animais foram distribuídos em três tratamentos:

- Controle (C);
- Uréia antes do dia 0 (UA) e
- Uréia depois do dia 0 (UD).

Todos os animais foram alojados no dia -8 em um piquete (piquete 1) com área de 13,5 hectares e pastagem do tipo *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Tabela 2) e começaram a receber 3,0 kg/dia do concentrado controle (Tabela 3), distribuídos em dois fornecimentos, um pela manhã e o outro à tarde. No dia -5, as vacas do tratamento UA foram deslocadas para outro piquete (piquete 2, com o mesmo tipo de pasto do primeiro), com área de 9,2 hectares e, passaram a receber 3,0 kg/dia do concentrado teste (Tabela 3) até o dia 0. Neste dia, os animais do tratamento UA voltaram ao piquete 1 e os animais do tratamento UD foram deslocados para o piquete 2, permanecendo neste até o dia 5. Ao final deste dia, as vacas do tratamento UD foram transferidas para o piquete 1.

A única diferença entre as dietas foi a inclusão de uréia nos concentrados dos tratamentos UA e UD (100g de uréia/animal/dia) nos dias referidos, sendo que nos outros dias, todos os animais receberam o mesmo concentrado do grupo controle.

A dieta controle foi formulada para garantir o nível de manutenção de proteína degradável no rúmen, enquanto que a dieta NNP possuía 1,25 vezes o nível de manutenção de PDR (NRC, 1996). Quanto ao nível de energia nas dietas, ambas eram isocalóricas.

Ao fim de cada tratamento foram realizadas análises bromatológicas das dietas. Após a determinação da matéria seca (MS) a 65°C, as amostras foram moídas em moinho tipo “Wiley” providos de peneiras de 1 mm. As amostras moídas foram utilizadas para determinação de matéria orgânica (MO), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB) de acordo com AOAC (1990). As determinações de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foram realizadas de acordo com Van Soest et al. (1991) e de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) de acordo com Goering e Van Soest (1970).

O consumo de matéria seca (CMS) médio diário de pastagem foi estimado, assumindo-se que os animais são capazes de ingerir 1% do peso vivo em FDN

proveniente da forragem, logo utilizando o FDN obtido da pastagem (Tabela 2) o CMS médio de pastagem por animal foi de 7,63 kg/dia.

Tabela 1 – Proporções de ingredientes utilizados (estimados) e composição bromatológica das dietas, com base na matéria seca

Ingredientes (%)	Dietas	
	Controle	NNP
Pastagem estimada	74,06	74,06
Milho moído	9,20	8,23
Farelo de soja	14,13	14,13
Uréia (45%)	--	0,97
Calcário calcítico	0,48	0,48
Sal branco	0,19	0,19
Mistura Mineral ¹	1,94	1,94
Composição		
PB (%)	12,0	14,6
PDR (% PB)	70,0	76,0
PNDR (% PB)	30,0	24,0
FDA (%)	29,3	29,3
FDN (%)	56,2	56,1
EE (%)	1,6	1,6
EM ² (Mcal/kg MS)	2,2	2,2
EL _L ³ (Mcal/kg MS)	1,4	1,4
NDT ⁴ (% MS)	56,1	56,0

¹Composição por kg de mistura mineral: 180g Ca, 90g P, 20g Mg, 20g S, 100g Na, 3.000mg Zn, 1.000mg Cu, 1.250mg Mn, 2.000mg Fe, 200mg Co, 90mg I, 36mg Se, 900mg F (máximo).

²Energia metabolizável. ³Energia líquida de lactação. ⁴Nutrientes digestíveis totais.

Tabela 2 – Composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

	Composição
Matéria seca (%)	35,63
FDN (%)	72,79
FDA (%)	38,00
PB (%)	4,78
Extrato Etéreo (%)	1,48

Tabela 3 – Proporções de ingredientes utilizados e composição bromatológica dos concentrados, com base na matéria seca

Ingredientes (%)	Concentrados	
	Controle	NNP
Milho moído	35,45	31,72
Farelo de soja	54,48	54,48
Uréia (45%)	--	3,73
Calcário calcítico	1,87	1,87
Sal branco	0,75	0,75
Mistura Mineral ¹	7,46	7,46
Composição		
PB (%)	32,6	42,8
PDR (% PB)	84,4	88,1
PNDR (% PB)	15,6	11,9
FDA (%)	4,6	4,5
FDN (%)	8,7	8,4
EE (%)	2,1	1,9
EM ² (Mcal/kg MS))	3,2	3,1
EL _L ³ (Mcal/kg MS))	2,1	2,0
NDT ⁴ (% MS)	74	71

¹Composição por kg de mistura mineral: 180g Ca, 90g P, 20g Mg, 20g S, 100g Na, 3.000mg Zn, 1.000mg Cu, 1.250mg Mn, 2.000mg Fe, 200mg Co, 90mg I, 36mg Se, 900mg F (máximo).

²Energia metabolizável. ³Energia líquida de lactação. ⁴Nutrientes digestíveis totais.

4.3 Período experimental

Ao mesmo tempo do início da sincronização de seu ciclo estral, os animais passaram a receber a dieta experimental. As vacas tiveram seu ciclo estral sincronizado, foram superovuladas e inseminadas. A colheita de embriões foi realizada sete dias após a primeira inseminação, ou seja, 16 dias após o início do fornecimento das dietas experimentais. No fim de cada período experimental realizou-se a colheita de embriões.

4.4 Sincronização do ciclo estral com superovulação e inseminação em tempo fixo

O protocolo de sincronização e superovulação utilizado foi o descrito por Baruselli et al. (2006), iniciado no dia -8 (D-8) com a colocação do implante vaginal contendo 1,0g de progesterona (Crestar®, Intervet, Brasil), seguido pela injeção por via intramuscular (im) de 2,0mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet, Brasil). Entre o dia -4 (D-4) e o dia -1 (D-1) foram administradas, via im, doses decrescentes de FSH (Pluset®, IF Serono, Itália) pela manhã e à tarde, totalizando 250 UI de FSH por animal. O implante vaginal de progesterona foi retirado ao mesmo tempo da última aplicação de FSH (D-1). No dia -2 (D-2) foi administrado 2ml via im de Preloban® (150µg de D-cloprostenol; Intervet, Brasil) simultaneamente à administração de Pluset pela manhã e 1ml à tarde. Oito dias após o início da sincronização, ou seja, no dia 0 (D0), foram administrados 2,5ml de Fertagyl® (via im, 25mg de GnRh; Intervet, Brasil) pela manhã. Neste mesmo dia, 12 horas após a aplicação do indutor de ovulação (Fertagyl), foi realizada a primeira inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No outro dia pela manhã (D1), realizou-se a segunda inseminação artificial. O sêmen utilizado era de um mesmo doador, proveniente e foi utilizado apenas um inseminador para todas as fêmeas.

4.5 Colheita de sangue para determinação de parâmetros séricos e plasmáticos

Todos os animais tiveram seu sangue colhido, antes da alimentação (0h), 3 e 6 horas após a alimentação, nos dias D-5, D0 e D5. As determinações de NUP e glicose plasmática foram realizadas nas nove amostras coletadas de cada animal, enquanto que as determinações de progesterona e insulina foram realizadas apenas nas amostras colhidas anteriormente à alimentação.

As colheitas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular utilizando-se tubos a vácuo com EDTA, para posterior avaliação de NUP e glicose, e tubos a vácuo seco com a finalidade de determinação de insulina e progesterona no soro. Imediatamente após a colheita foi realizada a separação do plasma ou soro sangüíneo por centrifugação (2000g) durante 20 minutos. As amostras de plasma, assim como as de soro, foram congeladas em tubos do tipo “ependorf”, logo após a centrifugação.

Para a determinação da glicose plasmática foi utilizado o método enzimático colorimétrico, descrito por Trinder (1969) e Henry et al. (1974), utilizando kit comercial (CAT n° 02200, Laborlab®) adaptado para leitura em tubos no aparelho do tipo Espectrofotômetro (Quick Lab, Drake®), com comprimento de luz de 500 nanômetros.

Para a determinação do nitrogênio uréico plasmático foi utilizado o método enzimático colorimétrico, descrito por Henry (1968) e Hallet e Cook (1971), utilizando kit comercial (CAT n° 02800, Laborlab®) adaptado para leitura em tubos no aparelho do tipo Espectrofotômetro (Quick Lab, Drake®), com comprimento de luz de 620 nanômetros.

A concentração de progesterona sérica foi determinada em duplicata, pela técnica de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se o kit comercial CAC em fase sólida (Progesterone Coat-a-Count®, Diagnostics Products Co., Los Angeles, CA, USA). Foram utilizados dois controles de qualidade, os padrões do kit nas concentrações de 0,1 ng/mL e 20 ng/mL, em duplicata, ao início e fim de cada ensaio. O coeficiente de variação médio aceito dentro do ensaio foi de até 5% entre as determinações.

A concentração sérica de insulina foi estabelecida pela técnica de radioimunoensaio, utilizando o kit comercial CAC em fase sólida (Insulina Coat-a-Count®, Diagnostics Products Co., Los Angeles, Ca, USA). Foram utilizados dois controles de qualidade, os padrões do kit nas concentrações de 15 μ UI/mL e 100 μ UI/mL, em duplicata, ao início e fim de cada ensaio. O coeficiente de variação médio aceito dentro do ensaio foi de até 5% entre as determinações.

4.6 Colheita e análise dos embriões

A colheita dos embriões foi realizada por método não-cirúrgico no sétimo dia após a inseminação (D7) (SEIDEL; SEIDEL, 1991). As colheitas ocorreram usando-se sonda de Foley (no. 18 ou 20, Rusch, Inglaterra) esterilizada acoplada a equipo em Y (Nutricell, Brasil). Mil mililitros de solução DPBS (Dmpbs Flush®, Nutricell, Brasil), divididos em três fluxos de aproximadamente 350 ml, foram utilizados para as lavagens uterinas. A lavagem era direcionada a filtros coletores (Milipore, EUA) que retiam os embriões recuperados.

Depois, realizava-se a lavagem dos filtros coletores com solução DPBS e este lavado era armazenado em placas de petri 100 X 20.

O rastreamento dos embriões foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10X e a classificação embrionária utilizando-se aumento de 40X. Os embriões coletados foram analisados morfológicamente quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento.

A avaliação morfológica dos embriões foi realizada segundo o protocolo descrito por Stringfellow e Seidel (1998).

Primeiro observou-se o estágio de desenvolvimento embrionário, classificando-os da seguinte forma:

- 1) Não fecundado e zigoto – estrutura contendo uma única célula;
- 2) Mórula compacta – blastômeros fortemente agregados, formando massa compacta, ocupando 60 a 70% do espaço perivitelínico;
- 3) Blastocisto inicial – embrião que começou a formar a cavidade (pequena blastocele), ocupando 70 a 80% do espaço perivitelínico;
- 4) Blastocisto – Blastocele com tamanho aumentado;
- 5) Blastocisto expandido – diâmetro médio do embrião aumentado sensivelmente, com diminuição simultânea da espessura da zona pelúcida, desaparecendo o espaço perivitelínico;

Em seguida os embriões foram classificados quanto à qualidade:

- 1) Viáveis – Mórula compacta + blastocisto inicial + blastocisto + blastocisto expandido;

- 2) Inviáveis – Embriões degenerados
- 3) Fecundados – Embriões viáveis + embriões degenerados;
- 4) Não fecundados;
- 5) Estruturas recuperadas – Fecundados + Não-fecundados.

As diferentes classificações foram expressas como número total e em porcentagens sobre o total de estruturas recuperadas, sobre o total de embriões fecundados e sobre o total de embriões viáveis.

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2001) sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo Teste de Hartley (OTT, 1993). Os dados (variável dependente) que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$] ou quadrática [$\text{RQ}(X+1/2)$]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância que separou como causas de variação efeito de tratamento e efeito de período de colheita (Tabela 4). Os efeitos de tratamento foram separados através de dois contrastes ortogonais. Tal análise foi realizada utilizando-se o procedimento General Linear Model (PROC GLM do SAS).

O primeiro contraste ortogonal foi denominado de efeito da inclusão da uréia na dieta e foi representado da seguinte forma, C vs. (UA + UD).

O segundo contraste ortogonal, definido como o efeito do momento de inclusão da uréia na dieta, foi representado como UA vs. UD.

As análises referentes aos valores das variáveis sanguíneas (glicose, insulina, nitrogênio uréico no plasma, progesterona) foram realizadas conforme descrito anteriormente, porém foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de colheita (Tabelas 5). As probabilidades das interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e

tratamentos forem significativas. Para tal foi utilizado o comando SLICE do GLM do SAS. Quando significativo, estudou-se efeito de tratamento dentro do tempo pelo teste de média Tukey.

Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

Tabela 4 – Esquema de análise de variância para delineamento em blocos

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamentos	2
Contraste 1	(1)
Contraste 2	(1)
Períodos	2
Resíduo A	63
Total de Unidades Experimentais	67

Tabela 5 – Esquema de análise de variância para delineamento em blocos com as medidas repetidas no tempo (0, 3 e 6h)

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamentos	2
Períodos	2
Resíduo A	63
Total de Unidades Experimentais	67
Tempos	2
Interação Tempo x Tratamento	4
Interação Tempo x Período	4
Resíduo B	126
Total de Sub-unidades Experimentais	203

5 RESULTADOS

As concentrações de NUP nos dias -5, 0 e 5 estão expressos na tabela 6. Houve efeito significativo de interação entre as diferentes horas de colheita e os tratamentos nos dias -5 ($P = 0,0044$) e 0 ($P < 0,0001$), mas não no dia 5 ($P = 0,1923$). Houve efeito significativo das horas de colheita nos dias -5 ($P < 0,0001$), 0 ($P < 0,0001$) e 5 ($P = 0,0028$). Além disso, houve efeito significativo de interação entre os dias de colheita e os tratamentos ($P = 0,0005$) e efeito significativo do dia de colheita ($P < 0,0001$), entretanto, não houve efeito do tratamento no modelo estudado ($P = 0,3919$). Adicionalmente, houve efeito significativo de tratamento nos valores médios de NUP no dia -5 ($P = 0,0007$), no dia 0 ($P = 0,0010$) e no dia 5 ($P = 0,0022$). No dia -5, o tratamento UA apresentou a maior concentração de NUP, diferindo estatisticamente do tratamento UD, mas não do C. No dia 0, o tratamento UA continuou sendo o de maior valor, só que diferindo do C, mas não do UD. Já no dia 5, o tratamento UD passou a possuir a maior concentração de NUP, diferindo somente do UA.

Tabela 6 – Concentração de nitrogênio uréico plasmático (NUP) em mg/dL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas

Dias	Horas	Tratamentos			Média	CV (%)	Probabilidade
		C	UA	UD			
D-5	0h	15,51	15,61	13,97	15,02	37,9	0,4890
	3h	16,87 ^{ab}	18,45 ^a	14,78 ^b	16,70	46,3	0,0688
	6h	16,14 ^{ab}	19,10 ^a	14,66 ^b	16,64	40,6	0,0055
	Média	16,18 ^{ab}	17,72 ^a	14,47 ^b	16,12	42,1	0,0007
D0	0h	17,97 ^b	23,03 ^a	18,93 ^{ab}	20,01	34,5	0,0134
	3h	19,75	23,31	22,16	21,77	32,4	0,1238
	6h	19,14	21,79	22,35	21,12	33,3	0,1314
	Média	18,95 ^b	22,71 ^a	21,15 ^{ab}	20,97	33,4	0,0010
D5	0h	20,35	18,68	21,00	20,00	28,6	0,1117
	3h	20,72 ^{ab}	19,19 ^b	22,45 ^a	20,79	30,8	0,0421
	6h	21,74	19,35	21,09	20,71	31,3	0,2485
	Média	20,93 ^a	19,08 ^b	21,51 ^a	20,50	30,2	0,0022

^{a,b}Médias com sobrescritos diferentes na mesma linha diferem pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os teores de glicose nos dias -5, 0 e 5 estão apresentados na tabela 7. Não houve efeito significativo de interação entre as diferentes horas de colheita e os tratamentos nos dias -5 ($P = 0,5044$), 0 ($P = 0,8248$) e 5 ($P = 0,2176$). Houve efeito significativo do tempo de colheita nos dias -5 ($P = 0,0233$) e 5 ($P < 0,0001$), mas não no dia 0 ($P = 0,2599$). Não houve efeito significativo de interação entre o dia de colheita e os tratamentos ($P = 0,9394$) e nem efeito de tratamento no modelo em estudo ($P = 0,5448$). Entretanto, houve efeito significativo do dia de colheita das amostras ($P = 0,0008$).

Tabela 7 – Teores de glicose em mg/dL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas

Dias	Horas	Tratamentos			Média	CV (%)	Probabilidade
		C	UA	UD			
D-5	0h	55,05	48,23	51,02	51,37	37,9	0,5644
	3h	50,42	45,39	48,17	47,94	35,7	0,6962
	6h	42,94	45,65	44,12	44,27	30,3	0,7503
	Média	49,47	46,43	47,77	47,86	29,7	0,8248
D0	0h	51,26	48,03	53,11	50,75	36,8	0,3907
	3h	50,66	45,61	47,65	47,93	34,4	0,6076
	6h	48,45	44,34	48,29	46,97	31,5	0,5418
	Média	50,13	46,00	49,68	48,55	31,0	0,4255
D5	0h	54,07	50,02	55,66	53,18	41,0	0,1737
	3h	57,26	52,12	53,72	54,32	44,7	0,6205
	6h	60,55	59,19	57,93	59,22	34,8	0,9929
	Média	57,29	53,78	55,77	55,57	38,8	0,6652

Os teores de insulina nos dias -5, 0 e 5 estão expressos na tabela 8. Não houve efeito significativo de interação entre o dia de colheita e os tratamentos ($P = 0,6147$). Entretanto, houve efeito significativo do dia de colheita ($P < 0,0001$) sobre os teores de insulina. Não houve efeito significativo de tratamento nos dias (D-5, D0 e D5) e nem no modelo estudado ($P = 0,9913$).

Tabela 8 – Teores de insulina em $\mu\text{UI/mL}$ nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas

Dias	Tratamentos			Média	CV (%)	Probabilidade
	C	UA	UD			
D-5	14,17	14,85	12,37	13,82	62,7	0,8013
D0	12,69	10,16	10,51	11,10	60,3	0,8137
D5	19,52	18,80	18,92	19,07	74,0	0,7348

Os valores encontrados para a variável progesterona estão na tabela 9. Não houve efeito significativo de interação entre os dias de colheita e os tratamentos ($P = 0,0623$), contudo, houve efeito significativo do dia de colheita ($P < 0,0001$). Não houve efeito significativo de tratamento nos dias (D-5, D0 e D5) e nem do modelo de estudo ($P = 0,7161$).

Tabela 9 – Teores de progesterona em ng/mL nos dias -5, 0 e 5 com respectivas médias, coeficientes de variação (CV) e probabilidades estatísticas

Dias	Tratamentos			Média	CV (%)	Probabilidade
	C	UA	UD			
D-5	1,40	0,56	0,92	0,95	110,8	0,0830
D0	0,18	0,25	0,27	0,24	79,8	0,5175
D5	10,59	10,76	6,36	9,27	107,5	0,2615

Como pode ser observado na tabela 10, não houve efeito significativo da inclusão de uréia na dieta na maioria das variáveis estudadas. O número de estruturas totais por animal não foi afetado por nenhum dos três tratamentos. Da mesma forma, o número absoluto de estruturas fecundadas e não-fecundadas e a porcentagem de ambos em relação ao total de estruturas recuperadas não foi afetada pela inclusão da uréia na dieta. Entretanto, houve efeito significativo da inclusão de uréia na relação mórulas compactas sobre o total de estruturas recuperadas ($C = 62,3$ vs. $UA = 51,4$ e $UD = 15,3\%$; $P = 0,0132$) e na relação mórulas compactas sobre o total de embriões viáveis ($C = 76,9$ vs. $UA = 68,8$ e $UD = 38,6\%$; $P = 0,0134$).

Tabela 10 – Número médio de estruturas recuperadas e sua classificação em números absolutos, porcentagens em relação ao total de estruturas recuperadas, fecundadas e viáveis, coeficientes de variação (CV, em %) e probabilidades dos contrastes ortogonais (C_1 e C_2)

Estruturas/animal	Tratamentos			Média	CV	Probabilidade	
	C	UA	UD			C_1^a	C_2^b
Total estruturas ^c (n ^o) ^d	3,15	3,72	4,10	3,66	114,3	0,5850	0,4632
Total fecundados ^e (n ^o)	2,35	2,75	2,48	2,52	126,0	0,8394	0,2282
(% total) ^f	82,2	75,3	50,7	68,5	58,6	0,1229	0,0678
Não-fecundados (n ^o)	0,91	1,00	1,83	1,26	181,5	0,1138	0,3206
(% total)	17,8	24,7	49,3	31,5	127,3	0,1229	0,0678
Viáveis ^g (n ^o)	2,24	2,48	2,00	2,24	126,0	0,8595	0,4472
(% total)	75,8	73,2	39,4	61,8	66,0	0,2872	0,0522
(% fecundados) ^h	85,5	89,4	87,1	87,4	28,5	0,2868	0,3101
Inviáveis ⁱ (n ^o)	0,43	0,23	0,52	0,39	213,0	0,5825	0,5738
(% total)	6,4	2,2	11,3	6,6	250,0	0,2540	0,3324
(% fecundados)	14,5	10,6	12,9	12,6	198,2	0,3505	0,9110
Mórula Compacta (n ^o)	1,86	1,90	0,91	1,56	155,7	0,4403	0,3541
(% total)	62,3	51,4	15,3	41,6	101,9	0,0132	0,0117
(% fecundados)	65,8	62,5	30,6	54,5	77,0	0,0961	0,0472
(% viáveis) ^j	76,9	68,8	38,6	63,5	64,3	0,0134	0,0184
Blastocisto Inicial (n ^o)	0,41	0,57	0,87	0,62	183,5	0,5385	0,3400
(% total)	12,2	17,8	17,3	16,0	180,5	0,8491	0,4837
(% fecundados)	18,5	21,2	32,3	23,4	148,7	0,5746	0,1392
(% viáveis)	21,8	22,9	42,0	27,7	139,9	0,5512	0,1592
Blastocisto (n ^o)	0,14	0,13	0,43	0,24	375,3	0,8044	0,1864
(% total)	1,2	4,0	6,8	4,2	313,3	0,5824	0,3343
(% fecundados)	1,2	5,8	15,5	7,0	270,9	0,4024	0,2108
(% viáveis)	1,4	8,3	19,4	8,8	270,8	0,3749	0,2469
Blastocisto Expandido (n ^o)	0,00	0,43	0,30	0,25	587,9	0,3391	1,0000
(% total)	0,0	2,0	1,1	1,2	532,2	0,4009	0,9692
(% fecundados)	0,0	3,7	2,0	2,0	476,2	0,3362	0,9115
(% viáveis)	0,0	4,5	2,4	2,3	467,2	0,3268	0,9541

^a C_1 = Primeiro Contraste Ortogonal: efeito da inclusão de uréia [C vs. (UA + UD)]; ^b C_2 = Segundo Contraste Ortogonal: efeito do momento da inclusão de uréia (UA vs. UD); ^c Total de estruturas recuperadas = Oócitos fecundados + Não-fecundados; ^d Número absoluto; ^e Total de estruturas recuperadas = Embriões viáveis + Inviáveis; ^f Porcentagem sobre o total de estruturas recuperadas por animal; ^g Viáveis = Mórula Compacta + Blastocisto Inicial + Blastocisto + Blastocisto Expandido; ^h Porcentagem sobre o total de estruturas fecundadas por animal; ⁱ Inviáveis = Embriões degenerados; ^j Porcentagem sobre total de estruturas viáveis por animal.

Quanto ao momento de inclusão da uréia na dieta não foi possível observar efeito significativo sobre o número total de estruturas recuperadas por animal, sobre o número absoluto de estruturas fecundadas e sobre o número de embriões viáveis. Entretanto, houve efeito do momento de inclusão da uréia na relação estruturas fecundadas sobre o total de estruturas recuperadas (UA = 75,3 vs. UD = 50,7%; $P = 0,0678$) e na relação embriões viáveis sobre o total de estruturas recuperadas (UA = 73,2 vs. UD = 39,4%; $P = 0,0522$). O tratamento UD acarretou na redução de 32,7% na relação estruturas fecundadas sobre o total de estruturas recuperadas e de 46,2% na relação embriões viáveis sobre o total de estruturas recuperadas, quando comparado ao tratamento UA e, da mesma maneira, acarretou na perda de 38,3% na relação estruturas fecundadas sobre o total de estruturas recuperadas e de 52,0% na relação embriões viáveis sobre o total de estruturas recuperadas, quando comparado ao tratamento C. Adicionalmente, houve efeito significativo do momento de inclusão da uréia na dieta sobre a relação mórulas compactas sobre o total de estruturas recuperadas (UA = 51,4 vs. UD = 15,3%; $P = 0,0117$), em relação ao total de estruturas fecundadas (UA = 62,5 vs. UD = 30,6%; $P = 0,0472$) e em relação ao número de embriões viáveis (UA = 68,8 vs. UD = 38,6%; $P = 0,0184$).

Estes efeitos significativos devem-se, principalmente, a menor relação mórulas compactas sobre o total de estruturas recuperadas e sobre o total de embriões viáveis do tratamento UD, já que os tratamentos C e UA possuem estes valores bastante semelhantes. Isto é comprovado pelos efeitos encontrados, onde as relações mórulas compactas sobre o total de estruturas, sobre o total de estruturas fecundadas e sobre o total de embriões viáveis do tratamento UD são menores, devido a maior relação estruturas não-fecundadas sobre o total de estruturas recuperadas, menor relação estruturas fecundadas sobre o total de estruturas recuperadas e menor relação embriões viáveis sobre o total de estruturas recuperadas deste tratamento. Da mesma forma, pode ser atribuído o efeito do momento de inclusão da uréia na relação mórulas compactas sobre o total de estruturas fecundadas.

6 DISCUSSÃO

A uréia é um metabólito da proteína dietética que é formada pela detoxificação da amônia pelo fígado. O nível de uréia no plasma ou no soro (NUP ou NUS) é reflexo da quantidade e da degradabilidade da proteína consumida, da severidade do balanço energético negativo, ou, ainda da combinação da proteína consumida e do balanço energético negativo (ELROD; BUTLER, 1993). Além disso, a concentração de NUP é dependente da sincronização da velocidade de degradação da proteína e de fermentação da energia no rúmen (KENNY et al., 2002a; TAMMINGA, 2006).

Após a degradação da PDR, o pico de amônia ruminal é seguido por um pico no NUP, de 2 a 3 horas depois, lembrando que o pico do NUP ocorre de 4 a 6 horas após a ingestão do alimento. Entretanto, o pico do NUP é aplainado quando comparado ao pico da amônia ruminal (TAMMINGA, 2006). No presente trabalho, houve efeito significativo do momento da colheita (antes, 3 e 6 horas pós-alimentação) nos dias -5 ($P < 0,0001$), 0 ($P < 0,0001$) e 5 ($P = 0,0028$), sendo que os valores de NUP foram variáveis, dependendo do dia de colheita e do tratamento, com os maiores valores localizando-se na 3ª ou 6ª hora após o oferecimento das dietas.

Elrod e Butler (1993) quando excederam em 50% os níveis de exigência de PDR em novilhas holandesas obtiveram aumento na concentração de NUP de 10,2 mg/dL para 14,8 mg/dL.

No presente estudo, houve um excesso de 25% sobre os níveis de exigência de PDR na dieta contendo NNP na forma de uréia, enquanto a dieta controle atendia as exigências. As concentrações médias (hora 0, 3 e 6) de NUP no dia -5 foram 16,18; 17,72 e 14,47 mg/dL, para os tratamentos C, UA e UD, respectivamente. Este foi o primeiro dia que os animais do tratamento UA passaram a receber o concentrado com maior PB (14,6%), refletindo-se na maior concentração de NUP deste tratamento. Entretanto, este diferiu apenas do tratamento UD, que, neste dia, recebia a dieta controle.

No dia 0, as concentrações médias de NUP foram 18,95; 22,71 e 21,15 mg/dL, para os tratamentos C, UA e UD, respectivamente. Este foi o último dia que

as vacas do tratamento UA receberam o concentrado com maior PB e o primeiro dia que as vacas do tratamento UD passaram a receber o concentrado com maior PB. Como pode ser observado, o tratamento UA diferiu do controle, enquanto o tratamento UD não diferiu significativamente de nenhum dos outros tratamentos.

No dia 5, os valores médios encontrados do NUP foram 20,93; 19,08 e 21,51 mg/dL, para os tratamentos C, UA e UD, respectivamente. Neste dia, o tratamento UD era o único que recebia o concentrado com maior PB e era o último dia de oferecimento deste concentrado. Entretanto, o aumento da PB oferecida ao tratamento UD não causou diferença significativa em relação ao controle, mas apenas em relação ao tratamento UA.

McEvoy et al. (1997), fornecendo dietas com 0, 15 e 30 g de uréia para ovelhas, encontraram valores de NUP de 5,6; 14,4 e 20,0 mg/dL, respectivamente. Semelhantemente, Kenny et al. (2002a), fornecendo 0 ou 240 g de uréia para novilhas de corte, obtiveram 11,4 e 25,4 mg/dL de NUP, respectivamente. Sinclair et al. (2000a), utilizando dietas isoprotéicas (15% de PB) variando apenas a taxa de liberação de nitrogênio no rúmen, encontraram 16,1 e 19,7 mg/dL em novilhas com dietas com baixa e alta liberação, respectivamente. Kenny et al. (2001), utilizando novilhas de corte a pasto com concentrações alta ou baixa de nitrogênio no pasto, obtiveram concentrações de NUP de 18,7 e 7,9 mg/dL, respectivamente.

Alguns autores têm reportado que a alta ingestão de PB, resultando em elevações na uréia e na amônia sistêmicas, está associada com o aumento na glicose plasmática (VISEK, 1984; MCEVOY et al., 1997), enquanto outros não encontraram efeito da alta ingestão de PB sobre esta variável em novilhas de corte a pasto (KENNY et al., 2001) ou confinadas (KENNY et al., 2002a; KENNY et al., 2002b), em novilhas (SINCLAIR et al., 2000a) ou em vacas leiteiras (JORDAN et al., 1983; BLAUWEIKEL; KINCAID, 1986). A hiperglicemia tem sido associada com elevados níveis sistêmicos de amônia em bovinos (FERNANDEZ et al., 1988,1990). Fernandez et al. (1990) sugeriram que a alta glicose sistêmica induzida pela hiperamonemia pode ser mediada pela menor utilização da glicose em tecidos periféricos ou, talvez, através do aumento da glicogenólise. Além disso, concentrações de glicose plasmática acima de 90 mg/dL são geralmente inibitórios para o desenvolvimento do embrião (THOMPSON, 1996) e isto pode dever-se ao fato da alta concentração de glicose interferir com a sinalização celular ou alterar o ciclo de Krebs (BOLAND et al., 2001). No presente trabalho, não houve influência do

aumento da PB na dieta sobre os teores de glicose plasmática, havendo apenas efeito dos diferentes tempos de colheita das amostragens (antes, 3 e 6 horas após a alimentação) nos dias -5 e 5, bem como efeito do dia de colheita, sendo que houve elevação dos teores plasmáticos de glicose entre o dia -5 e o dia 5. Kaneko (1989) afirma que a concentração de glicose de bovinos deve estar na faixa entre 45 e 75 mg/dL, sendo que este dado está em conformidade com o presente estudo, onde as concentrações de glicose ficaram entre 47 e 58 mg/dL.

Como no caso da glicose, há uma grande variabilidade entre os trabalhos documentando a relação entre ingestão de proteína e insulina sistêmica (LAVEN; DREW, 1999), com trabalhos encontrando concentrações elevadas (BLAUWEIKEL; KINCAID, 1986), reduzidas (SINCLAIR et al., 2000a) ou inalteradas (KENNY et al., 2001; KENNY et al., 2002b) em bovinos consumindo alta proteína dietética.

A insulina promove estímulos na proliferação de células da granulosa e da teca de bovinos, assim como na esteroidogênese *in vitro* (ADAMIAK et al., 2005).

Reduções na insulina sistêmica foram reportadas como associada à alta concentração sistêmica de amônia em alguns estudos (FERNANDEZ et al., 1990; SINCLAIR et al., 2000a). Esta redução pode ter sido mediado por efeitos inibitórios da amônia sobre as células β ou através da liberação de catecolaminas pelo pâncreas ou, ainda, pela diminuição do tamanho do bocado nos animais com alta amônia circulante (SINCLAIR et al., 2000a).

Neste trabalho, não foi encontrado nenhum efeito dos tratamentos sobre os teores séricos de insulina. Entretanto, houve efeito do dia de colheita, apresentando teores menores no dia 0, maior no dia 5 e intermediário no dia -5. Este comportamento assemelha-se ao da glicose, exceto no dia 0, que foi intermediário para a glicose e foi o menor para a insulina. As concentrações de insulina em todos os tratamentos do presente trabalho são consideradas entre baixa (por volta de 10 μ UI/mL) e moderada (por volta de 20 μ UI/mL) por Adamiak et al. (2005). Logo, parecem não ter relação alguma entre a insulina e os efeitos dos tratamentos sobre os dados referentes aos embriões.

No presente estudo, não houve efeito da inclusão nem do momento da inclusão da uréia na dieta sobre o total de estruturas recuperadas, total de embriões fecundados, total de oócitos não-fecundados, total de embriões viáveis e total de embriões degenerados (inviáveis).

Similares observações sobre a falta de mudanças na morfologia do embrião relacionadas com alto NUP foram feitas em outros estudos em vacas não-lactantes (GARCIA-BOJALIL, 1994) e lactantes (BLANCHARD et al., 1990; DAWUDA et al., 2002; RHOADS et al., 2006).

Blanchard et al. (1990) não obtiveram diferenças no número médio de ovos fecundados, não-fecundados, transferíveis e não-transferíveis coletados de vacas leiteiras alimentadas com 73 ou 64% de PDR. Gath et al. (1999) não encontraram efeitos na taxa de prenhez, no número de corpos lúteos e no número de embriões recuperados em novilhas de corte recebendo silagem de capim e concentrados ou silagem de capim, concentrados mais 250 g de uréia ou, ainda, palhada de trigo mais 250 g de uréia, apesar das diferentes concentrações do NUP (9,0, 13,8 e 20,0 mg/dL, respectivamente). Da mesma forma, Berardinelli et al. (2001) não encontraram efeito danoso da alta proteína na dieta de ovelhas sobre a taxa de embriões recuperados e de embriões degenerados. Ainda, Fahey et al. (2001) encontraram valores semelhantes no número de embriões recuperados por ovelha em ovinos não tratados e tratados com o acréscimo de uréia na dieta.

No presente estudo, houve efeito do momento de inclusão da uréia na dieta na relação total de oócitos fecundados sobre o total de estruturas recuperadas. O tratamento UD acarretou em menor capacidade de fecundação do oócito em relação ao tratamento UA (UD = 50,7 vs. UA = 75,3%), havendo redução de 32,7% na capacidade de fecundação do oócito em relação ao tratamento UA.

Reduções nas porcentagens de oócitos fecundados sobre o total de recuperados em animais recebendo dietas com alta PDR foram reportados em vacas superovuladas (BLANCHARD et al., 1990) e em ovelhas (BISHONGA et al., 1996).

Houve, também, efeito do momento de inclusão da uréia na dieta na relação total de embriões viáveis sobre o total de estruturas recuperadas. O tratamento UD apresentou menor relação embriões viáveis sobre o total de estruturas recuperadas do que o tratamento UA (UD = 39,4 vs. UA = 73,2%), apresentando, assim, redução de 46,2%. Entretanto, esta redução não é causada pela diminuição da viabilidade dos embriões do tratamento UD, mas, na verdade, é fruto da maior relação de não-fecundados sobre o total de estruturas recuperadas deste tratamento em relação aos demais (C = 17,8, UA = 24,7 e UD = 49,3%), que pode ser comprovada quando se analisa a relação embriões viáveis sobre o total de fecundados (C = 85,5, UA =

89,4 e UD = 87,1%), possuindo valores bem próximos. Isto indica que se o oócito foi fecundado, a chance de tornar-se viável é semelhante para todos os tratamentos.

Classicamente, concentrações de NUP acima de 19 mg/dL são associados com decréscimos no desempenho reprodutivo em vacas leiteiras (BUTLER et al., 1996; BUTLER, 1998; RHOADS et al., 2006).

Pode-se elencar quatro principais teorias envolvidas no contexto para explicar a associação entre alto NUP e baixo desempenho reprodutivo.

A primeira delas remete à relação entre a concentração de progesterona sistêmica e a alta PB na dieta. Jordan e Swanson (1979) foram os primeiros a relatarem diminuição da progesterona sistêmica em função da alta PB dietética. Estudos posteriores verificaram o mesmo fato (JORDAN et al., 1983; LARSON et al., 1997; BUTLER, 1998; MCCORMICK et al., 1999; BUTLER et al., 2001).

Sabe-se que a concentração plasmática de progesterona aumenta progressivamente com o passar dos três primeiros ciclos ovarianos durante o início da lactação em vacas leiteiras. Este aumento pode ser reduzido ou freado por efeitos do balanço energético negativo (BUTLER, 1998). O balanço energético negativo (BEN) pode ser exacerbado, quando vacas são alimentadas com excesso de PDR durante o início da lactação, devido ao alto custo energético de detoxificação da amônia que escapa do rúmen (STAPLES et al.¹, 1993; apud BUTLER, 1998, 7 p.). Além disso, a intensidade do BEN é relacionada inversamente com o tempo para a primeira ovulação pós-parto por atuar na inibição da secreção pulsátil de LH (BUTLER, 2000). Se o animal demora a ovular, não há formação de corpo lúteo e as concentrações de progesterona não se elevam, impedindo a realização de um ciclo fértil.

No presente trabalho, os efeitos danosos encontrados nos embriões não parecem estar ligados a progesterona sérica, já que não houve efeito de tratamento sobre essa variável. Este achado é condizente com uma série de trabalhos com novilhas de corte (KENNY et al., 2001; KENNY et al., 2002a; KENNY et al., 2002b), novilhas leiteiras (ELROD; BUTLER, 1993), vacas não-lactantes (BLAUWEIKEL e KINCAID, 1986; GARCIA-BOJALIL et al., 1994) e em ovelhas (MCEVOY et al., 1997), não encontrando nenhum efeito do alto NUP sobre a concentração sistêmica de progesterona.

Trabalhos recentes têm relacionado diminuição nos hormônios esteroidais circulantes com vacas em lactação (SANGSRITAVONG et al., 2002;

VASCONCELOS et al., 2003). Estes estudos associam alto consumo de MS e aumento no fluxo sanguíneo hepático em vacas leiteiras, aumentando o metabolismo dos hormônios esteróides tanto sexuais, quanto corticais. Em vacas leiteiras submetidas à alta ingestão de matéria seca, Sangsritavong et al. (2002) observaram maior taxa de fluxo sanguíneo, maior metabolismo (*clearance* hepático) e menor concentração plasmática de progesterona do que em vacas não-lactantes submetidas à mesma condição. Rabiee et al. (2001) mostraram que vacas não-lactantes submetidas à alta ingestão de matéria seca, *ad libitum* ou controlada, apresentaram decréscimo nos teores plasmáticos de progesterona. Alimentação aguda, promovida por prévio jejum de 12 horas, reduziu a circulação de progesterona em vacas prenhes e lactantes, aparentemente devido a aumento no metabolismo deste hormônio (VASCONCELOS et al., 2003).

Logo, há um confundimento bem grande nos resultados quando se relacionam vacas leiteiras em produção e níveis sistêmicos de progesterona. O presente trabalho buscou isolar o efeito da alta proteína dietética sobre o desempenho reprodutivo utilizando vacas não-lactantes e bem nutridas, estando provavelmente em balanço energético positivo. Assim, a observação de não haver efeito dos tratamentos sobre a concentração de progesterona permite inferir que o aumento da PDR nas dietas parece não ter efeito direto sobre a concentração de progesterona.

A segunda teoria, a mais difundida, é que a amônia e/ou a uréia alteram a atividade secretória uterina, causando mudanças nas concentrações iônicas (JORDAN et al., 1983) e no pH (ELROD; BUTLER, 1993; RHOADS et al., 2004) na fase luteal, mas não no estro.

Maiores concentrações de amônia e de uréia de meio coletado do ambiente útero-oviduto foram reportados por alguns trabalhos utilizando alta PB na dieta (MCEVOY et al., 1997; HAMMON et al., 2000a) ou infusão intravenosa de uréia (RHOADS et al., 2004). McEvoy et al. (1997) encontraram associação positiva entre a concentração de NUP e a concentração de uréia ($R^2 = 0,50$) e de amônia ($R^2 = 0,30$) do ambiente útero-oviduto. O aumento nas concentrações de amônia e/ou uréia nestes fluidos altera o gradiente do pH e aumenta a secreção de $PGF_{2\alpha}$, que pode interferir com o desenvolvimento do embrião e sua viabilidade (BUTLER, 1998). Adicionalmente, a alteração da composição iônica do fluido uterino durante a fase luteínica do ciclo estral, mas não no estro, acarreta na diminuição dos íons Mg,

K e PO_4 na mucosa uterina durante a fase luteínica em vacas alimentadas com 23% de PB. Ainda, o menor pH uterino pode ser resultante de uma inibição da anidrase carbônica presente no endométrio, a qual é sensível a alterações na sua composição iônica (ROWLETT et al., 1991). Entretanto, quanto à concentração iônica, Kenny et al. (2002b) não encontraram, com exceção do cálcio, alteração na composição do fluido do oviduto quando infundiram salina, uréia ou cloreto de amônia no oviduto de novilhas de corte por 420 min.

O pH uterino no dia 7 após o estro é de interesse porque se o oócito foi fertilizado, o embrião, neste dia, deverá estar dentro do lúmen uterino. Como a placentação ainda não ocorreu, o embrião do dia 7 é dependente das secreções uterinas para sobreviver (RHOADS et al., 2004). Ocon e Hansen (2003), cultivando oócitos em meio ácido por oito dias, onde o pH era próximo ao encontrado por novilhas e vacas alimentadas com excesso de PB (ELROD et al., 1993; ELROD; BUTLER, 1993), encontraram redução na taxa de clivagem e no desenvolvimento embrionário.

A terceira teoria é que o efeito danoso do alto NUP esteja restrito entre a fase de maturação do oócito e o desenvolvimento inicial do embrião. Segundo Rhoads et al. (2006), a diminuição da viabilidade embrionária pode ocorrer por efeitos exercidos sobre o oócito ou sobre o embrião antes do dia 7 da colheita de embriões. Semelhantemente, Fahey et al. (2001) afirmaram que o excesso de uréia na dieta afeta o desenvolvimento inicial do embrião em ovinos até o dia 4 pós-estro.

Dawuda et al. (2002) recuperaram menor número de embriões quando alimentaram vacas com excesso de PDR por 7 dias, iniciando a dieta com alta PDR no dia da inseminação (dia 0). Hammon et al. (2000b) afirmaram que o efeito da amônia sobre a viabilidade e desenvolvimento de embriões bovinos depende da concentração, da duração da exposição à amônia e do estágio de desenvolvimento embrionário quando da exposição. Estes mesmo autores (HAMMON et al., 2000a), encontraram maior concentração de amônia no fluido folicular de folículos pequenos (1 – 4 mm). Estes dados indicam que oócitos e células foliculares imaturas desenvolvem-se em um micro-ambiente que contém concentrações de amônia maiores que o da maioria das células somáticas.

Considerando, no presente trabalho, que a elevação do teor de PB do tratamento UD iniciou-se no dia 0 e permaneceu até o dia 5, pode-se inferir que o

efeito do alto NUP causando a falha na fecundação dos oócitos está restrito a este momento e é condizente com esta terceira teoria.

Estudos *in vitro* são os principais alicerces desta teoria. Altas concentrações de uréia ou amônia provocam impedimento da meiose durante a fase de maturação (DE WIT et al., 2001), diminuição da taxa de clivagem (HAMMON et al., 2000b; SINCLAIR et al., 2000b; OCON; HANSEN, 2003), redução do desenvolvimento ao estágio de blastocisto *in vitro* (GARDNER; LANE, 1993; LANE; GARDNER, 1994; HAMMON et al., 2000b; DE WIT et al., 2001) e da produção e da qualidade de embriões *in vivo* (DAWUDA et al., 2002).

De Wit et al. (2001), em meio de maturação de oócitos com uréia (16,9 mg/dL), observaram maior taxa de eclosão da vesícula germinal e melhor desenvolvimento para metáfase I, mas pior transição da metáfase I para telófase e transição da telófase para metáfase II. Isto resultou em menor porcentagem de oócitos em metáfase II, após 24 horas de maturação, sugerindo que a fase de maturação do oócito é bastante sensível a presença de uréia no meio.

Já a exposição do embrião à uréia após a fertilização não causou efeitos sobre o desenvolvimento, indicando que o embrião, por si só, foi capaz de resistir aos efeitos diretos da uréia (DE WIT et al., 2001; OCON; HANSEN, 2003).

Zander et al. (2006) afirmaram que embriões na fase inicial de clivagem (estágio de pré-compactação, entre zigoto e 2 células ou entre 2 e 8 células) são mais suscetíveis aos efeitos danosos da alta concentração de amônia e/ou uréia em seu micro-ambiente. Além disso, estes embriões apresentam altos níveis de apoptose e distúrbios no consumo de glicose.

O crescimento e o metabolismo de células da granulosa de folículos pequenos e médios de bovinos são alterados *in vitro* por concentrações de amônia similares aos encontrados nos fluidos foliculares e estes efeitos não são imediatamente reversíveis (ROOKE et al., 2004). A amônia causa diminuição na taxa de crescimento de células da granulosa, além de provocar aumento no metabolismo protéico celular. Este aumento no metabolismo protéico pode ser consequência da tentativa de manutenção da viabilidade celular com alta amônia no meio, desviando o ATP do crescimento para a manutenção celular. Esta redução na disponibilidade de ATP para células embrionárias ocorre durante o estágio de desenvolvimento em que a demanda energética pelo embrião é muito alta, resultando em menores proporções de oócitos maturados, menores proporções de zigotos clivados e

menores proporções de zigotos que clivaram, desenvolverem-se até o estágio de blastocisto (ROOKE et al., 2004).

Adicionalmente, estudos *in vitro* indicaram que a amônia pode alterar o pH intra-celular do oócito (BEN-YOSEF; SHALGI, 1998) ou alterar a atividade enzimática responsável por controlar rotas do metabolismo energético e protéico e a biossíntese dos ribonucleotídeos (SCHNEIDER et al., 1996). Efeitos menos diretos podem ocorrer devido a alterações na quantidade de esteróides dentro do folículo, o que pode influenciar a proporção de oócitos que alcançam a metáfase II (DRIANCOURT; THUEL, 1998) ou através da modificação de componentes intrafoliculares do sistema IGF que tem sido associado com dietas ricas em PB (ARMSTRONG et al., 1998).

A quarta teoria refere-se ao maior metabolismo e aceleração do crescimento do embrião reportado em alguns trabalhos (MCEVOY et al., 1997; HAMMON et al., 2000b; SINCLAIR et al., 2000b; BERARDINELLI et al., 2001)

Embriões obtidos de ovelhas alimentadas com excesso de PDR apresentaram-se metabolicamente mais ativos, mas tiveram menor taxa de sobrevivência (46 vs. 65%) (MCEVOY et al., 1997). Blastocistos gerados de folículos de tamanho médio de novilhas recebendo dietas geradoras de alta amônia ruminal apresentaram maior síntese protéica “de novo” (SINCLAIR et al., 2000b). Hammon et al. (2000b) obtiveram melhora no desenvolvimento embrionário quando a exposição às concentrações de amônia ocorreu somente na fase de fertilização do oócito *in vitro*. Berardinelli et al. (2001) obtiveram embriões com maior número de células entre o dia 2 e o dia 5 (dia 0 é o dia do estro) em ovelhas recebendo dietas com alta PB.

Além disso, o transporte inicial do embrião no oviduto pode ser alterado pela alta PB na dieta. Em ovelhas alimentadas com alta PB, o transporte do embrião pelo oviduto foi atrasado, sendo a maioria dos embriões encontrado na ampola e, no dia 5, foram rapidamente transportados para o corno uterino, levando muito menos tempo no istmo comparativamente com os embriões recuperados de ovelhas recebendo quantidade moderada de PB (BERARDINELLI et al., 2001).

No presente trabalho, houve efeito da inclusão da uréia na dieta nas relações mórulas compactas sobre total de estruturas recuperadas e sobre o total de embriões viáveis. Também houve efeito do momento da inclusão da uréia na dieta nas relações mórulas compactas sobre total de estruturas recuperadas, sobre o total

de oócitos fecundados e sobre o total de embriões viáveis. Estes efeitos, em ambos os casos, são causados pelas menores relações de mórulas compactas do tratamento UD em relação aos demais. Por exemplo, quando se analisa a relação de mórulas compactas sobre o total de embriões viáveis (C = 76,9, UA = 68,8 e UD = 38,6%) pode-se observar que esta menor proporção de mórulas do tratamento UD pode ter sido causado pelo aumento nas proporções de blastocistos iniciais (C = 21,8, UA = 22,9 e UD = 42,0%) e blastocistos (C = 1,4, UA = 8,3 e UD = 19,4%) sobre o total de viáveis do tratamento UD em relação aos demais tratamentos, embora não seja significativo para estas duas últimas relações. Com isso, conclui-se que pode ter havido um desenvolvimento embrionário mais acelerado do tratamento UD em relação aos demais.

Estes resultados são condizentes com a quarta teoria e podem ser associados com a suposição de Berardinelli et al. (2001). Estes autores postularam uma relação entre as mudanças que ocorrem no transporte do embrião pelo oviduto, desenvolvimento dos embriões e menor fertilidade. Alterações no desenvolvimento dos embriões causados pela alta PDR na dieta, ou seja, embriões mais maduros antes da entrada no útero, podem levar a uma assincronia entre mudanças uterinas e mudanças embrionárias necessárias para o reconhecimento materno da gestação e posterior desenvolvimento embrionário. Em tal estado, os embriões podem ser mais suscetíveis ao pH uterino adverso induzido pela alta concentração sistêmica de uréia.

Pode-se afirmar que o efeito negativo do alto NUP sobre a eficiência reprodutiva parece estar restrito entre a fase de maturação dos oócitos e o desenvolvimento inicial do embrião, ou seja, até o dia 7 (dia 0 = estro), sendo que, no presente trabalho, este efeito foi encontrado principalmente entre a fase de maturação e a fertilização do oócito. Além disso, os embriões que sofreram o efeito do alto NUP nesta fase parecem ter o desenvolvimento mais acelerado.

Os achados deste trabalho, falha na fecundação e desenvolvimento embrionário mais acelerado, podendo causar assincronia entre embrião e útero, por efeitos ocorridos entre o dia 0 e o dia 5 do ciclo, podem ser inclusos na responsabilidade pela diminuição do desempenho reprodutivo dos ruminantes reportados nos últimos 30 anos (JORDAN; SWANSON, 1979; JORDAN et al., 1983; BLANCHARD et al., 1990; BUTLER, 1996; ROBINSON, 1996; O'CALLAGHAN;

BOLAND, 1999; BUTLER, 2000; DAWUDA et al., 2002; POWELL et al., 2006; TAMMINGA, 2006).

Buscando uma explicação para estes efeitos, Laven et al. (2007) concluíram que vacas podem ser capazes de se adaptarem a dietas contendo alto nitrogênio. Entretanto, estas dietas podem causar redução da fertilidade quando introduzidas em períodos críticos, por exemplo, quando são inseminadas, mas não há redução quando introduzido em estágios mais iniciais. De Wit et al. (2001) sugeriram a adoção da prática de promover a redução da ingestão de proteína durante o período de inseminação para melhorar as taxas de concepção.

7 CONCLUSÃO

Como conclusão do presente estudo tem-se que o fornecimento de dieta contendo 100 g diárias de uréia, sem prévia adaptação, a vacas Nelore superovuladas, iniciado seis dias antes da inseminação, não acarreta em qualquer efeito sobre os parâmetros reprodutivos, mesmo com concentração de NUP elevadas.

Entretanto, quando o fornecimento da mesma dieta é iniciado na inseminação (dia 0), permanecendo por 6 dias, sem prévia adaptação, acarreta na elevação da concentração de NUP e causa redução de 32,7% na capacidade de fecundação dos oócitos e também parece acelerar o desenvolvimento embrionário inicial, podendo levar a assincronia entre desenvolvimento do embrião e do útero.

A concentração sérica de progesterona parece não sofrer efeitos nem da inclusão nem do momento da inclusão da uréia na dieta e não aparenta relação com os efeitos encontrados sobre a viabilidade embrionária.

Da mesma forma, as concentrações sistêmicas de glicose e insulina não sofrem efeito nem da inclusão nem do momento da inclusão da uréia na dieta.

REFERÊNCIAS

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

ALLEGRUCCI, C.; THURSTON, A.; LUCAS, E.; YOUNG, L. Epigenetics and the germline. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 137-149, 2005.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 11.ed. Washington, 1990. 1050p.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; SINCLAIR, K. D.; ROBINSON, J. J.; MCEVOY, T. G.; WEBB, R. The effect of different energy and protein diets on the expression of mRNA encoding components of the ovarian IGF-system in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility - Abstract Series (Abstract)**, v. 22, p. 8, 1998.

ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J. HOGG, C. O.; WOAD, K. J., WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9-E21, 2005, (Supplement, E).

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.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.

BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2804-2819, 1995.

BEN-YOSEF, D.; SHALGI, R. Early ionic events in activation of the mammalian egg. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 96-103, 1998.

BERARDINELLI, J. G.; WENG, J.; BURFENING, P. J.; ADAIR, R. Effect of excess degradable intake protein on early embryonic development, ovarian steroids, and blood urea nitrogen on days 2, 3, 4, and 5 of the estrous cycle in mature ewes. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 193-199, 2001.

BISHONG, C.; ROBINSON, J. J.; MCEVOY, T. G.; FINDLAY, P.; AITKEN, 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, p. 139-151, 1996.

BLANCHARD, T.; FERGUNSON, J.; 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, p. 905-908, 1990.

BLAUWEIKEL, R.; KINCAID, R. L. Effect of crude protein and solubility on performance and blood constituents of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 8, p. 2091-2098, 1986.

BODE, M. L.; GILBERT, R. O.; BUTLER, W. R. Effects of urea infusion on uterine luminal pH, prostaglandins and proteins in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p. 212, 2000. (Supplement, 1).

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.

BROCK, F. M.; FORSBERG, C. W.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 561-569, 1982.

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

BRONSON, F. H. Mammalian reproduction: An ecological perspective. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 1-26, 1985.

BUTLER, W. R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. **British Society of Animal Science occasional publication**, v.1, n. 26, p. 133-145, 2001.

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

BUTLER, W. R. Relação entre a concentração de proteína da dieta, ambiente uterino e concepção em vacas leiteiras. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 8., 2004, Uberlândia (MG). [**Anais...**], 2004. p. 101-105.

BUTLER, W. R. Review: 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.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance on postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 7, n. 3, p. 767-783, 1989.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance on postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 7, n. 3, p. 767-783, 1989.

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.

CHALUPA, W. Discussion of protein symposium. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 5, p. 1134-1146, 1984.

CONRAD, H. R.; BAILE, C. A.; MAYER, J. Changing meal patterns and suppression of feed intake with increasing amounts of dietary nonprotein nitrogen in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 11, p. 1725-1733, 1977.

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. 3-4, p. 195-208, 2004.

DAWUDA, P. M.; SCARAMUZZI, R. J.; LEESE, H. J.; HALL, C. J.; DREW, S. B.; PETERS, A. R.; WATHES, D. C. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in 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.

DEPETERS, E. J.; FERGUSON, J. D. Non protein nitrogen and protein distribution in milk of cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 11, p. 3192-3198, 1992.

DIMSKI, D. S. Ammonia metabolism and the urea cycle: Function and implications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 2, p. 73-78, 1994.

DRIANCOURT, M. A.; THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, p. 345-362, 1998.

EDWARDS, J. S.; BARLEY, E. E.; DAYTON, A. D. Effects of dietary protein concentration on lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 2, p. 243, 1980.

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

ELROD, C. C.; VAN AMBURGH, M.; BUTLER, W. R. Alterations on pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 702-712, 1993.

EMERICK, R. J. Nitrate and Urea Toxities. In: CHURCH, C.D. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Waveland Press, 1993, 564p.

EZEQUIEL, J. M. B.; MATARAZZO, S. V.; SALMAN, A. K. D.; JÚNIOR, A. P. M.; SOARES, W. V. B.; SEIXAS, J. R. C. Digestibilidade aparente da energia e da fibra de dietas para ovinos contendo uréia, amiréia ou farelo de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 231-235, 2001.

FAHEY, J.; BOLAND, M. P.; O'CALLAGHAN, 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, n. 2, p. 395-400, 2001.

FAHNING, J. D.; SCHULTZ, R. H.; GRAHAM, E. F. The free amino acid content of the uterine fluids and blood serum in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, n. 2, p. 229-236, 1967.

FERGUNSON, J. D.; CHALUPA, W. Impact of protein nutrition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 746-766, 1989.

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

FERGUSON, J. D.; BLANCHARD, T. L.; HOSHALL, D.; CHALUPA, W. High rumen degradable protein as a possible cause of infertility in a dairy herd. **Journal of Dairy Science** (Abstract), v. 69 p. 120, 1986. (Supplement).

FERNANDEZ, J. M.; CROOM JR., 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, p. 3259-3266, 1988.

FERNANDEZ, J. M.; CROOM JR., W. J.; TATE JR., 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.

FOLMAN, T. H.; NEWMARK, H.; KAIM, M.; KAUFMANN, W. Performance, rumen and blood metabolites in high-yielding cows fed varying protein percents and protected soybean. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 4, p. 759-764, 1981.

FOLMAN, Y.; ROSENBERG, M.; HERZ, Z.; DAVIDSON, M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. **Journal Reproduction Fertility**, v. 34, n. 2, p. 267-275, 1973.

GARCIA-BOJALIL, C. M.; STAPLES, C. R.; RISCO, C. A.; SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows: Reproductive responses. **Journal of Dairy Sciences**, v. 81, n. 5, p. 1385-1395, 1998.

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. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 83-102, 1998.

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.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; SPITZER, A.; BATT, P. A. In vivo rates of cleavage for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and increased embryo density stimulate development. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 390-400, 1994.

GATH, V.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D.O. Effects of diet type on establishment of pregnancy and embryo development in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 224, 1999.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)**. Washington: USDA, ARS, 1970. 155 p. (Agricultural Handbook, 379).

GUSTAFSSON, A. H; PALMQUIST, D. L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 2, p. 475-484, 1993.

HALLET, C. J.; COOK, J. G. H. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. **Clinica Chimica Acta**, v. 35, n.1, p. 33-37, 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, G. R. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 1-8, 2000a.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, G. R. Effects of ammonia on development and viability of preimplantation bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1-2, p. 23-30, 2000b.

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.

HE, Y.; HAKVOORT, T. B. M.; VERMEULEN, J. L. M.; LAMERS, W. H.; VAN ROON, M. A. Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 7, p. 1865-1875, 2007.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. **Clinical Chemistry: Principles and Techniques**. New York; 2 ed. Harper & Row Publishers Inc. N.Y., p.1288, 1974.

HENRY, R. J.; **Clinical Chemistry: Principles and Techniques**. New York; Harper & Row, 1968.

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

HIGGINBOTHAM, G. E.; TORABI, M.; HUBER, J. T. Influence of dietary protein concentration and degradability on performance of lactating cows during hot environmental temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 10, p. 2554-2564, 1989a.

HOLTZ, C. R.; SMITH, R. D.; SNIFFEN, C. J. Reproductive and metabolic responses of dairy cattle to the level and degradability of dietary protein. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 243, 1986. (Supplement, 1).

HOUPT, T. R. Transfer of urea and ammonia to the rumen. In: PHILLIPSON A. T. **Physiology of digestion and metabolism in the ruminants**. Newcastle: England, 1970. p. 119-131.

HOWARD, H. J.; AALSETH, E. P.; ADAMS, G. D.; BUSH, L. J. Influence of dietary protein on reproductive performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 8, p. 1563-1571, 1987.

HUBER, J. T.; KUNG JR., L. Protein and non-protein nitrogen utilization by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 6, p. 1176-1182, 1981.

HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S. L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. In: AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1999, Raleigh. [**Proceedings...**], Raleigh: American Society of Animal Science, 1999. p. 1-11.

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 postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 9, p. 1854-1861, 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.

JOUANY, J. P. Effect of protozoa on nitrogen utilization in ruminants. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 4, p.1335S-1346S, 1996. (Supplement).

KAIM, M.; FOLMAN, Y.; NEUMARK, H. The effect of protein intake and lactation number on postpartum body weight loss and reproductive performance of dairy cows. **Animal Production**, v. 37, p. 229, 1983.

KANEKO, J. J. Appendixes. In: KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4. Ed. San Diego: Academic Press, 1989. p. 877-901.

KENNY, D. A.; BOLAND, M. P.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Effect of pasture crude protein and fermentable energy supplementation on blood metabolite and

progesterone concentrations and on embryo survival in heifers. **Animal Science**, v. 73, n. 3, p. 501-512, 2001.

KENNY, D. A.; BOLAND, M. P.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Effect of rumen degradable protein with or without fermentable carbohydrate supplementation on blood metabolites and embryo survival in cattle. **Animal Science**, v. 74, n. 3, p. 529-537, 2002a.

KENNY, D. A.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; MORRIS, D. G.; TOMOS, A. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1797-1804, 2002b.

KIRSHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 103-114, 1998.

KÖSTER, H. H.; COCHRAN, R. C.; TITGEMEYER, E. C.; VANZANT, E. S.; NAGARAJA, T. KREIKEMEIER, G. K. K.; JEAN, G. ST. Effect of increasing proportion of supplemental nitrogen from urea on intake and utilization of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1393-1399, 1997.

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 and Fertility**, v. 102, p. 305-312, 1994.

LARSON, S. F.; BUTLER, W. R.; CURRIE, W. B. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactation cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1288-1295, 1997.

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 cows. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 37, n. 2, p. 111-115, 2002.

LAVEN, R. A.; DAWUDA, P. M.; 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. 1-2, p. 41-52, 2004.

LAVEN, R. A.; DREW, S. B. Dietary protein and the reproductive performance of cows. **The Veterinary Record**, v. 145, n. 24, p. 687-695, 1999.

LAVEN, R. A.; SCARAMUZZI, R. J.; WATHES, D. C. Recent research on the effects of excess dietary nitrogen on the fertility of dairy cows. **The Veterinary Record**, v. 160, n. 11, p. 359-362, 2007.

MARTINELLE, K.; HÄGGSTRÖM, L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. **Journal of Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 339-350, 1993.

MAURER, R. R.; ECHTERNKAMP, S. E. Hormonal asynchrony and embryonic development. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 11-22, 1982.

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.; PALMER R. M.; ROBERTSON, I. S. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 2, p. 89-107, 1995.

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 Reproductive Biology**, v. 6, p. 129-173, 1984.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7. ed. Washington, USA: National Academy Press, 1996. 242 p.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6. ed. Washington, USA: National Academy Press, 1989. 158 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3.ed. New York: Worth, 2000. 1152 p.

O'CALLAGAN, D. O.; BOLAND, M. P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Animal Science**, v. 68, n. 2, p. 299-314, 1999.

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.

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis**. 4. ed. Belmont, CA: Wadsworth Inc., 1993.

POWELL, K.; ROOKE, J. A.; MCEVOY, T. G.; ASHWORTH, C. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D. Zygote donor nitrogen metabolism and in vitro embryo culture perturbs in utero development and IGF2R expression in ovine fetal tissues. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1901-1912, 2006.

RABIEE, A. R.; MACMILLAN, K. L.; SCHWARZENBERGER, F. Progesterone metabolism in ovariectomised non-lactating Holstein–Friesian cows treated with progesterone with two levels of feed intake. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 1-2, p. 35-46, 2001.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SAVILLE, W. J. A.; FRAZER, G. S.; WITTUM, T. E. Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 482-489, 2001.

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. O.; 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.

ROBINSON, J. J. Nutrition and reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 25-34, 1996.

ROOKE, J. A.; EWEN, M.; MACKIE, K.; STAINES, M. E.; MCEVOY, T. G.; SINCLAIR, K. D. Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the

presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n.1, p. 53-71, 2004.

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.

ROWLETT, R.S., GARGIULO N.J., SANTOLI F.A., JACKSON, J. M.; COBERT, A. H. Activation and inhibition of bovine carbonic anhydrase-III by dianions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 2, p. 933-941, 1991.

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. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

RYDER, W. L.; HILLMAN, D.; HUBER, J. T. Effect of feeding urea on reproductive efficiency in Michigan Dairy herd Improvement Association herds. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 9, p. 1290-1294, 1972.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17 β in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, F. A. P.; HUBER, J. T.; THEURER, C. B.; SWINGLE, R. S.; SIMAS, J. M.; CHEN, K. H.; YU, P. Milk yield and composition of lactating cows fed steam-flaked sorghum and graded concentrations of ruminally degradable protein. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 215-220, 1998a.

SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B.; HUBER, J. T. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3182, 1998b.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5. ed. São Paulo: Livraria Santos, 1996. 600 p.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. **Journal of Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 161-185, 1996.

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 differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2670-2680, 2000b.

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, 2000a.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT User's guide**. 8. ed. Cary: SAS, 2001.

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: **Proc. 4th ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM**, 4., 1993, Gainesville. **Proceeding...** Gainesville: University of Florida, 1993. p. 37-51.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3. ed. Savoy IL: IETS, 1998, 180 p.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 345, 1992.

TAMMINGA, S. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 1615-1630, 1979.

TAMMINGA, S. The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3-4, p. 227-239, 2006.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-27, 1969.

THOMPSON, J. G. Defining the requirements for bovine embryo culture. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 27-40, 1996.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3583-3597, 1991.

VASCONCELOS, J. L. M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI S. J.; WILTBANK M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 795-807, 2003.

WISEK, W. J. Ammonia: It's effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 3, p. 481-498, 1984.

WESTWOOD, C. T.; LEAN, I. J.; KELLAWAY, R. C. Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: A multivariate description. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3225-3237, 2002.

WESTWOOD, C. T.; LEAN, I. J.; KELLAWAY, R. C. Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: A quantitative review. Part 2. Effect of dietary protein on reproductive performance. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 4, p. 123-130, 1998.

WITTWER, F. G.; GALLARDO, P.; REYES, J.; OPITZ, H. Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 38, n. 2-3, p. 159-166, 1999.

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.