

Interação entre nutrição protéica e aspectos reprodutivos em fêmeas bovinas

Interaction between protein nutrition and reproductive features in bovine dams

Fernanda Altieri Ferreira^{1,3}, Mário Binelli¹ e Paulo Henrique Mazza Rodrigues²

¹Departamento de Reprodução Animal (FMVZ/USP)

²Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ/USP)

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
Av. Duque de Caxias Norte, 225, CP 23, CEP 13.635-090, Pirassununga, SP

³Correspondência: faltierferreira@gmail.com

Financiamento: FAPESP e CAPES

Resumo

Dietas com excesso de proteína bruta, em especial contendo uréia, têm sido associadas a menores taxas de prenhez, alterações hormonais e diminuição na qualidade de embriões de fêmeas bovinas. A condição de exposição desses animais à uréia (por exemplo, dose diária, tipo de dieta, estágio fisiológico) parece ser fator decisivo para manifestação dessas respostas. O mecanismo pelo qual a uréia agiria ainda não foi completamente elucidado, mas algumas hipóteses aventadas são ação sobre oócitos e embriões durante as primeiras clivagens e modificações em ambiente uterino. Entretanto, o uso de uréia em alguns estudos mostrou-se inócua ao desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas.

Palavras-chave: desempenho reprodutivo, nitrogênio uréico plasmático, uréia, vacas.

Abstract

Diets containing excessive amounts of crude protein, mainly from urea, have been associated to lower pregnancy rates, shifts in hormonal patterns and poor embryo quality in bovine female. Exposure conditions to urea (e.g., daily dose, type of diet, physiologic status) may be decisive to manifestation of these responses. Mechanism by which urea may act has not been elucidated yet, although some hypotheses are action on oocyte and early embryo and changing in the uterine milieu. Nevertheless, in some studies urea feeding has been shown being harmless to reproduction performance of bovine dams.

Keywords: cows, plasmatic urea nitrogen, reproductive performance, urea.

Introdução

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

A uréia é a fonte de nitrogênio não-protéico mais utilizada em dietas para ruminantes (Currier *et al.*, 2004). Seu emprego pode ser feito tanto em dietas visando ao ganho de peso de novilhos na fase de recria (Oliveira *et al.*, 2006) e terminação (Detmann *et al.*, 2004), quanto em suplementos para vacas de cria mantidas a pasto (Peixoto *et al.*, 2006) e vacas doadoras de embriões (Barreto *et al.*, 2003; Mikkola *et al.*, 2005).

Contudo, apesar de boa alternativa como complemento à proteína bruta da dieta, seu uso em determinadas situações foi associado à diminuição das taxas de produção de embriões em ovelhas (Bishonga *et al.*, 1994; McE voy *et al.*, 1997) e vacas leiteiras (Dawuda *et al.*, 2002).

É possível que tais efeitos sejam causados pelo teor excessivo de uréia na dieta que, associado à falta de carboidratos disponíveis para fermentação no rúmen, pode contribuir para o aumento da concentração de uréia plasmática, comumente expressa na forma de nitrogênio uréico plasmático, segundo Butler (1998). Essa situação poderia ser prejudicial para oócitos, ambiente uterino e embriões (Sinclair *et al.*, 2000).

Porém, em alguns trabalhos, a utilização de uréia na dieta não foi associada com baixo desempenho reprodutivo de vacas Holandesas não-lactantes (Garcia-Bojalil *et al.*, 1994) nem de vacas zebuínas doadoras e receptoras de embriões (Barreto *et al.*, 2003). Tais relatos estimulam a discussão sobre em que tipo de situações a uréia fornecida a fêmeas bovinas poderia acarretar em prejuízos a seu desempenho reprodutivo. Dessa forma, foram abordados na presente revisão o metabolismo do nitrogênio pelos ruminantes e sua ligação com o desempenho reprodutivo de vacas e novilhas.

Metabolismo do nitrogênio em ruminantes

Um dos sistemas nutricionais mais utilizados por nutricionistas no mundo para avaliação de dietas para ruminantes é o proposto pelo National Research Council - NRC (2001). Este se baseia no conceito de proteína

metabolizável, que compreende a mistura de aminoácidos provenientes da digestão da proteína microbiana, proteína não degradada no rúmen (PNDR) e proteína endógena (Santos e Greco, 2007). De acordo com esse sistema (NRC, 2001), pode-se, então, dividir a proteína bruta da dieta em duas frações, conforme a suscetibilidade à degradação ruminal: a proteína degradável no rúmen e a fração que escapa à ação dos microorganismos ruminantes e segue em direção ao intestino delgado, a proteína não degradada no rúmen. Basicamente, o que difere a suscetibilidade à degradação ruminal é a estrutura terciária e quaternária de cada proteína, uma vez que determinadas estruturas parecem impedir ou dificultar o processo de ligação entre bactéria e proteína (Russell, 2002). Esse processo é o mais importante na determinação da taxa de degradação protéica no rúmen (NRC, 2001).

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

Considerada fração imediatamente solúvel em água ou fração “A” pelo sistema Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), segundo Fox *et al.* (1992), a uréia também pode fornecer nitrogênio para a produção de proteína microbiana, pois possui o nitrogênio em sua molécula sob a forma de dois grupos amino (Lehninger, 1986).

Nos mamíferos, a hidrólise da proteína não degradada no rúmen é realizada por enzimas proteolíticas produzidas nas células epiteliais do trato gastrointestinal (TGI) e do pâncreas (Church, 1988). Apesar de possuírem a capacidade de digerir grandes moléculas de proteínas e tornarem-nas aptas para a absorção sob a forma de aminoácidos para a síntese protéica, as células dos mamíferos não são capazes de produzir a enzima urease para hidrólise da uréia (Church, 1988). Dessa maneira, esse composto não constitui uma fonte de nitrogênio para animais não-ruminantes.

No entanto, os ruminantes, por estarem associados simbioticamente com a microbiota ruminal (Russell e Rychlik, 2001), dispõem da urease microbiana e são aptos a aproveitarem a uréia como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana. A urease, enzima produzida pela microbiota ruminal, provoca a ruptura das ligações da molécula da uréia na presença de uma molécula de água, sendo produtos dessa reação duas moléculas de amônia (NH₃) e uma molécula de dióxido de carbono (CO₂) (Russell, 2002).

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

Os peptídeos e os aminoácidos são intermediários na conversão de proteína a amônia (Leng e Nolan, 1984). Alguns peptídeos podem resistir à fermentação ruminal, passando assim intactos em direção ao abomaso (Chen *et al.*, 1987). No entanto, o destino mais comum dos mesmos, assim como dos aminoácidos advindos da proteólise bacteriana, é a incorporação pelos microorganismos ruminantes como proteína ou quebra até amônia (Wallace, 1996). A proteólise bacteriana da proteína degradada no rúmen começa com atividade extracelular da protease para produzir peptídeos, os quais são submetidos à hidrólise posterior no interior da célula microbiana, que originará aminoácidos como produtos finais (Swenson e Reece, 1996). Espécies como *Peptostreptococcus anaerobius* e *Megasphaera elsdenii* têm a capacidade de desaminar aminoácidos e peptídeos de cadeia curta (Russell, 2002). Quando a energia é limitante no sistema ou quando a taxa de degradação de peptídeos excede a taxa de assimilação de aminoácidos, há excesso de produção de amônia ruminal e baixa retenção microbiana de nitrogênio (Wallace, 1996).

Algumas bactérias celulolíticas não são capazes de aproveitar aminoácidos e peptídeos e necessitam de amônia e ácidos orgânicos para produzirem proteína (Cunningham, 2004). Essa amônia advém da desaminação dos aminoácidos provenientes da digestão protéica, ou seja, estes sofrem a retirada de seu grupo amino e dão origem à amônia, a alguns ácidos metabólicos e a dióxido de carbono (Leng e Nolan, 1984; Wallace e Cotta, 1988). A uréia, como fonte de nitrogênio não-protéico, é hidrolisada pela urease microbiana em amônia, que, por sua vez, também serve como doadora de nitrogênio para produção de proteína microbiana (Broderick, 1996). No entanto, parte da amônia produzida pela desaminação dos aminoácidos dietéticos e nitrogênio não-protéico degradados no rúmen pode escapar à captura pela microbiota, difundir-se pela parede ruminal e ser captada pelo fígado por meio da circulação portal (Cunningham, 2004).

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

A amônia é considerada um composto tóxico, principalmente devido à rápida captação da mesma por tecidos cerebrais (Bartley *et al.*, 1981). Também pode causar irritação do parênquima pulmonar, edema no órgão, levando a um quadro de desidratação em bovinos (Kopcha, 1987). Kitamura (2002) associou a ocorrência

de tremores a concentrações de amônia em torno de 1,5 mg/dL. Devido à alta toxicidade da amônia, principalmente em relação a tecidos nervosos (Lehninger, 1986), há a necessidade de um mecanismo que a torne uma molécula não-tóxica. Tal mecanismo consiste na conversão de amônia em uréia.

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

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

No caso de a uréia ser reciclada e retornar ao rúmen, esta é rapidamente convertida em amônia, pois a atividade ureática realizada pelas bactérias habitantes da parede ruminal é alta (Swenson e Reece, 1996). Sendo assim, a amônia tem uma nova chance de ser utilizada na síntese de proteína microbiana. Esse processo possibilita que os ruminantes sejam eficientes conservadores de nitrogênio (Cunningham, 2004).

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

Uma vez circulante, a uréia pode ser facilmente determinada no plasma ou soro dos animais. Por meio dessa determinação, quantifica-se o nitrogênio circulante proveniente da uréia, denominado nitrogênio uréico plasmático.

O nitrogênio uréico plasmático fornece informações relevantes. Roseler *et al.* (1993) afirmaram que o nitrogênio advindo da degradação protéica ruminal é a principal fonte de uréia plasmática. Além de ser a variável mais utilizada em diferentes estudos, pode ser bom indicador da proteína não utilizada pelo animal (Staples *et al.*, 1993), da taxa de proteína bruta dietética em relação à matéria orgânica fermentável no rúmen (Oltner *et al.*, 1985) e do metabolismo protéico pós-ruminal (Higginbotham *et al.*, 1989). É um bom indicativo também da degradabilidade da proteína no rúmen (Roseler *et al.*, 1993).

As concentrações plasmáticas de uréia, expressas na forma do nitrogênio uréico plasmático, podem ser utilizadas para monitorar o consumo de proteína dietética, uma vez que o consumo excessivo de proteína verdadeira ou nitrogênio não-protéico pode afetar o desempenho reprodutivo do animal, elevar sua exigência energética e aumentar o custo da ração (Broderick e Clayton, 1997; Oliveira Júnior *et al.*, 2004).

Relação entre proteína bruta dietética e desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas

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

Alguns autores constataram que a ação do teor excessivo de proteína bruta na dieta de vacas leiteiras poderia ser indireta, pois o principal efeito seria do balanço energético negativo apresentado por esses animais nos dois primeiros meses de lactação. Dessa forma, o balanço energético negativo seria agravado devido ao gasto energético adicional de detoxificação de amônia a uréia no fígado (Butler, 2000).

Não obstante o status energético de vacas, tanto de corte quanto leiteiras, ser considerado o principal fator nutricional que influencia o processo reprodutivo (Dunn e Moss, 1992; Boland *et al.*, 2001), o nitrogênio dietético também tem seu papel nesse contexto (Sasser *et al.*, 1988). Dunn e Moss (1992) reforçam essa idéia, ao recomendarem quantidades ideais de todos os micro e macronutrientes para que se obtenha um desempenho reprodutivo satisfatório em vacas de corte ou leite, considerando que todos os nutrientes têm seu papel para tal, não havendo um ou outro mais relevante.

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

Um potencial mecanismo capaz de explicar o impacto do excesso de nitrogênio sobre a reprodução é o efeito tóxico direto da amônia sobre o oócito enquanto este ainda se encontra no folículo (Dawuda *et al.*, 2004).

A concentração de alguns hormônios também pode sofrer alterações de acordo com a alimentação a que o animal está submetido. Baixa concentração de progesterona foi associada ao insucesso da gestação (Garcia-Winder *et al.*, 1986; Taylor e Rajamahendran, 1994) e a alimentação com alto teor de proteína bruta, por sua vez, foi associada à diminuição na concentração plasmática desse hormônio (Sonderman e Larson, 1989).

A dieta também pode causar alterações na composição do fluido e no ambiente uterino. É sabido que o

sucesso do desenvolvimento embrionário depende do ambiente luminal uterino que o embrião encontra (McRae, 1984). A implantação e o desenvolvimento embrionário inicial, bem como a manutenção da gestação são dependentes de comunicação materno-fetal intacta, e qualquer alteração com que o embrião deparar-se pode ser decisiva para o insucesso de sua implantação no útero (Wolf *et al.*, 2003).

Proteína bruta na dieta e qualidade oocitária e embrionária

Os compostos nitrogenados, como a uréia e a amônia, são substâncias que podem afetar o desenvolvimento embrionário de mamíferos. Tal afirmação é baseada em estudos *in vitro* e *in vivo*, nos quais a amônia gerada fisiologicamente pelo metabolismo celular e pelo catabolismo protéico foi tóxica a gametas e embriões murinos, ovinos e bovinos em cultura (Gardner e Lane, 1993; McEvoy *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 1998).

Segundo Hammon *et al.* (1997), a maturação oocitária e o desenvolvimento inicial do embrião são modulados pelo microambiente que o circunda e este, por sua vez, é influenciado pelo nitrogênio dietético. Hammon *et al.* (2005) verificaram estreita associação positiva entre nitrogênio uréico plasmático e nitrogênio uréico no fluido folicular (NUFF) e sugeriram que altas concentrações de uréia ou amônia nos fluidos reprodutivos (folicular e uterino) podem contribuir para a ineficiência reprodutiva de vacas leiteiras. De fato, Iwata *et al.* (2006) reportaram correlação negativa entre desenvolvimento dos embriões provenientes de oócitos extraídos de folículos com alta concentração de uréia em seu fluido.

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

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

Contudo, Ocon e Hansen (2003) não observaram diminuição na taxa de clivagem em oócitos maturados em meio contendo 0, 5, 7,5 ou 10 mM de uréia, equivalentes à concentração de nitrogênio uréico plasmático de 0, 14, 21 e 28 mg/dL. Houve, porém, diminuição na taxa de blastocistos, mas somente nos clivados submetidos à concentração de 7,5 mM. Em relação aos clivados submetidos a 10 mM, não houve diferença significativa, o que foi explicado pelos autores como um mecanismo natural que o embrião desenvolveria como forma de proteção à agressão do meio com uréia (Ocon e Hansen, 2003).

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

Também Zander *et al.* (2006) não verificaram diferenças significativas nas taxas de desenvolvimento de embriões murinos submetidos a altas concentrações de amônia em diferentes momentos da produção *in vitro* de embriões (PIV), apesar de terem observado aumento da incidência de apoptose, traduzida pela diminuição do número de células totais e da massa celular interna, nos blastocistos que foram expostos durante toda a produção *in vitro* de embriões à alta concentração de amônia.

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

Esse possível efeito dar-se-ia dependendo de como e quando a uréia é introduzida na dieta do animal. Dawuda *et al.* (2002), ao trabalharem com vacas leiteiras em um programa de transferência de embriões, concluíram que, quando a uréia foi introduzida na dieta das vacas próximo ao momento da inseminação artificial (IA) até a colheita dos embriões, houve efeito deletério sobre a produção e a qualidade destes. Porém, quando a uréia foi adicionada à dieta 10 dias antes da IA, não houve efeito sobre as mesmas variáveis. Ao introduzirem por longo prazo a uréia na dieta de cabras não-lactantes superovuladas, Alves *et al.* (2007) reportaram efeito quadrático no tocante ao percentual de embriões de excelente qualidade dos animais alimentados com teores crescentes de uréia na dieta, por 81 dias antes da colheita de embriões, concluindo que o teor de 2,24% de uréia na matéria seca da dieta de cabras não-lactantes foi inócua à qualidade dos embriões coletados. Dawuda *et al.* (2004) não observaram nenhuma diferença significativa em relação à ovulação, formação e função do corpo lúteo entre vacas lactantes doadoras de embriões, alimentadas com 250 g de uréia/dia a partir de 10 dias antes da IA em relação às vacas que não ingeriram uréia, corroborando as considerações de Butler (1998), que afirmou que o desenvolvimento folicular e a ovulação de vacas leiteiras parecem não ser afetados por alimentação rica

em proteína bruta.

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

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

Rhoads *et al.* (2004) observaram concentração média de nitrogênio uréico plasmático de 22,6 mg/dL em vacas Holandesas e diminuição de 0,2 unidades percentuais no pH uterino seis horas após infusão parenteral de uréia, no sétimo dia do ciclo estral. Também Elrod *et al.* (1993) observaram diminuição no pH uterino em vacas leiteiras no início de lactação, alimentadas com 25% de proteína bruta a mais do que a recomendação, independentemente da fonte protéica ser ou não degradável no rúmen.

Ocon e Hansen (2003) adicionaram dimetadiona, um ácido fraco, ao meio de cultivo de embriões a 10, 15 ou 20 mM por oito dias e verificaram que menos embriões clivaram quando submetidos às concentrações de 15 ou 20 mM. Em todos os tratamentos, houve menor taxa de desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto.

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

Em vacas leiteiras, Butler *et al.* (1996) associaram concentrações de nitrogênio uréico plasmático superiores a 19 mg/dL com diminuição de 18 unidades percentuais na taxa de prenhez desses animais, em relação aos animais que se mantiveram abaixo de 19 mg/dL. Estudando a mesma categoria, McCormick *et al.* (1999) observaram diminuição de 22 unidades percentuais na taxa de prenhez em animais com a concentração média de nitrogênio uréico plasmático de 25 mg/dL em comparação aos animais que se mantiveram com 19,3 mg de nitrogênio uréico plasmático/dL de plasma, achado que corroborou o que Butler (1998) sugerira como sendo o limite entre baixa e alta concentração de nitrogênio uréico plasmático: 19 mg/dL. Os achados de Ferguson *et al.* (1988, 1993), que relataram diminuição nas taxas de concepção de rebanhos leiteiros cujos animais apresentaram concentrações de nitrogênio uréico plasmático superiores a 20 mg/dL, também contribuíram para o estabelecimento de tal limite. Igualmente Sinclair *et al.* (2000) afirmaram que, a partir de 19 mg de nitrogênio uréico plasmático por dL de plasma, há possibilidade de prejuízo para o desempenho reprodutivo animal, como insuficiência luteal e perdas embrionárias.

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

Apesar dessa conclusão, Laven *et al.* (2002), ao contrário de Butler (1998), sugeriram que o impacto do tratamento com alto nitrato na adubação do pasto poderia afetar a ovulação, a fecundação ou a fase inicial do desenvolvimento embrionário.

Em acordo, Rhoads *et al.* (2006), trabalhando com receptoras e doadoras de embriões submetidas a dietas com 15 ou 21% de proteína bruta, observaram efeito de dieta da doadora sobre taxa de prenhez e concluíram que altas concentrações de nitrogênio uréico plasmático devem prejudicar a viabilidade embrionária de vacas leiteiras lactantes por meio de efeitos sobre seus oócitos ou sobre seus embriões antes de estes serem coletados. Da mesma maneira, em experimento semelhante ao de Rhoads *et al.* (2006), Fahey *et al.* (2001) não observaram em ovelhas efeito de dieta (0 ou 4% de uréia) da doadora ou receptora sobre taxa de prenhez. Em contrapartida, observaram diminuição no número de células totais nos embriões de doadoras alimentadas com uréia em relação aos animais do grupo-controle.

Proteína bruta na dieta e concentração hormonal

Na literatura, há relatos sobre o efeito de dietas hiperprotéicas sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, principalmente em vacas leiteiras.

Jordan e Swanson (1979) observaram que vacas Holandesas lactantes alimentadas com 12,7% de

proteína bruta na dieta apresentaram menor concentração plasmática de LH circulante do que as alimentadas com 16,3 e 19,3% de proteína bruta. As vacas do grupo 12,75% de proteína bruta apresentaram menor período de serviço do que as dos outros dois grupos.

Já Blauwiekel *et al.* (1986) não observaram mudanças quanto ao padrão pulsátil de LH e concentração de receptores para GnRH na hipófise em vacas inteiras e ovariectomizadas alimentadas com 15 ou 25% de proteína bruta na dieta. Dawuda *et al.* (2004) também não observaram mudanças no padrão pulsátil de LH em vacas leiteiras alimentadas ou não com excesso de proteína degradada no rúmen.

Em relação à progesterona, Jordan e Swanson (1979) observaram, no 14º dia do ciclo estral, menores concentrações plasmáticas desse hormônio em vacas leiteiras em pico de lactação, alimentadas com 19,3% de proteína bruta em relação às alimentadas com 12,7% de proteína bruta. Em acordo, Sonderman e Larson (1989) observaram menores concentrações desse hormônio em vacas leiteiras alimentadas com 20% de proteína bruta em relação às alimentadas com 14% de proteína bruta.

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

As concentrações plasmáticas de progesterona aumentam progressivamente nos três primeiros ciclos estrais da vaca no período pós-parto, e esse aumento gradativo pode ser diminuído em virtude do balanço energético negativo que o animal apresenta nessa fase (Villa-Godoy *et al.*, 1988; Spicer *et al.*, 1990).

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

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

Do mesmo modo, em novilhas, Kane *et al.* (2004) não observaram diferenças nas concentrações plasmáticas de LH, quando esses animais foram mantidos a pasto e submetidos a três tipos de suplementação protéica (com uréia + baixo teor de proteína não degradada no rúmen, uréia + médio teor de proteína não degradada no rúmen e uréia + alto teor de proteína não degradada no rúmen). Porém, houve maior concentração plasmática de FSH nas novilhas dos tratamentos uréia + baixo e uréia + médio do que nas novilhas do tratamento uréia + alto.

Apesar de alguns autores não encontrarem diferenças nas concentrações plasmáticas das gonadotrofinas, Randel (1990), compilando dados de uma década sobre experimentos envolvendo nutrição e reprodução de vacas, chegou à conclusão de que há menor quantidade de pulsos de LH em vacas alimentadas com dietas deficitárias em energia ou proteína e sugeriu que, devido ao fato de a liberação de LH ser menor e provavelmente secundária a uma baixa liberação de GnRH no hipotálamo, a gonadotrofina fica estocada na hipófise. Se o animal for desafiado com GnRH exógeno, haverá maior quantidade de gonadotrofina sendo liberada. A questão, concluiu Randel (1990), dar-se-ia nas concentrações de gonadotrofinas e GnRH liberados do hipotálamo e não na quantidade de receptores de GnRH (Moss *et al.*, 1985; Nolan *et al.*, 1989; Kane *et al.*, 2004).

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

Considerações finais

A uréia é um bom complemento nitrogenado a ser utilizado na suplementação de bovinos mantidos a pasto ou confinados e de diversas categorias, por possuir alto equivalente protéico e baixo custo. No entanto, o aumento da concentração de uréia plasmática, gerado por desbalanços entre teor de proteína degradada no rúmen e carboidratos fermentáveis, tem sido associado à alteração de desempenho reprodutivo em vacas e novilhas. Dessa forma, diminuição nas taxas de concepção e prenhez, diminuição na qualidade embrionária e alteração de hormônios diretamente ligados à manutenção da prenhez, como a progesterona, já foram respostas observadas.

A maioria dessas observações foi feita com vacas lactantes de alta produção, o que gerou a hipótese de que há sobrecarga a determinados órgãos, como o fígado, gerando alto custo energético ao animal, agravando o inevitável estado de balanço energético negativo nessa fase. Com a finalidade de dirimir dúvidas sobre esses efeitos, observações em fêmeas bovinas não gestantes e não-lactantes foram realizadas para esclarecer se realmente há efeito direto de proteína degradada no rúmen e aumento de nitrogênio uréico plasmático sobre útero, folículos, oócitos, embriões e corpos lúteos.

Quando oferecida a doadoras de embriões da raça Nelore, não-lactantes, a uréia mostrou-se segura fonte de nitrogênio na dieta, no tocante à qualidade embrionária (Barreto *et al.*, 2003). No mesmo trabalho, em outro experimento, a taxa de prenhez em receptoras que receberam ou não uréia também não diferiu (Barreto *et al.*, 2003). Ambas, doadoras e receptoras, receberam dietas balanceadas e com adequada proporção de proteína degradada no rúmen, indicando que, se houver balanceamento da dieta, a uréia pode ser usada em programas de transferência de embriões sem acarretar problemas.

No entanto, um efeito muito claro já reportado por diversos autores é a suscetibilidade de gametas e embriões a compostos nitrogenados (por ex., uréia e amônia), provada em sistemas *in vitro* (Lane e Gardner, 2003; Ocon e Hansen, 2003). Em virtude da alta correlação entre composição plasmática e fluido folicular (Edwards, 1974), é de se esperar que animais alimentados com alto teor de proteína degradada no rúmen ou com desbalanços entre teor de proteína degradada no rúmen e carboidratos na dieta, apresentem fluido folicular com concentração alta de uréia. Tal alteração pode prejudicar o desenvolvimento oocitário, uma vez que a maturação do mesmo é modulada pelo microambiente que o circunda (Hammon *et al.*, 2000).

De fato, já houve relatos de diminuição na taxa de prenhez em receptoras, gestantes de embriões gerados em doadoras alimentadas com alta quantidade de proteína degradada no rúmen, independentemente do tipo de dieta que receberam (Rhoads *et al.*, 2006). Diante dessas observações, foi concluído que embriões gerados nas doadoras alimentadas com alto teor de proteína degradada no rúmen sofreram ações anteriormente à colheita ou então que os oócitos foram afetados ainda dentro do folículo (Rhoads *et al.*, 2006).

Tal suscetibilidade poderia ser explicada pela ausência do ciclo da uréia nas células foliculares, fato observado por Józwick *et al.* (2006) em folículos pré-ovulatórios de mulheres, denotando fragilidade destas células no metabolismo de compostos nitrogenados. Também em mulheres, a concentração de glutamato foi associada negativamente com a concentração de glutamina, tanto mensuradas em plasma quanto em fluido folicular, o que de certa forma indica que a amônia gerada no sistema pode estar sendo incorporada à molécula de glutamina, principal aceptor de amônia do organismo (Swenson e Reece, 1996). Orsi e Leese (2004) demonstraram que em blastocistos bovinos há preponderância do sistema glutamina ao ciclo da uréia, com a finalidade de captação de amônia. Tais observações levam à conclusão de que pode haver maior suscetibilidade das células à amônia, mas há um mecanismo de proteção que não permite à molécula de amônia circular livremente.

Sabe-se que a uréia inibe a polimerização de tubulina nos microtúbulos, e essa modificação no citoesqueleto pode tornar o oócito inapto a completar sua meiose (Kubiak *et al.*, 1992; Stoppin-Mellet *et al.*, 1999). Realmente, DeWit *et al.* (2001) verificaram que a presença de uréia em concentração semelhante a 17 mg de nitrogênio uréico plasmático/dL de plasma foi associada a menores taxas de maturação *in vitro*. A exposição à amônia em estádios iniciais do desenvolvimento embrionário (p. ex., zigoto) gerou blastocistos murinos menos desenvolvidos do que a exposição em fases mais tardias, revelando a excessiva suscetibilidade ao composto nitrogenado nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Assim, há argumentos para se acreditar em efeitos do excesso de uréia plasmática anteriores à fecundação, ou seja, o gameta tem suscetibilidades ainda dentro do folículo, durante a maturação e quando ainda não alcançou o útero. Não obstante, alguns autores creditam a diminuição de taxas de prenhez em vacas alimentadas com alto teor de proteína bruta a alterações no ambiente uterino, conforme aumento do nitrogênio uréico plasmático, próximo ao momento de implantação do embrião, pois alta concentração de nitrogênio uréico plasmático já foi associada positivamente a pH ácido uterino, e este a menores taxas de prenhez (Elrod e Butler, 1993).

Os relatos da literatura permitem reflexão acerca da hipótese de que possivelmente há uma conjunção de fatores e que é fundamental muito critério na utilização de uréia como fonte de nitrogênio não-protéico na alimentação de vacas e novilhas, seja em programas de transferência de embriões, aspiração folicular para PIV ou simplesmente para preparo para a estação de monta a pasto. A condição de exposição do animal à uréia é o fator determinante que separa a possibilidade de oferecimento de fonte nitrogenada, da possibilidade de intoxicação e perdas econômicas, como o baixo desempenho reprodutivo ou óbitos. Tanto a categoria animal à qual a uréia é oferecida, como a quantidade e a estratégia com que é oferecida são fatores que determinam a condição de exposição.

Sobre a categoria animal, vacas leiteiras parecem ser muito influenciadas, principalmente durante o intervalo parto-concepção, quando as maiores produções leiteiras e o balanço energético negativo são esperados. Em vacas e novilhas de corte, o suprimento de fonte energética associado ao fornecimento de uréia é indispensável para o sucesso da estratégia de alimentação. Em relação à dose e à estratégia de alimentação, o período de adaptação, ou seja, a inclusão gradativa de uréia na dieta de fêmeas bovinas pode ser uma boa opção para que os animais não apresentem picos de uréia plasmática, podendo assim serem prevenidos efeitos da ação do excesso de nitrogênio uréico plasmático sobre útero, folículos, oócitos e embriões. O momento da introdução da uréia na dieta

também deve ser oportuno, evitando-se a iminência da IA, segundo Dawuda *et al.* (2002). Contudo, momentos anteriores à fecundação também podem ser de extrema suscetibilidade embrionária à uréia e/ou à amônia.

Nas condições brasileiras, em que mais comum que a superalimentação observada em rebanhos leiteiros norte-americanos é a falta de proteína na época seca do ano, o oferecimento estratégico da suplementação protéica é indispensável para garantir-se o sucesso na estação de monta. A substituição de parte da proteína verdadeira a ser ofertada pode ser feita pela uréia com sucesso, mas a disponibilidade de pastagem para que o animal possa aproveitar o nitrogênio oferecido pela uréia é fundamental. A administração de dieta total como forma de arraçãoamento pode atenuar os efeitos de fonte de rápida degradação de nitrogênio como a uréia, pois tendo carboidrato na dieta o suficiente para combinar-se com o grupo amino, formando, assim, aminoácidos e proteína microbiana, menor será a formação de amônia livre no rúmen. Quanto menos amônia atingir a circulação, menor será a formação de uréia no fígado e, conseqüentemente, menos uréia circulante, que poderia atingir útero, folículos e embriões, estruturas que parecem ser destituídas de mecanismos de detoxificação.

Em síntese, a maioria dos autores defende uma destas duas teorias: efeito da uréia nos folículos, nos oócitos após a ovulação ou nos zigotos, ou efeito da uréia no útero, cujas condições, em virtude da exposição, podem ser inóspitas ao embrião no momento da implantação, causando perda embrionária precoce. Tais teorias podem ser complementares e interpretadas de maneira sinérgica.

Em conclusão, fazendo-se uso dos relatos da literatura, um modelo foi proposto para explicar a ação de uréia plasmática sobre folículos, corpo lúteo e útero (Fig. 1).

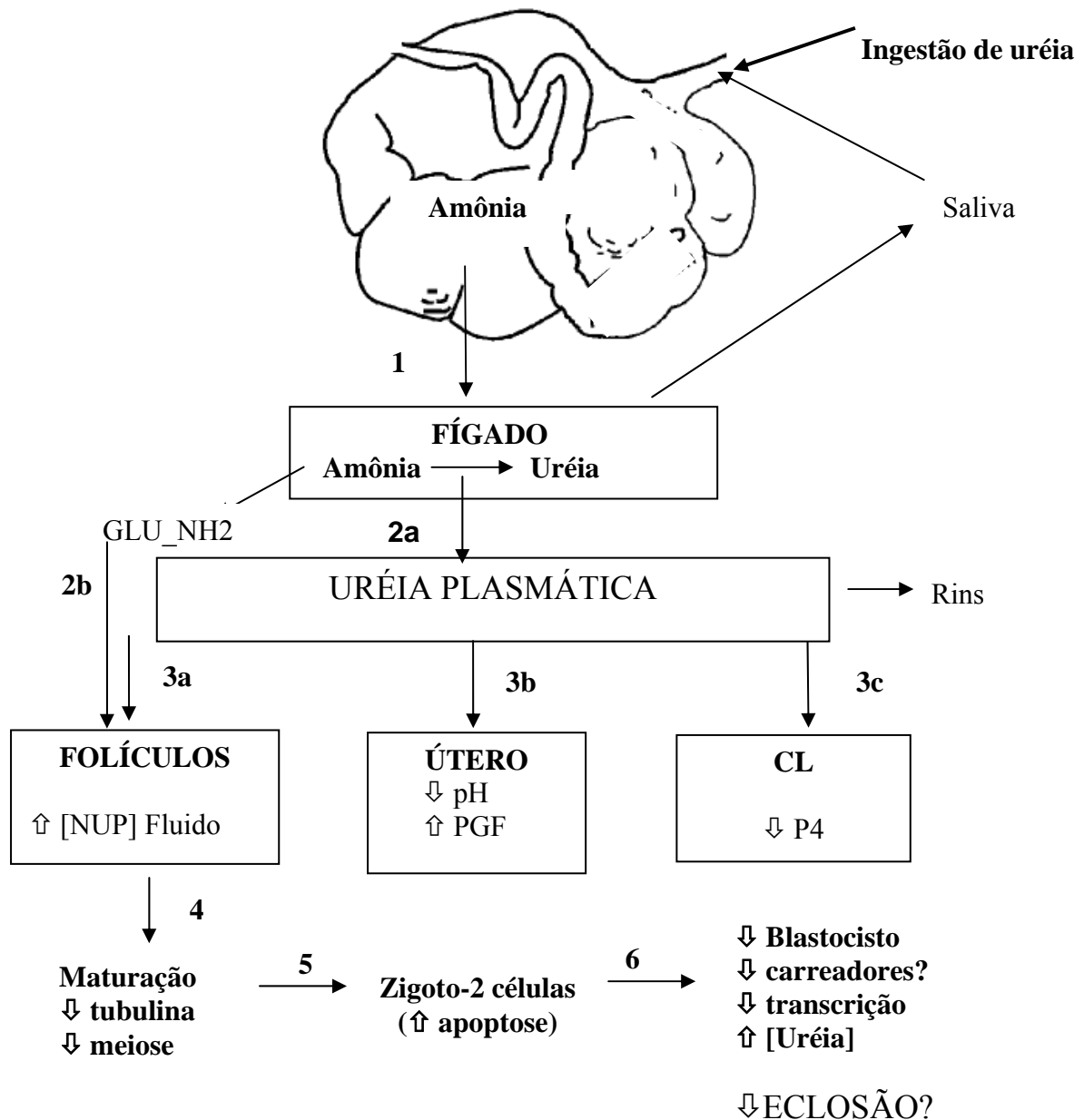


Figura 1. Modelo proposto para atuação da uréia, oriunda da dieta, hidrolisada no rúmen e geradora de amônia, no sistema reprodutivo de fêmeas bovinas.

Uma vez ingerida a uréia, esta é hidrolisada em amônia na parede ruminal, por meio da atividade ureática da microbiota. Absorvida, a amônia alcança o fígado (seta 1; Fig. 1) onde é reconvertida em uréia (Leng e Nolan, 1984). Esta, por sua vez, poderá ser reciclada ao rúmen, ser eliminada pelos rins ou atingir, por meio da corrente sanguínea (seta 2a; Fig. 1), folículos (seta 3a; Fig. 1), útero (seta 3b; Fig. 1) e ovários (seta 3c; Fig. 1). No fígado, aminoácidos são desaminados (Swenson e Reece, 1996), e a amônia resultante desse processo pode ser incorporada à glutamina, um aceptor amoniacal de grande relevância (Lehninger, 1986). A glutamina (seta 2b; Fig. 1) e a uréia plasmática (seta 3a; Fig. 1) podem alcançar o fluido folicular, onde o oócito está imerso. A uréia plasmática pode atingir o útero (seta 3b; Fig. 1), alterando seu meio (Elrod e Butler, 1993), podendo haver aumento da concentração de PGF 2α em resposta (Gilbert *et al.*, 1996). Diminuição da concentração plasmática de progesterona diante do alcance da uréia plasmática no útero (seta 3c; Fig. 1) também pode ocorrer (Jordan e Swanson, 1979). A uréia pode impedir a polimerização da tubulina do citoesqueleto (seta 4; Fig. 1), o que impede a meiose do oócito (Kubiak *et al.*, 1992). Mesmo se a meiose for completada e o oócito maduro for fecundado, a exposição deste a alta concentração de amônia ou uréia pode aumentar a taxa de apoptose nos potenciais blastocistos gerados, sendo que os estádios mais iniciais de desenvolvimento (p. ex., zigoto) são especialmente sensíveis a essa exposição (seta 5; Fig. 1), segundo Zander *et al.* (2006). Alta concentração intracelular de uréia ou de amônia pode inibir a transcrição de proteínas carreadoras de uréia para fora do meio intracelular, mantendo-a dentro do embrião, e fazendo com que aquela atue sobre este por meio de processos, podendo diminuir a taxa de blastocistos e a eclosão dos mesmos (seta 6; Fig. 1). Ainda que os embriões eclodam, poderá haver diminuição do pH uterino (seta 3b; Fig. 1), atípico no 14^o dia do ciclo estral de vacas, e a implantação do embrião pode ser comprometida, em combinação com menor concentração de progesterona e aumento na PGF 2α , levando a menores taxas de prenhez.

Agradecimentos

À FAPESP, pela concessão do auxílio à pesquisa, à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor e aos Departamentos de Reprodução Animal e Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Referências

- Alves NG, Torres, CAA, Rodrigues, MT, Cecon, PR, Santos ADF, Siqueira LGB, Bitencourt LL, Moraes EA. Efeito do nível de uréia na dieta sobre o desempenho, a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário em cabras Alpinas. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.996-1005, 2007.
- Barreto AG, Louvandini H, Costa CP, McManus C, Rumpf R. Uso da uréia como suplemento protéico na dieta de doadoras e receptoras de embriões bovinos. *Rev Bras Zootec*, v.32, p.77-84, 2003.
- Bartley EE, Avery TB, Nagaraja TG, Watt BR, Davidovich A, Galitzer S, Lassman B. Ammonia toxicity in cattle. V. Ammonia concentration of lymph and portal, carotid and jugular blood after the ingestion of urea. *J Anim Sci*, v.53, p.494-498, 1981.
- Bartley EE, Davidovich A, Barr GW, Grisfel GW, Dayton AD, Deyoe CW, Bechtel RM. Ammonia toxicity in cattle. *J Anim Sci*, v.43, p.835-841, 1976.
- Binelli M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes, 1, 2000, São Paulo. *Anais ...* São Paulo: USP/FMVZ, 2000. p.99-114.
- Bishonga C, Robinson JJ, McEvoy TG, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS. The effects of excess rumen degradable protein in ewes on ovulation rate, fertilization and embryo survival in vivo and during in vitro culture. *Anim Prod*, v.58, p.447-456, 1994.
- Blauwiel R, Kincaid RL, Reeves JJ. Effect of high crude protein on pituitary and ovarian function in Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.69, p.439-446, 1986.
- Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, v.55, p.1323-1340, 2001.
- Broderick GA. Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. Introduction. *J Nutr*, v.126, p.1324S-1325S, 1996.
- Broderick GA. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, v.86, p.1370-1381, 2003.
- Broderick GA, Clayton MK. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J Dairy Sci*, v.80, p.2964-2971, 1997.
- Butler WR. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.81, p.2533-2539, 1998.
- Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *J Anim Sci*, v.60-61, p.449-457, 2000.
- Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating

- dairy cattle. *J Anim Sci*, v.74, p.858-865, 1996.
- Chen G, Sniffen CJ, Russell JB.** Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: effects of protein quantity, protein solubility and feeding frequency. *J Dairy Sci*, v.70, p.983-992, 1987.
- Church DC.** *Basic animal nutrition and feeding*. 3.ed. New York: Wiley, 1988.
- Cunningham JG.** *Tratado de fisiologia veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- Currier TA, Bohnert DW, Falck SJ, Bartle SJ.** Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage. I. Effects on cow performance and the efficiency of nitrogen use in wethers. *J Anim Sci*, v.82, p.1508-1517, 2004.
- Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Drew SB, Biggadike HJ, Laven RA, Allison R, Collins CF, Wathes DC.** The effect of a diet containing excess quickly degradable nitrogen (QDN) on reproductive and metabolic hormonal profiles of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.195-208, 2004.
- Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Leese HJ, Hall CJ, Peters AR, Drew SB, Wathes DC.** Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.58, p.1443-1455, 2002.
- De Wit AAC, Cesar MLE, Kruip TAM.** Effect of urea during *in vitro* maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. *J Dairy Sci*, v.84, p.1800-1804, 2001.
- Detmann E, Paulino MF, Zervoudakis JT, Cecon PR, Valadares Filho SC, Gonçalves LC, Cabral LS, Melo AJN.** Níveis de proteína bruta em suplementos múltiplos para terminação em novilhos mestiços em pastejo durante a época seca; desempenho produtivo e características de carcaça. *Rev Bras Zootec*, v.33, p.169-180, 2004.
- Dunn TG, Moss GE.** Effects of nutrient deficiencies and excess on reproductive efficiency on livestock. *J Anim Sci*, v.70, p.1580-1593, 1992.
- Edwards, RG.** Follicular fluid. *J Reprod Fertil*, v.37, p.189-219, 1974.
- Elrod CC, Butler WR.** Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci*, v.71, p.694-701, 1993.
- Elrod CC, Van Amburgh WR, Butler WR.** Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J Anim Sci*, v.71, p.702-706, 1993.
- Fahey J, Boland MP, 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. *Anim Sci*, v.72, p.395-400, 2001.
- Ferguson JD, Blanchard T, Galligan DT, Hoshall DC, Chalupa W.** Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen. *J Am Vet Med Assoc*, v.195, p.659-661, 1988.
- Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M.** Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *J Dairy Sci*, v.76, p.3742-3746, 1993.
- Fox DG, Sniffen CJ, O'Connor JD, Russell JB, Van Soest PJ.** A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *J Anim Sci*, v.70, p.3578-3596, 1992.
- Garcia-Bojalil CM, Staples CR, Thatcher WW, Drost M.** Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*, v.77, p.2537-2548, 1994.
- Garcia-Winder M, Lewis PE, Deaver DR, Smith VG, Lewis GS, Inskoop EK.** Endocrine profiles associated with lifespan of induced corpora lutea in post partum beef cows. *J Anim Sci*, v.62, p.1352-1362, 1986.
- Gardner DK, Lane M.** Amino acids and ammonia regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*, v.48, p.377-385, 1993.
- Gilbert RO, Shin ST, Rabuffo TS, Chandler SK.** An *in vitro* model for the study of bovine endometrial physiology and pathophysiology. In: International Congress of Animal Reproduction, 13, 1996, Sydney. *Poster session proceedings ...* Sydney: ICAR, 1996. p.11.
- Hammon DS, Holyoak GR, Dhiman TR.** Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.86, p.195-204, 2005.
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR.** Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. *Anim Reprod Sci*, v.58, p.1-8, 2000.
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR, Sherod-Knight J, Evans RC.** Effects of high ammonia concentrations during IVM on oocyte maturation and *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology*, v.51, p.375, 1999.
- Hammon DS, Wang S, Liu G, Wiedmeier RD, Holyoak GR.** Effects of ammonia on *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology*, v.47, p.321, 1997.
- Higginbotham GE, Huber JT, Wallentine MV, Johnston NP, Andrus D.** Influence of protein percentage and degradability on performance of lactating cows during moderate temperature. *J Dairy Sci*, v.72, p.1818-1823, 1989.
- Hoover WH, Stokes SR.** Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. *J Dairy Sci*, v.74, p.3630-3644, 1991.
- Iwata H, Inoue J, Kimura K, Kuge T, Kuwayama T, Monji Y.** Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.215-223, 2006.
- Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, Swanson LV.** Relationship of dietary crude protein to composition of

- uterine secretions and blood in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*, v.66, p.1854-1862, 1983.
- Jordan ER, Swanson LV.** Effect of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein and albumin in the high-producing dairy cow. *J Dairy Sci*, v.62, p.58-63, 1979.
- Józwik M, Józwik M, Teng C, Battaglia, FC.** Amino acid ammonia and urea concentration in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. *Human Reprod*, v.21, p.2776-2782, 2006.
- Kane KK, Hawkins DE, Pulsipher GD, Denniston DJ, Krehbiel CR, Thomas MG, Petersen MK, Halford DM, Remmenga MD, Roberts AJ, Keisler DH.** Effects of increasing levels of undegradable intake protein on metabolic and endocrine factors in estrous cycling beef heifers. *J Anim Sci*, v.82, p.283-291, 2004.
- Kitamura SS.** *Intoxicação por amônia em bovinos e ratos: o desempenho renal na intoxicação e o emprego de tratamentos alternativos.* 2002. 117f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2002.
- Kopcha M.** Nutritional and metabolic diseases involving the nervous system. *Vet Clin North Am: Food Animal Pract*, v.3, p.119-135, 1987.
- Kubiak JZ, Weber M, Géraud G, Maro B.** Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes. *J Cell Sci*, v.102, p.457-467, 1992.
- Lane M, Gardner DK.** Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression, and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*, v.69, p.1109-1117, 2003.
- Lane M, Gardner DK.** Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil*, v.102, p.305-312, 1994.
- Lane M, Gardner DK.** Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by in situ enzymatic conversion to glutamate. *J Exp Zool Part A*, v.271, p.356-363, 1995.
- Laven RA, Biggadike HJ, Allison RD.** The effect of pasture nitrate concentration and concentrate intake after turnout on embryo growth and viability in the lactating dairy cow. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.111-115, 2002.
- Laven RA, Dawuda PW, Scaramuzzi RJ, Wathes DC, Biggadike HJ, Peters AR.** The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.41-52, 2004.
- Lehninger AL.** *Princípios de bioquímica.* São Paulo: Sarvier, 1986.
- Leng RA, Nolan JV.** Nitrogen metabolism in the rumen. *J Dairy Sci*, v.67, p.1072-1089, 1984.
- López J.** Uréia em rações para produção de leite. In: Simpósio sobre nutrição de bovinos, 2, 1984, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: FEALQ, 1984. p.200-225.
- Lucy MC.** Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci*, v.84, p.1277-1293, 2001.
- Mann GE, Lamming GE, Fray MD.** Plasma oestradiol during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci*, v.37, p.121-131, 1995.
- McCormick ME, French DD, Brown TF, Cuomo GJ, Chapa AM, Fernandez JM, Beatty JF, Blouin DC.** Crude protein and rumen undegradable protein effects on reproduction and lactation performance of Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.82, p.2697-2708, 1999.
- McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS.** Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim Reprod Sci*, v.47, p.71-90, 1997.
- McRae AC.** The blood-uterine lumen barrier and its possible significance in early embryo development. *Oxf Rev Reprod Biol*, v.6, p.129-173, 1984.
- Mikkola M, Mantysaari P, Yammiranta N, Peippo J, Taponen J.** Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.193-202, 2005.
- Moss GE, Parfet JR, Marvin CA, Aallrich RD, Diekman MA.** Pituitary concentrations of gonadotropins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. *J Anim Sci*, v.60, p.285-293, 1985.
- National Research Council (NRC).** *Nutrient requirements of dairy cattle.* 7.ed. Washington: National Academies Press, 2001.
- Nocek J, Russell JB.** Protein and carbohydrate as an integrated system. Relationship of ruminal availability to microbial contribution and milk production. *J Dairy Sci*, v.71, p.2070-2107, 1988.
- Nolan CJ, Bull RC, Sasser RG, Ruder CA, Panlasigui PM, Schoenemann HM, Reeves, JJ.** Postpartum reproduction in protein restricted beef cows: effect on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *J Anim Sci*, v.66, p.3208-3217, 1989.
- Nolan JV.** Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. *Austr J Agric Res*, v.47, p.227-246, 1993.
- Ocon OM, Hansen PJ.** Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *J Dairy Sci*, v.86, p.1194-1200, 2003.
- Oliveira ER, Paiva PCA, Babilônia JL, Moron IR, Cardoso RC, Oliveira JA.** Desempenho de novilhos suplementados com sal mineral protéico e energético em pastagem no período da seca. *Acta Sci Anim Sci*, v.28, p.323-329, 2006.
- Oliveira Jr RC, Pires AV, Fernandes JR, Susin I, Santos FAP, Araújo RC.** Substituição total do farelo de

- soja por uréia ou amiréia, em dietas com alto teor de concentrado, sobre a amônia ruminal, os parâmetros sanguíneos e o metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. *Rev Bras Zootec*, v.33, p.738-748, 2004.
- Oltner R, Emanuelson M, Wiktorsson H.** Urea concentration in milk in relation to milk yield, live weight, lactation numbers, and amount and composition of feed given to dairy cows. *Liv Prod Sci*, v.12, p.47-57, 1985.
- Orsi NM, Leese HJ.** Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts *in vitro*. *Reproduction*, v.127, p.131-140, 2004.
- Peixoto LAO, Brondani IL, Nornberg JL, Restle J, Alves Filho DC, Pazini M, Coradini MT, Santos CVM.** Perfil metabólico e taxas de concepção de vacas de corte mantidas em pastagem natural ou suplementadas com farelo de trigo com ou sem uréia. *Ci Rur*, v.36, p.1873-1877, 2006.
- Randel RD.** Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J Anim Sci*, v.68, p.853-862, 1990.
- Rhoads ML, Gilbert RO, Lucy MC, Butler WR.** Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *J Dairy Sci*, v.87, p.2896-2901, 2004.
- Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert R, Toole R, Butler WR.** Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.1-10, 2006.
- Roseler DK, Ferguson JD, Sniffen CJ, Herrema J.** Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.76, p.525-534, 1993.
- Rusche WC, Cochran RC, Corah LR, Stevenson JS, Harmon DL, Brandt Jr L, Minton JE.** Influence of source and amount of dietary protein on performance, blood metabolites, and reproductive function of primiparous beef cows. *J Anim Sci*, v.71, p.557-563, 1993.
- Russell JB.** *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca: [s.n], 2002.
- Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ.** A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I Ruminant fermentation. *J Dairy Sci*, v.70, p. 3351-3361, 1992.
- Russell JB, Rychlik JL.** Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, v.292, p.1119-1122, 2001.
- Santos FAP, Greco LF.** Digestão pós-ruminal de proteínas e exigências de aminoácidos para ruminantes. In: Simpósio Internacional avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 1, 2007, Pirassununga. *Anais...* Pirassununga: USP/FZEA, 2007. p.122-159.
- Sasser RG, Williams RC, Bull CA, Ruder CA, Falk DG.** Postpartum reproductive performance in crude protein-restricted beef cows: return to estrus and conception. *J Anim Sci*, v.66, p.3033-3039, 1988.
- Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TG.** Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets different in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci*, v.78, p.2670-2680, 2000.
- Sinclair KD, McEvoy TG, Carolan C, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ, Broadbent PJ.** Conceptus growth and development following the culture of ovine embryos in media supplemented with sera. *Theriogenology*, v.49, p.218, 1998.
- Sinclair KD, Sinclair LA, Robinson JJ.** 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. *J Anim Sci*, v.78, p.2659-2669, 2000.
- Sonderman JP, Larson IL.** Effect of dietary protein and exogenous gonadotropin-releasing hormone on circulating progesterone concentrations and performance of Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.72, p.2179-2183, 1989.
- Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD.** Insulin-like growth factor-1 in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *J Dairy Sci*, v.73, p.929-937, 1990.
- Staples CR, Garcia-Bojalil CM, Oldick BS, Thatcher WW, Risco CA.** Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggested mechanism, and blood and milk urea measurements. In: Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 4, 1993, Gainesville. *Proceedings...* Gainesville: University of Florida, 1993. p. 37-51.
- Stoppin-Mellet V, Peter C, Buendia B, Karsenti E, Lambert AM.** Tobacco BY-2 cell-free extracts induce the recovery of microtubule nucleating activity of inactivated mammalian centrosomes. *Biochim Biophys Acta*, v.1449, p.101-106, 1999.
- Swenson MJ, Reece WO.** *Dukes-Fisiologia dos animais domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- Taylor C, Rajamahendran R.** Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. *Can J Anim Sci*, v.74, p.281-285, 1994.
- Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL.** Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, v.71, p.1063-1072, 1988.
- Visek WJ.** Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. *Nutr Rev*, v.37, p.273-282, 1979.
- Wallace RJ.** Ruminant microbial metabolism of peptides and aminoacids. *J Nutr*, v.126, p.1326S-1334S, 1996.
- Wallace RJ, Cotta MA.** Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, PN. *The rumen microbial ecosystem*. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.217-250.
- Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R, Frolich T, Herrier A, Kolle S, Prella**



K, Reichenbach HD, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz F. Embryo-maternal communication in bovine-strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.276-289, 2003.

Zander DL, Thompson JG, Lane M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more sever after exposure at the cleavage stages. *Biol Reprod*, v.74, p.288-294, 2006.
