

LINCOLN DA SILVA AMORIM

**QUALIDADE DE OÓCITOS E EMBRIÕES DE CABRAS ALIMENTADAS  
COM URÉIA NA DIETA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A524q  
2008

Amorim, Lincoln da Silva, 1976-

Qualidade de oócitos e embriões de cabras alimentadas com uréia na dieta / Lincoln da Silva Amorim. – Viçosa, MG, 2008.

xiii, 99f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

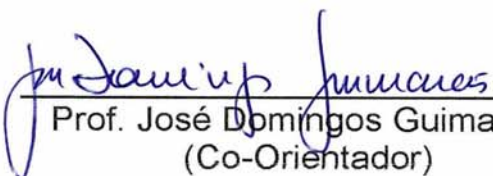
1. Cabra - Reprodução - Efeito da uréia. 2. Cabra - Embrião. 3. Folículos. 4. Ultrassonografia. 5. Embrião - Morfologia. 6. Uréia - Ciclo. 7. Esteroidogênese. 8. Hormônios. 9. Metabólitos. 10. Fluido folicular. 11. Sangue - Análise e química. 12. Laparotomia. 13. Oócitos - Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.39082

QUALIDADE DE OÓCITOS E EMBRIÕES DE CABRAS ALIMENTADAS  
COM URÉIA NA DIETA

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

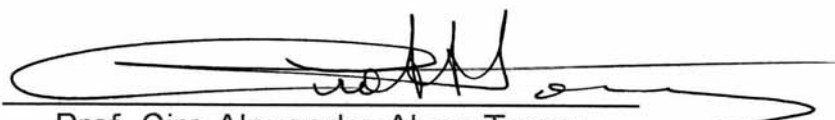
APROVADA: 30 de maio de 2008.

  
Prof. José Domingos Guimarães  
(Co-Orientador)

  
Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Co-Orientador)

  
Prof.<sup>a</sup> Nadja Gomes Alves

  
Prof. Antônio Bento Mâncio

  
Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Orientador)

*Aos meus pais por tudo que sou, por estarem sempre presentes na minha vida e pelos sacrifícios e renúncias que fizeram para me proporcionar oportunidades melhores. A minha mãe pelo seu esforço em lutar pela vida, e fazê-la valer a pena, vencemos mais essa!*

*Ao meu irmão por ser eu em casa, quando estava ausente e pela torcida.*

*À minha querida Avó Maria José, pelas orações, palavras de carinho e sabedoria.*

*À minha esposa Elenice, pela cumplicidade, incentivos e por dividir as alegrias e incertezas.*

*E a Deus, por permitir que minha família estivesse presente neste momento, para comemorar essa vitória comigo. E por tê-los colocado em meu caminho.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela acolhida e por proporcionar momentos inesquecíveis na minha vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos desde a iniciação científica até a bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Ciro Alexandre Alves Torres, pela orientação, estima e apoio durante estes anos de academia.

Ao amigo Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca (Embrapa Caprinos - Sobral/CE), meu muito obrigado pela acolhida em sua casa, pela parceria, estímulos, paciência, conselhos, exemplo de profissionalismo e pelas longas conversas.

Ao amigo Dr. Henrique Bruschi (Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG), pela credibilidade, acolhida na Granja Água Limpa, por dividir as alegrias e incertezas durante a realização dos experimentos.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana (Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG) pela atenção, ensinamentos, receptividade no Laboratório de Reprodução da Embrapa Gado de Leite e pelo auxílio durante as punções foliculares.

Ao amigo Prof. José Domingos Guimarães (Departamento de Veterinária da UFV) meus sinceros agradecimentos, por fazer parte da banca examinadora, pelos conselhos, ensinamentos, confiança e atenção desde a época da graduação até hoje e sempre que necessitei. Pela amizade construída durante esses anos e pela paz transmitida nos momentos de desespero. Dedico.

À amiga Prof<sup>a</sup>. Nadja Gomes Alves (Departamento de Zootecnia da UFLA) pela amizade, e por ser um ombro/orelha amigo(a) durante os desabafos ao telefone, pelos conselhos, sugestões e por fazer parte da banca examinadora.

Ao Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho (Departamento de Zootecnia da UFV), pela participação na banca examinadora e sugestões.

Ao Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues (Departamento de Zootecnia da UFV) pela atenção dispensada durante minhas dúvidas e questionamentos, pela elaboração das dietas experimentais e estima.

À Prof<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV) pela boa vontade em disponibilizar o uso incondicional do Laboratório de Biofármacos e pela atenção. Ao Carlos Cardoso do Nascimento (SCANLAB) pela boa vontade e pela doação dos kits hormonais e ao técnico do Laboratório de Biofármacos, José Carlos, pelo auxílio nas dosagens hormonais e metabólicas.

Aos professores da UFV: Adilson Ariza Zacaro, Antônio Bento Mâncio, Edênio Detmann, Eduardo Paulino da Costa, Giovanni Ribeiro de Carvalho, José Carlos Pereira, José Maurício de Souza Campos, Marcelo Teixeira Rodrigues, Mario Fonseca Paulino, Rita Flávia Miranda Oliveira, Rita Márcia Andrade Vaz de Mello, Sebastião de Campos Valadares Filho, Simone Eliza Facioni Guimarães e Tarcizio Antônio Rêgo de Paula pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas cursadas no Doutorado.

Ao Prof. James K. Graham (College of Veterinary Medicine e Biomedical Science - Colorado State University), pela receptividade e convivência que se transformaram em amizade, pela consideração, pelos conselhos, pela atenção dispensada desde a nossa chegada em Fort Collins, pelas boas rizadas e pela possibilidade de parcerias futuras. Dedico.

Ao Prof. George E. Seidel Junior (College of Veterinary Medicine e Biomedical Science - Colorado State University CSU) por me ensinar como ser um cientista independente da formação, pelas conversas, pela simplicidade e humildade na transmissão de conhecimentos, treinamento na PIV e ICSI. E acima de tudo, pela confiança, apoio durante a supervisão e condução de pesquisas no Laboratório de Produção *In Vitro* de Embriões e acolhida durante minha estadia no Animal Reproduction Biotechnology Laboratory – ARBL CSU. Dedico.

Aos Professores: Russell V. Anthony, Colin M. Clay, Thomas R. Hansen, Gordon D. Niswender, George E. Seidel Jr., Edward L. Squires e Rao Veeramachaneni D.N. pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas freqüentadas no ARBL CSU e uso de seus laboratórios.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Leite (CNPGL) e Caprinos (CNPC) pela colaboração.

À Shering Plough pela doação do Banamine®, Ciosin®.

À Tecnopec pela doação dos hormônios Folltropin® e Novormon®.

À Carbogel pela doação do gel usado durante as ultrasonografias.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UFV e Núcleo de Microscopia Eletrônica da UNESP Botucatu, pelo treinamento e uso de suas instalações e Microscópios Eletrônicos de Transmissão. Especialmente a Prof<sup>a</sup>. Eliza Gregório pela atenção e apoio logístico. E também ao Electron Microscopy Center – ARBL, CSU pelo uso do MET.

À comadre Amélia Cristina Mendes Magalhães, à amiga Márcia Candido e à companheira Nívea Felisberto pela inestimável ajuda, amizade e conselhos.

Ao Amigo Luiz Gustavo Bruno Siqueira, pela amizade firmada e companheirismo, construídos durante a realização dos experimentos de nossas teses e estadia na Embrapa Gado de Leite.

Ao Gilmar Pereira Alvin (Del) técnico do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite pela acolhida e auxílio nos momentos difíceis.

Aos “helpers”/estagiários: Alexandro Rubin Dias, Bruno Pena Carvalho, Eliza Diniz de Souza, Emílio César Martins Pereira, Fabiana Zambrini, Jenner Ferreira Couto, Kristian Peru, Leandro Magrão, Marina Lima Santos, Nathalia Bastos Dias, Pedro Monteiro Junior e Rodrigo Montes Claros pelo seu auxílio, companheirismo e compromisso durante a realização dos experimentos ou análises laboratoriais. Obrigado por tudo.

Às amigas do Graham Lab: Melissa Hudson, Melinda Meyers e Beth Spizziri, pela recepção, cuidados, generosidade e ajuda durante a estadia na CSU. Tudo seria difícil sem vocês!

Aos colegas e amigos do Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, especialmente os do Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões da CSU (*Dream Team*): Fernando Campos-Chillon, Fernanda Pliego, David Joshua Walker, Lerma C. O’Campo, Moisés Barcelo-Fimbres, Scott Purcell, Shannon M. C. Carter, Sara Rasmusen e a técnica de laboratório Zella Brinqs, pelo agradável convívio, troca de experiências, e principalmente pela compreensão. Em especial a Moisés e Josh, braços direito e às vezes

esquerdo, pela colaboração no treinamento na PIV e micromanipulação de embriões e oócitos. À pós-doutoranda Jennifer Barfield, por sua amizade, audaciosidade, apoio nos estudos com os embriões eqüinos e microscopia de epifluorescência, pelos conselhos profissionais, companheirismo na PIV, apoio logístico e pelas boas conversas. Obrigado por tudo, vocês sempre estarão em minha memória e em meu coração!

Aos colegas e amigos do curso de pós-graduação em Zootecnia da UFV: Amélia Cristina Mendes Magalhães, André Soares de Oliveira, Carla Aparecida Rodrigues, Dalton Henrique Pereira, Fabiana Lana de Araújo, Kátia Gobbi, Kleibe Moraes Silva, Ligia Vieira Lage dos Santos, Luiz Gustavo Bruno Siqueira, Márcia Candido, Nadja Gomes Alves, Nívea Felisberto, Renius Mello, Roberta G. M. V. V. Alexandrino, Rogério Matos e Renata Helena Branco pelas longas conversas, risadas e pela amizade que lembraremos mesmo que a distância nos separe.

Aos amigos brasileiros que encontrei em Fort Collins – CO, obrigado pela acolhida, amizade e pelos inesquecíveis momentos de alegria, que sem dúvida fizeram me sentir em casa.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, pela presteza e pela agradável convivência durante estes anos, em especial às secretarias: Celeste, Rosana e Márcia, obrigado pela atenção e prestimosidade.

Aos funcionários da granja Água Limpa, Município de Piau-MG, pela acolhida e agradável convivência.

Á todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação e realização do trabalho e que injustamente não foram citados, por culpa do meu esquecimento.

Ás cabras utilizadas nos experimentos desta tese, meu muito obrigado a estes animais notáveis e por terem sido impostas aos procedimentos experimentais deste trabalho. Meu respeito e gratidão.

Obrigado!

## BIOGRAFIA

Lincoln da Silva Amorim, filho de Hamilton Souza Amorim e Maria Aparecida Silva Souza, nasceu em Varginha em 05 de maio de 1976.

Graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) em maio de 2002.

Exerceu atividade de bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq na área de Reprodução Animal de março de 2000 a fevereiro de 2002.

Em fevereiro de 2004, obteve o título de Magister Science em Zootecnia, na área de Reprodução Animal, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2004, iniciou o Curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Prof. Ciro Alexandre Alves Torres, concentrando seus estudos na área de Fisiologia e Reprodução Animal.

De agosto de 2007 a setembro de 2008 foi pesquisador visitante do College of Veterinary Medicine and Biomedical Science do Department of Biomedical Science da Colorado State University, no Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory – ARBL, sob a orientação do Dr. George E. Sediell Jr.. Atuando no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à produção *in vitro* e criopreservação de embriões bovinos, ovinos e eqüinos.

Em 30 de maio de 2008, submeteu-se a defesa de tese para obtenção do título de Doctor Scientiae.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTORDUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Uréia e seu metabolismo em ruminante	4
2.2 Nutrição protéica e reprodução animal	10
2.3 Fluidos reprodutivos	12
2.4 Perfil dos metabólitos sangüíneos e enzimas hepáticas	15
2.5 <i>Status</i> folicular ao início da superovulação	16
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	18
CAPÍTULO 1	
<b><i>Qualidade do embrião e status folicular de cabras da raça Toggenburg alimentadas com dieta à base de uréia</i></b>	
Resumo	26
Abstract	28
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados e Discussão	40
Conclusões	51
Referências Bibliográficas	52
CAPÍTULO 2	
<b><i>Perfil hormonal e metabólico do sangue e do fluido folicular de cabras da raça Saanen alimentadas com uréia</i></b>	
Resumo	56
Abstract	57
Introdução	58
Material e Métodos	60
Resultados e Discussão	66
Conclusões	75
Referências bibliográficas	76
CAPÍTULO 3	
<b><i>Classificação dos folículos ovarianos e aspectos morfológicos de oócitos em cabras doadoras de gametas alimentadas com uréia na dieta</i></b>	
Resumo	82
Abstract	83
Introdução	84
Material e Métodos	85
Resultados e Discussão	91
Conclusões	96
Referências Bibliográficas	97
3. CONCLUSÕES GERAIS	99

## RESUMO

AMORIM, Lincoln da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Vicosa, maio de 2008. **Qualidade de oócitos e embriões de cabras alimentadas com uréia na dieta.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-orientadores: José Domingos Guimarães e Giovanni Ribeiro de Carvalho.

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito do fornecimento de dietas contendo uréia para cabras da raça Toggenburg sobre o número, a qualidade, o estágio de desenvolvimento embrionário e o *status* folicular antes da superovulação. Dezoito cabras foram divididas para receberem 0 (n=8) ou 2,4% (n=10) de uréia na matéria seca total da dieta (UMS). Após a adaptação semanais com concentrações intermediárias de uréia (0, 1,0 e 2,0% de UMS), as cabras foram sincronizadas e superovuladas e os embriões coletados pela técnica transcervical entre o sétimo e o oitavo dia após a cobertura. Os embriões coletados foram classificados quanto a sua qualidade e estágio de desenvolvimento de acordo com os critérios morfológicos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Os ovários foram examinados por ultrassonografia transretal antes da primeira aplicação de FSH para mensurar o diâmetro e a contagem do número de folículos em cada categoria de diâmetro. A duração do estro e o intervalo da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona ao início do estro não foram influenciados pelo tratamento com uréia na dieta ( $P>0,05$ ). Onze cabras responderam à superovulação. O número de estruturas e de embriões não diferiu entre os animais dos tratamentos ( $P>0,05$ ). O número e a percentagem de embriões viáveis e o número e a percentagem de embriões excelentes e bons também não foram influenciados pela adição de 2,4% de uréia na matéria seca. Os embriões coletados das cabras alimentadas com uréia apresentaram estágio de desenvolvimento mais avançado que aqueles provenientes de animais não alimentados com uréia. O *status* folicular antes da aplicação da primeira dose de FSH revelou que o número de folículos com diâmetro menor que 5 mm foram menores no grupo alimentado com uréia ( $P<0,05$ ). No segundo experimento, dez cabras da raça Saanen receberam as mesmas dietas descritas no experimento anterior (0% de UMS, n=5 e 2,4% de UMS, n=5) para se avaliar o efeito da uréia na dieta sobre o perfil metabólico do

sangue (glicose e uréia) e o perfil metabólico (glicose e uréia) e hormonal (estradiol, progesterona e testosterona) do fluido folicular. As cabras foram submetidas à laparotomia para aspiração dos maiores folículos presentes em cada ovário e tiveram seu sangue coletado no dia da aspiração folicular. As concentrações foliculares de estradiol diminuíram nos animais alimentados com uréia e as concentrações de testosterona aumentaram, em relação àqueles não alimentados com uréia ( $P < 0,05$ ). As concentrações de progesterona no fluido folicular não diferiram entre os animais alimentados com as diferentes dietas ( $P > 0,05$ ), entretanto estas apresentaram maiores médias no tratamento com 2,4% de UMS. A relação estradiol/progesterona foi menor no fluido folicular dos animais do tratamento com 2,4% de UMS ( $P < 0,05$ ). No terceiro experimento, a resposta a estimulação ovariana foi verificada em 10 cabras da raça Saanen alimentadas com uréia na dieta (0, n=5 e 2,4% UMS, n=5) e submetidas a laparotomia para avaliação da resposta ovariana após estímulo hormonal e a qualidade dos oócitos recuperados. A resposta ovariana não foi influenciada pela alimentação com uréia ( $P > 0,05$ ). A alimentação com dietas com 2,4% de uréia na matéria seca proporcionou maior recuperação de oócitos desnudos, parcialmente desnudos e ou degenerados em relação às fêmeas submetidas à alimentação sem uréia na dieta ( $P < 0,05$ ). Maior proporção de oócitos desnudos, parcialmente desnudos e ou degenerados foi encontrada em relação aos demais quando estes foram recuperados de cabras alimentadas com uréia ( $P < 0,05$ ). Foram encontrados dois tipos morfológicos de citoplasma em cabras da raça Saanen, que diferiram pela coloração e aspecto, entretanto estes não apresentaram diferenças entre os animais alimentados com diferentes concentrações de uréia na dieta ( $P < 0,05$ ).

## ABSTRACT

AMORIM, Lincoln da Silva Amorim, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2008. **Oocyte and embryo quality from goats feed with urea on the diet.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisers: José Domingos Guimarães and Giovanni Ribeiro de Carvalho.

The first experiment was designed to evaluate the effect of urea concentration in the diet of Toggenburg breed goats on the number, quality, developmental stage and follicular status prior to superovulation. Eighteen goats were randomly assigned to receive 0 (n=8) or 2.4% (n=10) of urea in the dry matter of the diet (UDM). After weekly adaptation to intermediary concentrations of urea in the diet (0, 1.0 and 2.0% UDM), goats were synchronized and superovulated and embryos flushed by transcervical technique between the seventh and eighth day after mating. The embryo collected was graded by quality and developmental stage using the criteria determined by International Embryo Transfer Society (IETS). The ovary was scanned (examined) by transrectal ultrasonography before the first FSH administration to measure the diameter and to count the number of follicles included in each diameter category. The estrus length and the interval between the withdrawal of vaginal progesterone device to the onset of estrus was not influenced by urea treatment on diet ( $P>0.05$ ). Eleven goats responded to superovulation. The number of structures and embryos were not different between the treatments ( $P>0.05$ ). The number and percentage of viable embryos and the excellent/good ones were not affected by the addition of 2.4% of UDM. Embryos flushed from goats fed with urea showed an advanced developmental stage compared to the ones not fed urea ( $P<0.05$ ). The follicular status before FSH administration showed a small number of follicles with diameter less than 5 mm in animals fed with urea ( $P<0.05$ ). In the second experiment, ten Saanen breed goats were distributed randomly and feed with 0 (n=5) and 2.4% (n=5) of UDM in accord to evaluate the effect of urea in the diet on the blood glucose and urea metabolic profile and hormones (oestradiol, progesterone and testosterone) and glucose and urea metabolic profile in the follicular fluid. Laparotomy was performed to aspirate the big follicles in each ovary and jugular blood was punctured on day of aspirations. The follicular oestradiol concentrations declined in the animals fed with urea and testosterone

concentrations increased, when compared to the animals not fed urea ( $P < 0.05$ ). Follicular fluid progesterone concentrations did not differ among animals fed with the different diets tested ( $P > 0.05$ ), nevertheless the mean absolute number was greater in the 2.4% of urea treatment. Estradiol/progesterone rate was lower in the follicular fluid from animals fed with 2.4% UDM ( $P > 0.05$ ). In the third experiment, the stimulatory response, the oocyte quality and the morphology were determined from ten Saanen breed goats randomly distributed in to two treatments (0 and 2.4% of urea UDM) and were submitted to laparotomy in order to evaluate the ovarian response after hormonal stimuli and the quality of recovered oocytes. The ovarian response was not affected by urea level ( $P > 0.05$ ). Diets with 2.4% of urea increased the recovery rate of denuded oocytes, partially denuded and or degenerated in relation to the animals not fed urea ( $P < 0.05$ ). High proportion of denuded oocytes, partially denuded and, or degenerated were recovered compared to the other categories from animals fed with 2.4% of UDM ( $P > 0.05$ ). Two morphological types of cytoplasm were found in Saanen goats, with differ by color and aspect, on the other hand they were not affected by urea concentrations in the diet ( $P < 0.05$ ).

## 1 – INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento da caprino-ovinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial. Esse crescimento foi intensificado, sobretudo nos países em desenvolvimento nos últimos anos, que são detentores dos maiores rebanhos. Projeta-se um crescimento da ordem de cinco vezes o rebanho atual nos próximos 20 anos, multiplicando o rebanho atual em mais de 50 milhões de cabeças (FONSECA, 2005). Dentro dessa perspectiva, há uma necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho para que possa haver um aproveitamento mais eficiente dos genótipos utilizados. Aliado a este aumento, demanda-se um conhecimento maior sobre as relações existentes entre a nutrição e reprodução destes rebanhos.

Na região Sudeste, as principais raças exploradas para a produção de leite são a Saanen, Alpina e Toggenburg, ou mestiças destas, sendo os sistemas de produção tecnificados, com animais mantidos confinados em áreas restritas ou galpões e a alimentação fornecida no cocho diariamente.

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) foram introduzidas na indústria caprina e ovina com os objetivos principais de acelerar o ganho genético de animais superiores e de superar alguns obstáculos de eficiência reprodutiva (SMITH, 1986). Estas biotecnologias vêm sendo cada vez mais adotadas em rebanhos tecnificados da região Sudeste do país.

Em relação à produção de embriões *in vivo*, fatores como a sanidade e o estado nutricional do rebanho, a técnica de colheita e transferência dos embriões e o manejo dos animais, podem ser controlados até certo ponto. Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões aos tratamentos super-estimulatórios com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE aliado a outros fatores de ordem nutricional.

Com o incremento da produção *in vitro* de embriões caprinos e ovinos nos últimos anos, estes têm contribuído de maneira significativa para a multiplicação de genótipos de alta qualidade, bem como servindo de base para estudos sobre o metabolismo e desenvolvimento embrionário (SEIDEL,

comunicado pessoal). A produção *in vitro* de embriões nos pequenos ruminantes tem uma importância fundamental principalmente devido à produção de material para pesquisa básica a um baixo custo. Estes estudos possibilitam a introdução comercial de biotecnologias de ponta como transferência nuclear e produção de transgênicos (COGNIÉ et al., 2003). E ainda, a recuperação de oócitos de boa qualidade de animais vivos para produção de embriões *in vitro* de animais geneticamente superiores tem se apresentado promissor no cenário da caprinocultura atual.

A eficiência produtiva e econômica dos sistemas de produção animal depende, em grande parte, do uso de medidas racionais de manejo, sobretudo no tocante à nutrição dos animais, visto que a alimentação representa uma fração significativa dos custos de produção. Neste sentido, o correto balanceamento das dietas possui grande importância, sendo necessário para isso o acurado conhecimento das exigências nutricionais dos animais, assim como da composição bromatológica e da disponibilidade de nutrientes nos distintos alimentos.

A substituição de alimentos protéicos por fontes de baixo custo como a uréia tem sido feita há muitos anos de forma a diminuir os custos de produção da proteína da dieta. As primeiras pesquisas com este elemento datam da década de 70 e ainda hoje continuam despertando o interesse, pois esta pode ter efeitos tanto na produção como na reprodução das diferentes espécies de ruminantes.

Até o presente momento sabe-se que dietas com elevada concentração de proteína bruta (PB) na dieta, altas concentrações de proteína degradável no rúmen (PDR) e aumentos nos perfis metabólicos e intra-foliculares de substâncias relacionadas com o metabolismo da proteína da dieta, foram relacionados à falhas reprodutivas, efeitos adversos na qualidade embrionária e alterações no desenvolvimento de oócitos das diferentes espécies de ruminantes domésticos. Entretanto, seu exato mecanismo de ação e as vias pelas quais estes fatores prejudicam a reprodução de maneira geral permanecem desconhecidos ou pouco esclarecidos. E ainda, considerando a produção de embriões *in vitro* pelo aspecto da eficiência, esta tem sido prejudicada por compostos gerados pelos meios de maturação e cultivo e suas condições, os quais são também relacionados ao metabolismo de proteínas ou

aminoácidos dos embriões, que de alguma maneira causam efeitos adversos no desenvolvimento futuro destes. Ou ainda, em sistemas de maturação e cultivo *in vitro*, a amônia gerada pelo metabolismo e aquela da quebra espontânea dos aminoácidos é tóxica para gametas e embriões.

Há que considerar que o tipo e a qualidade/quantidade da dieta fornecida a fêmeas antes de se iniciar os programas de superestimulação tem forte influência sobre a função ovariana, desenvolvimento e qualidade dos oócitos recuperados, capacidade de maturação/fertilização/clivagem *in vitro*, resposta superovulatória e qualidade embrionária *in vivo*. Portanto, uma avaliação de dietas que poderiam diminuir os custos de produção da proteína para cabras doadoras de oócitos e embriões, se faz necessária.

Pelo exposto, objetivou-se avaliar os efeitos do fornecimento de duas dietas, sem e com a presença de uréia (0 e 2,4% na MS total da dieta) para cabras Toggenburg e Saanen, a fim de avaliar a resposta à superovulação, a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário, o *status* folicular ovariano prévio à superovulação, as concentrações hormonais e de metabólitos do sangue e do fluido folicular, a qualidade dos oócitos, e a resposta ovariana.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Uréia e seu metabolismo em ruminantes

Entre os alimentos concentrados, os suplementos protéicos têm sido responsáveis pelo alto custo da alimentação. As proteínas são fontes de aminoácidos e são constituintes de todas as células corporais, e por isto são componentes essenciais das dietas. Portanto, o conhecimento da utilização de compostos nitrogenados é interessante sob o ponto de vista da produção animal.

A proteína bruta contida nos alimentos ( $N \times 6,25$ ) é composta por uma fração degradável (PDR) e uma não degradável (PNDR). Esta última atravessa o ambiente ruminal livre da ação microbiana, podendo ser digerida no abomaso e duodeno. Por outro lado, a fração degradável é fermentada no rúmen originando, dentre outros compostos, peptídeos, aminoácidos e amônia, os quais podem ser utilizados para síntese de proteína microbiana (NRC, 2007).

Os produtos nitrogenados não protéicos (NPN), em especial a uréia tem sido, durante anos, tema de centenas de pesquisas no Brasil e no mundo, especialmente por se tratar de um substituto da proteína, de baixo custo e relativa facilidade de administração. Possivelmente, WEISKE (1879) citado por HELMER e BARTLEY (1971) foi o primeiro a sugerir o uso de uréia como substituto a proteína na dieta de bovinos. E desde então a mesma vem sendo incluída na dieta de ruminantes. Mas, foram as pesquisas de HART et al. (1939), que demonstraram os aspectos nutricionais da utilização de uréia na dieta de ruminantes e oficialmente, na época, foi incorporada à alimentação de bovinos nos EUA (HELMER e BARTLEY, 1971).

Estudos recentes têm revelado relações entre nutrição e melhora da fertilidade de ruminantes nos períodos onde a sensibilidade aos fatores nutricionais é maior, como na produção de gametas. Observa-se a necessidade de utilização de formulações nutricionais precisas que atendam as necessidades das diferentes espécies de ruminantes e genótipos, assim como dos diferentes sistemas de produção em que os animais são mantidos e das biotecnologias reprodutivas as quais são submetidos (ROBINSON et al., 2006).

A uréia foi descoberta por Hilaire Rouelle em 1773. Foi o primeiro composto orgânico sintetizado artificialmente em 1828 por Friedrich Woehler, obtido a partir do aquecimento do cianato de amônio (sal inorgânico) (WIKIPEDIA, 2008).

A uréia exógena é uma fonte de nitrogênio não protéico altamente solúvel em água e em álcool. Constitui um composto orgânico (contendo nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono), sólido de cor branca e cristalina por meio do sistema prismático (Figura 1a) e sabor amargo. É classificada quimicamente como amida e, por isso, é considerada um composto NNP, possui em sua composição pequena quantidade de ferro e chumbo, que não são considerados tóxicos (TEIXEIRA e SALVADOR, 2004).

A uréia sintética é um produto químico obtido a partir da síntese da amônia com o dióxido de carbono, sob condições elevadas de temperatura e pressão. O produto tem a fórmula estrutural  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  (Figura 1b) e apresenta na sua composição 46,4% de nitrogênio; 0,55% de biureto; 0,25% de água; e 0,08% de amônia livre e cinzas, e sua forma tridimensional é apresentada na Figura 1b. É encontrado na maioria das vezes no estado sólido, higroscópico e possui elevada solubilidade em água, álcool e benzina (COELHO DA SILVA e LEÃO, 1979).

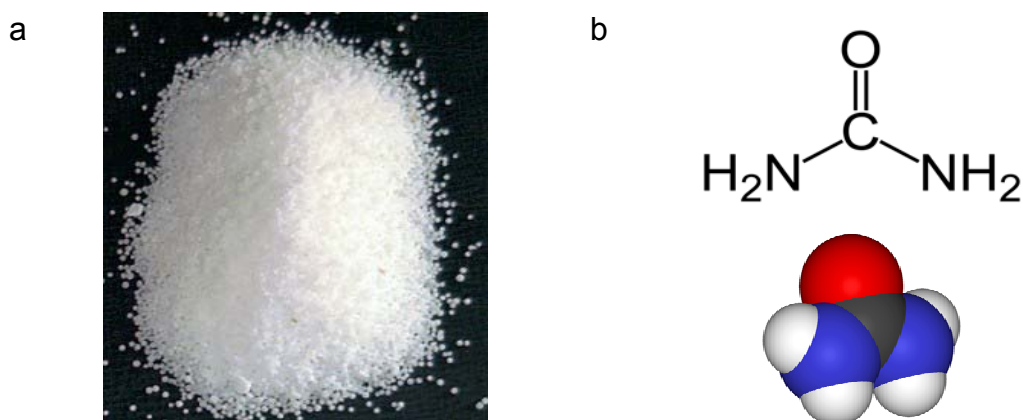


Figura 1. Uréia: a – Aspecto físico, b – Fórmula química e tridimensional.

Considerada como fração imediatamente solúvel em água ou fração A pelo sistema CNCPS (Cornell Net Carbohydrate and Protein System); (FOX et

al., 1992), a uréia também pode fornecer nitrogênio para produção de proteína microbiana, pois possui o nitrogênio em sua molécula sob a forma de dois grupos amina (LEHNINGER, 1986). Conforme demonstrado na Figura 1b.

Os ruminantes, por serem associados simbioticamente com a microbiota ruminal, dispõem da uréase microbiana e, sendo assim, são aptos a aproveitarem a uréia como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana (RUSSEL e RYCHLIK, 2001).

Ao entrar em contato com o fluido ruminal, a uréia sofre hidrólise por ação da enzima urease, produzida pelas bactérias ruminais, sendo então convertida em amônia (Figura 2). A urease provoca a ruptura das ligações da molécula de uréia juntamente com uma molécula de água, sendo produto desta reação duas moléculas de amônia (NH<sub>3</sub>) e uma molécula de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

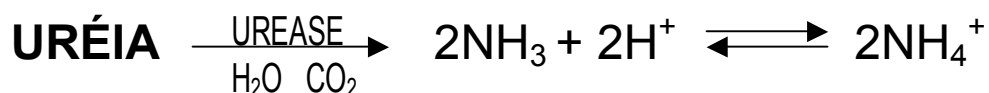


Figura 2. Esquema de hidrólise de uréia no rúmen.

Dependendo do pH ruminal a uréia é transformada em amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou amônia (NH<sub>3</sub>) (VISEK 1984). Quanto mais alto o pH ruminal maior a concentração de NH<sub>3</sub>. Enquanto que amônio é hidrossolúvel e não absorvido pela parede ruminal a amônia é lipossolúvel e muito disponível para ser absorvida.

Quando existe inapropriada disponibilidade de carboidratos prontamente fermentáveis na dieta ou ainda quando o pH ruminal está elevado, há um aumento da função das bactérias produtoras de uréase e a habilidade de produção de proteína microbiana é superada, resultando na produção excessiva de amônia, levando a alcalose sistêmica e encefalopatia (NRC, 2007).

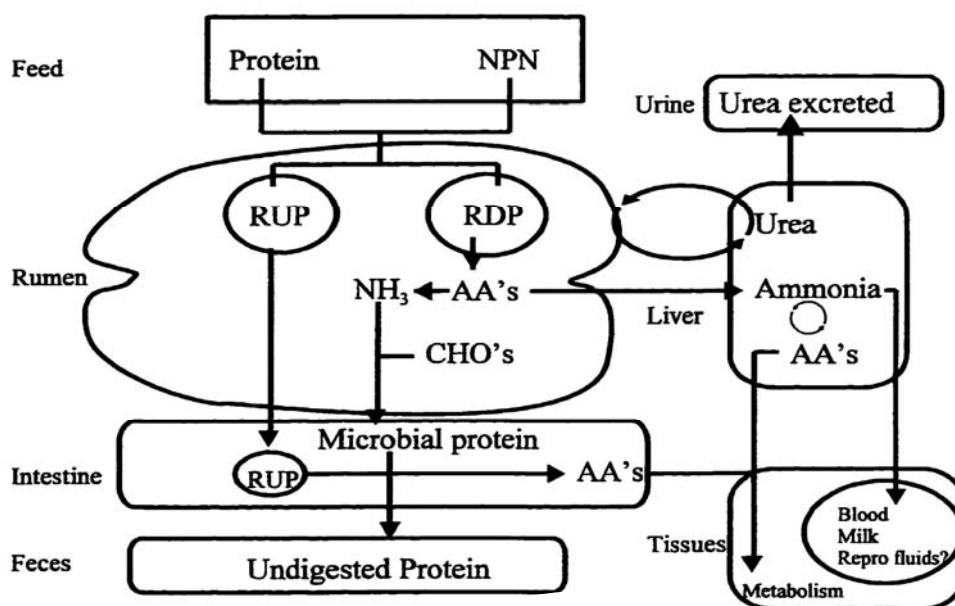
A produção de amônia no interior do rúmen e a sua presença no intestino podem difundir-se rapidamente do trato digestivo para o sangue

portal. O fluxo portal de amônia pode representar 16 a 95% do nitrogênio ingerido e está diretamente relacionado com o consumo de nitrogênio digestível. Além disso, tende a aumentar com o uso de fontes protéicas de maior degradabilidade ruminal (VAN SOEST, 1994).

A absorção de amônia é diretamente proporcional a sua concentração ruminal e aumenta com o aumento do pH do fluido ruminal, conforme dito anteriormente. Desse modo, sua absorção ocorre por difusão passiva da sua forma dissociada, ou seja, de sua forma não carregada eletricamente. O fígado capta praticamente toda a amônia que chega até a si pelo sistema portal, podendo utilizar uma parte em reações de transaminação, mas principalmente, convertendo-a em uréia, ciclo da uréia (Figura 3).

Este ciclo consiste em cinco etapas que são controladas enzimaticamente. Sendo catalizadas pela carbamil fosfatase sintetase, (CPS-1), ornitina transcarbamilase (OTC), arginino succinato sintetase, argininosuccinase e arginase. O fígado é o órgão mais importante na síntese de uréia, porque as enzimas CPS-1 e OTC são muito limitadas às mitocôndrias hepáticas. A CPS-1 é ativada pelo N-acetyl-glutamato ou por um de seus análogos. O N-acetyl-glutamato é sintetizado por uma enzima mitocondrial, a acetylglutamato sintetase, a qual é estimulada pela arginina. As outras três enzimas do ciclo da uréia são enzimas citosólicas e têm atividades limitadas em vários outros órgãos. Dentro do ciclo da uréia, a CPS-1 e a argininosuccinase sintetase, são fatores limitantes. A ornitina, a citrulina e a arginina, são carreadores essenciais de nitrogênio nesse processo (VISEK, 1979).

Esta conversão custa para o animal 12 kcal/g de nitrogênio (VAN SOEST, 1994). Assim com o fluxo portal de amônia, a produção hepática de uréia endógena está diretamente relacionada ao consumo de nitrogênio digestível. Da uréia produzida pelo fígado (a partir da amônia originada no trato digestivo e de aminoácidos deaminados), uma parte é excretada na urina, uma parte na saliva e outra parte passa diretamente da circulação para o lúmen do trato digestivo pelo epitélio (Esquema 1).



Esquema 1. Vias pelas quais a uréia e amônia podem percorrer. Fonte: HAMMON, 1998.

A uréia sangüínea é o produto final do metabolismo de aminoácidos, sendo produzida por todos os mamíferos como forma de eliminar o excesso de nitrogênio (BANKIR 1996).

A uréia, forma de excreção do nitrogênio resultante do catabolismo protéico dos mamíferos pode ser reciclada ao ambiente ruminal, tanto pela saliva como pelo sangue e utilizada como fonte de nitrogênio pelos microrganismos ruminais. O nível médio de nitrogênio na saliva gira em torno de 0,1 a 0,2%, dos quais 60-80% estão na forma de uréia. Contudo, este teor é extremamente variável, sendo reflexo direto da concentração de uréia no plasma, podendo variar de cerca de 8 mg/dL em dietas com baixo teor protéico, até 40 mg/dl em dietas com alto teor de proteína (CHURCH, 1988). No entanto, OBARA e SHUNBAUASHI (1979), citados por CHURCH (1988), afirmaram que altos níveis de amônia no rúmen ou no sangue jugular podem inibir a secreção pelas glândulas parótidas. O excesso de PB ou de PDR e o fornecimento de uréia na dieta como fonte de nitrogênio foram associados à elevada concentração de N-uréico no soro (SUN) ou plasma (PUN) e ainda a elevações nas concentrações de N-uréico no leite (NUL).

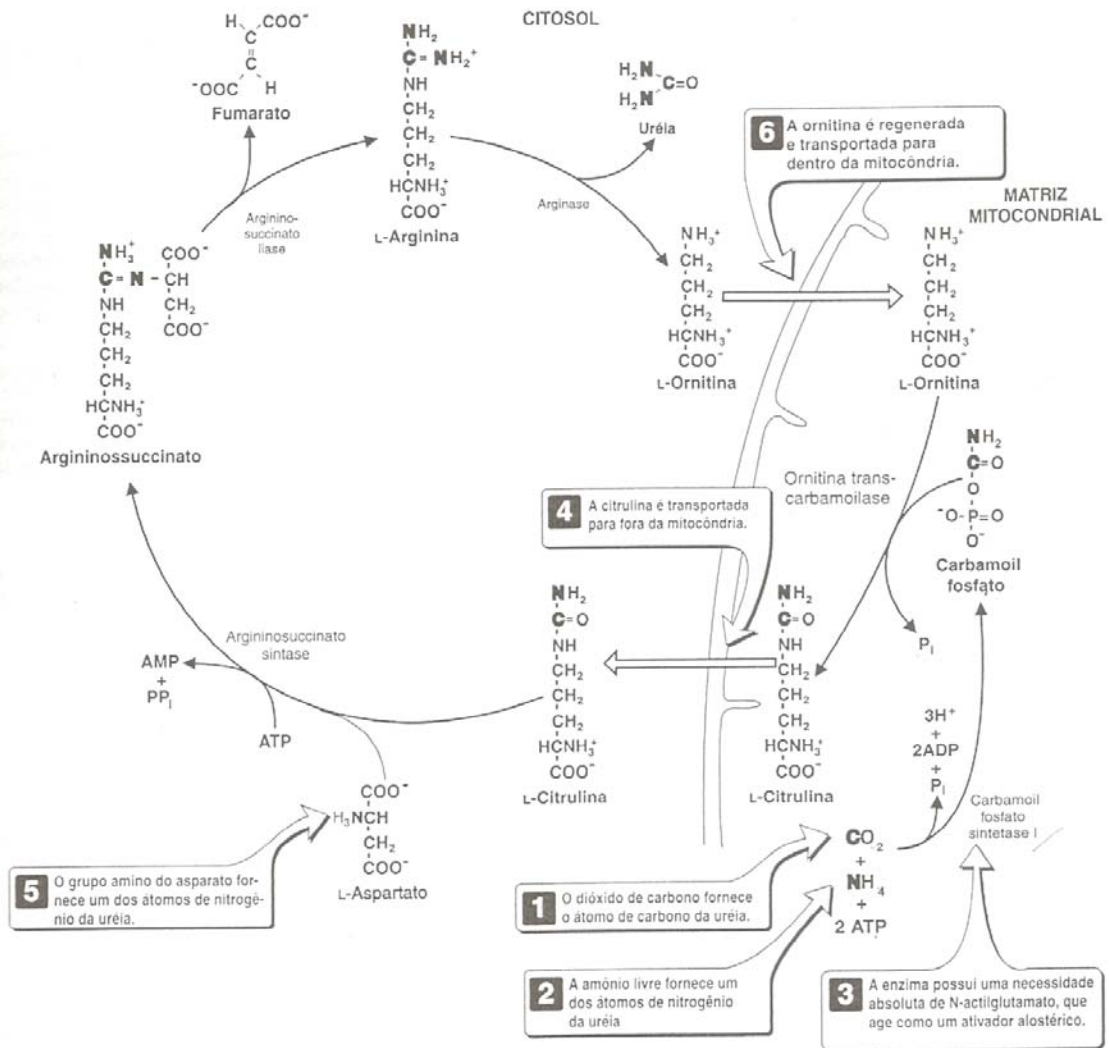


Figura 3. Ciclo da uréia no fígado. Fonte CHAMPE & HARVEY, 1996.

Pelo sangue, a uréia pode chegar ao rúmen por difusão via parede ruminal, sendo imediatamente convertida a amônia pelas bactérias ureolíticas que habitam a parede do rúmen. Segundo VAN SOEST (1994) o nível de amônia no sangue tende a ser menor que no rúmen, ao passo que a concentração de uréia é menor no rúmen que no sangue, criando assim um potencial favorável de transferência mútua para os dois compostos. Contudo, resultados de ENGLHARDT et al. (1978), citados por VAN SOEST (1994), apontaram que a atividade ureolítica dos microrganismos da parede ruminal é reduzida a altas concentrações de amônia no rúmen, o que pode afetar a atividade ureolítica e assim, a eliminação de uréia para o rúmen, dificultando o gradiente de concentração via parede.

O NRC (1985; 1989) estimam que o nitrogênio reciclado varia de um alto valor de 70% da proteína consumida, em uma dieta com 5% de proteína, a um baixo valor de 11% da proteína consumida, em uma dieta com 20% de proteína bruta. Por outro lado, VAN SOEST (1994) sugeriu que a quantidade de uréia reciclada é relativamente independente do nitrogênio dietético, visto que, o “pool” corporal de uréia está sob controle homeostático, então esta tenderia a ser constante, ou seja, numa situação de baixo nível de consumo de nitrogênio, uma grande proporção do nitrogênio metabolizado pelo animal é reciclado na forma de uréia e uma pequena porção é excretada pela urina. Porém, quando a ingestão de nitrogênio dietético é alta, a porcentagem de uréia que é degradada diminui, com o restante sendo perdido pela urina. Em animais de alta produção, os elevados níveis de consumo diluem o nitrogênio reciclado, a um ponto em que se torna sem importância e o rúmen fica mais dependente das fontes exógenas de nitrogênio e proteínas solúveis para suprir as exigências microbianas.

Embora o uso da uréia proporcione várias vantagens na alimentação de ruminantes, como diminuição do custo do nitrogênio da ração, a sua utilização inadequada pode acarretar sérios danos a saúde animal, tais como problemas de intoxicação e principalmente desordens reprodutivas.

As concentrações de uréia não devem exceder 1% da matéria seca da dieta ou 1/3 da proteína total oferecida para dietas em vacas (NRC, 2001), cabras (NRC, 1981, 2007) e ovelhas (NRC, 1985).

## **2.2. Nutrição protéica e reprodução animal**

Embora o uso da uréia proporcione várias vantagens na alimentação de ruminantes, como diminuição do custo do nitrogênio da ração, a sua utilização inadequada pode acarretar sérios danos a saúde animal, tais como problemas de intoxicação e principalmente desordens reprodutivas.

A amônia é considerada um produto tóxico decorrente do metabolismo ruminal e pode reduzir a fertilidade, quando do consumo de uréia alimentar e da incapacidade do fígado em transformar a amônia em uréia além de certos limites. No sangue, a elevação dos teores de amônia, uréia ou outros

compostos nitrogenados não identificados (purinas, pirimidinas, biureto, alcalóides, sais de amônio e nitrato) conduzem à elevação de uréia e amônia em tecidos reprodutivos e fluidos (VISEK, 1984). Dietas com concentrações de proteína elevadas tem sido associada com redução da fertilidade e tem sido reportada na literatura, utilizando diferentes espécies de ruminantes como modelos para se elucidar tais efeitos.

A composição iônica, metabólica e hormonal das secreções dos órgãos genitais pode ser alterada pela quantidade de compostos nitrogenados da dieta, afetando a viabilidade dos espermatozóides, oócitos (AMORIM et al., 2007, FERREIRA, 2007) ou embriões (ALVES, 2005; ALVES, 2007), por meio de efeitos no metabolismo celular, resultando em redução da fertilidade.

Concentrações de uréia ou amônia plasmática tem sido reportada como sendo prejudicial a reprodução de diferentes espécies de ruminantes. Diferentes concentrações e quantidades de uréia na dieta vêm sendo testadas ao longo dos anos nas dietas destes animais, sem um rigor em relação ao sincronismo entre a quantidade de energia e proteína, gerando assim efeitos significativos ou não na reprodução destes animais.

E ainda, o período de fornecimento de uréia também parece ser outro fator relevante na qualidade dos embriões gerados em animais previamente adaptados ou não a dietas com uréia (DAWUDA et al., 2002).

O excesso de amônia ou uréia no sangue pode alterar o eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal pelo decréscimo da amplitude e freqüência dos pulsos de hormônio luteinizante (LH) (KAUR e ARORA, 1995) e por interferir com a ligação de LH aos receptores ovarianos (HAOUR et al., 1974, citados por JORDAN et al., 1983), ocasionando redução da secreção de progesterona (PIRES e SUSIN, 1994) e, conseqüentemente, da fertilidade, visto que, esse hormônio é essencial ao desenvolvimento embrionário inicial e à posterior manutenção da gestação.

Maior concentração de progesterona sérica em vacas que receberam 12,7% de PB na dieta, em comparação às que receberam 16,3% e 19,3% de PB, no 14<sup>o</sup> dia do primeiro ciclo estral pós-parto, foi observado por JORDAN e SWASON (1979). JORDAN et al. (1983) verificaram que a concentração de progesterona plasmática no 15<sup>o</sup> dia do ciclo estral foi de 19% maior nas vacas que receberam 12% de PB na dieta, em comparação às que receberam 23%

de PB. Da mesma forma, SONDERMAN e LARSON (1989) relataram que a concentração de progesterona sérica no 12<sup>o</sup> dia do ciclo estral foi maior nas vacas que consumiram dietas com 14% de PB do que naquelas que consumiram dietas com 20% de PB (4,91 vs 3,47 ng/mL). Contudo SINCLAIR et al. (2000) verificaram que o fornecimento de dietas que ocasionaram elevação da concentração de progesterona plasmática entre os dias quatro e 11 do ciclo estral e maior pico de progesterona plasmática (8,9 vs 6,8 µg/L) no 14<sup>o</sup> dia do ciclo estral em novilhas.

Entretanto, BLAUWIEKEL et al. (1986) não observaram diferença na concentração de progesterona sérica no dia do estro e durante a fase lútea do ciclo estral em vacas não-lactantes que consumiram dietas com 15% ou 25% de PB. Também ELROD e BUTLER (1993) não observaram diferenças na concentração de progesterona plasmática em novilhas que receberam quantidade adequada ou excesso de PDR na dieta. Segundo BUTLER et al. (1996), a concentração de progesterona plasmática e sua taxa de aumento nos cinco dias subseqüentes a IA não diferiram entre vacas com concentração de PUN inferior ou superior a 19 mg/dL.

### **2.3. Fluidos reprodutivos**

Considerando que as dietas podem causar uma alteração rápida e imediata em uma variedade de fatores humorais, os quais podem alterar as vias sinalizadoras hormonais e metabólicas, que são cruciais para a função dos fenômenos reprodutivos, então as dietas podem ser causadoras de distúrbios metabólicos e hormonais (O'CALLAGHAN et al., 2000; BOLAND et al., 2001; DISKIN et al., 2003).

As tubas uterinas têm a função de conduzir os espermatozóides e oócitos recém ovulados em direções opostas para que ocorra a fertilização. Após a fertilização, os embriões permanecem nas trompas por mais ou menos três dias antes de alcançarem o útero (HAFEZ, 1995). Portanto, o desenvolvimento inicial dos embriões ocorre nesta porção do trato reprodutivo, sob o controle de um ambiente irrigado por fluidos secretados por células secretoras não ciliadas. Considerando que a análise bioquímica do fluido do

oviduto indicou que a secreção consiste de uma mistura de componentes de origem plasmática e produtos específicos derivados do metabolismo dos tecidos (THIBAUT et al., 1993), assim, alterações dos componentes bioquímicos do sangue podem ocasionar alterações neste ambiente e serem prejudiciais a fertilização e desenvolvimento inicial do embrião. Assim, o bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez está intimamente relacionado ao ambiente uterino-tubárico.

Segundo CHALMERS et al. (1971) citados por VISEK, (1984) a amônia e a uréia podem se difundir do trato alimentar para a cavidade peritoneal e para a circulação periférica por difusão simples, atingindo assim os órgãos reprodutivos, visto suas facilidades de atravessarem a membrana plasmática. Falhas no transporte de embriões provenientes de ovelhas alimentadas com excesso de proteína acarretaram mais tempo na ampola e, portanto exposição ao *milieu intérieur* deste compartimento (BERARDINELLI et al., 2001). KENNY et al. (2002) encontraram maiores concentrações de uréia e amônia no fluido do oviduto quando da infusão sistêmica de cloreto de amônia e uréia, sendo a concentração de uréia no oviduto reflexo de suas concentrações sistêmicas. Devido a sua associação positiva com a circulação periférica, as concentrações deste metabólico no oviduto estão relacionadas e já foram reportadas em vacas (JORDAN et al., 1983) e ovelhas (McEVOY et al., 1997).

A alimentação com proteína em excesso alterou o ambiente uterino pela redução das concentrações de certos íons (JORDAN et al., 1983), elevação nas concentrações de uréia na secreção uterina (JORDAN et al., 1983) e redução no pH uterino durante a fase luteal (ELROD et al., 1993; ELROD e BUTLER, 1993). Também em ovelhas alimentadas com 30g de uréia/kg de alimento a secreção útero-tubárica apresentou maiores concentrações de amônia e uréia em relação àquelas alimentadas com 2,5g de uréia/kg de alimento (McEVOY et al., 1997).

O fluido uterino de vacas com PUN acima de 20 mg/dL, foi associado com elevadas concentrações de amônia e uréia em relação àquelas com PUN abaixo de 20 mg/dL no dia zero e no dia sete após o estro (HAMMON et al., 2005).

O fluido folicular é considerado um exudato sangüíneo que mantém o ambiente folicular sob determinadas concentrações hormonais, metabólicas e

iônicas favoráveis para o desenvolvimento do oócito. As concentrações de alguns dos seus constituintes têm sido relacionados ao desenvolvimento e crescimento do gameta feminino, bem como a relação de certos metabólicos foliculares tem sido relacionado à baixa capacidade deste oócito ser fecundado e de gerar um embrião normal *in vitro* (HAMMON et al., 2005). Durante o período do desenvolvimento de folículos antrais, o oócito adquire os estágios de maturação nuclear e citoplasmática requeridos para a ovulação (DRIANCOURT e THUEL, 1998), este processo é sensível aos níveis e atividade de várias proteínas e esteróides presentes externo e internamente ao ambiente folicular. Desse modo, SINCLAIR et al. (2000) reportaram maiores concentrações de progesterona intra-foliculares em oócitos de novilhas alimentadas com dietas que provesses altas concentrações de amônia circulante. Adicionalmente, altas concentrações de amônia intra-foliculares também foram verificadas nos folículos derivados do grupo com altas concentrações de amônia circulante o que refletiu em menores taxas de clivagem e produção de blastocisto após maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (SINCLAIR et al., 2000).

Também, IWATA et al. (2006) observaram correlação negativa entre desenvolvimento embrionário proveniente de oócitos extraídos de folículos com alta concentração de uréia em seu fluido. Corroborando com isto, De WIT et al. (2001) observaram efeitos negativos da suplementação com uréia no meio de maturação de oócitos e a qualidade dos embriões provenientes. E ainda, foram observados uma alta porcentagem de oócitos interrompidos na metáfase I quando a uréia estava presente e dessa maneira reduzindo a porcentagem de oócitos fertilizados. OCON e HANSEN (2003) observaram que oócitos expostos a concentrações de uréia durante a maturação interferiu com a habilidade desses embriões formados de se desenvolverem ao estágio de blastocisto. Vacas com PUN maior ou igual a 20mg/dL foram associados as maiores concentrações de amônia e uréia no ambiente folicular de folículos pré-ovulatórios em relação àquelas com PUN menor que este valor (HAMMON et al., 2005). Da mesma maneira, estudos *in vivo* com suplementação de uréia a novilhas (75g/animal/dia) também causou diminuição da taxa de blastocistos produzidos no dia 11 (FERREIRA, 2007).

Os fluidos intra-foliculares tem concentrações de glicose maiores que as concentrações séricas (LEROY et al., 2004), apesar de haver um grande consumo deste pelas células foliculares e pelo oócito. A glicose tem um importante papel no metabolismo ovariano como um todo, devido ser a maior fonte de energia para o ovário, possivelmente metabolizada pelo ovário por vias anaeróbicas, levando à formação de lactato. As concentrações de glicose têm sido correlacionadas positivamente com o diâmetro do folículo em cabras (THAKUR et al., 2003), ovelhas (NANDI et al., 2007) e vacas (LEROY et al., 2004; LANDAU et al., 2006).

#### **2.4. Perfil dos metabólitos sanguíneos e de enzimas hepáticas**

Marcadores bioquímicos são substâncias cuja determinação em amostras de tecidos ou fluidos animais, permitem estabelecer o grau de adequação metabólica ou de homeostase em um processo bioquímico do organismo de um animal ou de um grupo de animais (WITTNER, 2000).

A maioria dos transtornos metabólicos pode ser detectada mediante o uso de perfis bioquímicos no sangue e oferece uma importante perspectiva para detectar em tempo alguns distúrbios metabólicos-nutricionais, que afetam a saúde, a produção e a fertilidade do rebanho (WITTWER, 2000). Assim a composição bioquímica do sangue reflete de maneira confiável o equilíbrio entre o ingresso, o egresso e a metabolização dos nutrientes nos tecidos animais. O perfil metabólico pode analisar inúmeros metabólitos, os quais podem ser agrupados para testar o metabolismo protéico (hemoglobina, uréia, proteínas totais, albumina, globulinas), o metabolismo energético (glicose, corpos cetônicos,  $\beta$ -hidroxibutirato, ácidos graxos não esterificados, triglicerídeos, colesterol), o metabolismo mineral (cálcio, fósforo inorgânico, magnésio, sódio, potássio, cobre, zinco, selênio) e a função hepática (enzimas celulares: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e GGT (gama-glutamilttransferase)). Segundo GONZÁLES (2000), pelo perfil metabólico é possível estudar e corrigir doenças metabólico-nutricionais, monitorar a adaptação metabólica e diagnosticar desequilíbrios da homeostase de nutrientes.

Tem sido reportado que a alta ingestão de PB resulta em elevações na uréia e amônia sistêmica, que estão associadas com o aumento da glicose plasmática (VISEK, 1984; MCEVOY et al., 1997). A hiperglicemia tem sido associada a elevados níveis sistêmicos de amônia em bovinos (FERNANDEZ et al., 1990). Sugere-se que a alta concentração de glicose sistêmica induzida pela hiperamonemia pode ser medida pela menor utilização de glicose pelos tecidos periféricos ou, talvez pelo aumento da gliconeogênese (FERNANDEZ et al., 1990). Além disso, concentrações de glicose plasmática acima de 90 mg/dL são geralmente inibitórios para o desenvolvimento do embrião (THOMPSON, 1996) e, isto pode ser devido ao fato da alta concentração de glicose interferir com a sinalização celular ou alterar o ciclo de Krebs (BOLAND et al., 2001). Altas concentrações de glicose no meio de cultivo foram relacionadas ao comprometimento do desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI e FIRST, 1992).

## **2.5. Status Folicular no início da superovulação**

A TE além de permitir a multiplicação rápida de indivíduos geneticamente superiores, dentro da raça, favorece também, a redução do intervalo de gerações por possibilitar a obtenção de embriões de fêmeas doadoras jovens ou não e até mesmo de animais pré-púberes (MANJUBAR et al., 1990; SALLES et al., 1998; 2000). Para os caprinos, a TE vem se desenvolvendo nos últimos anos, devido a melhor compreensão dos eventos fisiológicos desta espécie, avanços na manipulação hormonal e técnica de colheita de embriões. Entretanto, alguns eventos necessitam ser melhor investigados para a melhoria dos resultados, quer econômicos ou produtivos. Dentre os fatores relacionados à qualidade dos embriões avaliados no dia da coleta destacam-se o efeito do tratamento superovulatório, os efeitos nutricionais, a influência do estresse térmico, o momento da fecundação, a regressão prematura dos corpos lúteos, o dia da coleta, o método empregado para obtenção dos embriões, a idade da doadora, efeito da estação, raça da doadora e em destaque, os eventos endócrinos das doadoras ao início do tratamento ovulatório ou o *status* ovariano.

A interação de dois desses fatores, como o *status* ovariano e conseqüentemente a condição ovariana e a nutrição são raros na espécie caprina. Apesar de pesquisas com vacas (GUILBAUT et al., 1991, BÓ et al., 2006) e ovelhas (GONZALEZ-BULNES et al., 2000; 2002; 2003b; VEIGA-LOPEZ et al., 2006) em relação ao *status* ovariano estar fundamentado e ainda estar sendo pesquisado em cabras (MENCHACA et al., 2002; GONZALES-BULNES et al., 2003a; MENCHACA et al., 2007) e relacionados à qualidade embrionária, pouco se sabe a respeito da interação entre nutrição e o *status* folicular ovariano, especialmente em tratamentos que utilizem a uréia como parte dos ingredientes da dieta.

Estudos da influência do *status* folicular ovariano ao início do tratamento superovulatório em ovelhas mostraram que a resposta ovariana ao FSH é correlacionada positivamente com o número de folículos no primeiro dia do tratamento ovulatório. Adicionalmente, a presença de grande folículo ao início do tratamento tem reduzido a resposta ovariana (GONZALEZ-BULNES et al., 2000). Isto sugere que possíveis folículos dominantes podem afetar a competência de folículos pequenos ou dos oócitos inclusos nestes, por interferir no recrutamento folicular (MENCHACA et al., 2002). Ou ainda, os efeitos do folículo dominante podem ser exercidos de forma sistêmica, apesar de alguns estudos indicarem que fatores locais como o estradiol e a inibina serem a causa da baixa resposta a superovulação, visto que, ambos exercem *feedback* negativo, induzindo baixa disponibilidade de FSH.

Folículos de 2 a 6 mm de diâmetro em cabras ao início do tratamento superovulatório foram relacionados positivamente com a taxa de ovulação, ao número e a qualidade de embriões recuperados, entretanto folículos de 7 mm foram negativamente correlacionados (MENCHACA et al., 2002). Neste mesmo estudo, folículos de 2 mm de diâmetro ao início do tratamento com FSH foram associados a baixa taxa de recuperação, e relacionados em outros estudos, em vacas e ovelhas a distúrbios do processo de ovulação (RUBIANES et al., 1997), presença de folículos luteinizados anovulatórios (MONNIAUX et al., 1983) ou deficiência na liberação de oócitos fertilizáveis (STOCK et al., 1996; D'OCCHIO et al., 1997).

VEIGA-LOPEZ et al. (2006) verificaram correlação negativa entre o maior folículo ( $\geq 6$  mm) presente no início da superovulação em ovelhas e a

taxa de embriões recuperados, número de fertilizados e viabilidade embrionária. E ainda, a viabilidade embrionária foi menor quando se observou uma grande diferença entre o primeiro maior e o segundo maior folículo no início do tratamento com FSH e também quando o tamanho do segundo maior folículo era menor, sugerindo que os efeitos da dominância parecem afetar o tempo para o início do surgimento de LH. Para GONZALES-BULNES et al. (2003a) folículos de 4-6 mm de diâmetro à primeira aplicação de FSH foi relacionado ao número de embriões recuperados e viáveis. Entretanto, GARCIA-BOJALIL et al. (1994), não observaram diferenças no número médio de folículos em cada classe de diâmetro, número e percentagem de folículos pré-ovulatórios, anovulatórios e ovulatórios de vacas que receberam 12,3 ou 27,4% de PB na dieta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, N.G. *Efeito de uréia na dieta sobre características reprodutivas e concentração de progesterona e metabólicos em cabras da raça Alpina*. 2005. 150f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- ALVES, F.R. *Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante o 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. 79f. Tese (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A.; ALVES, N.G. *et al.* Effect of urea in diet on follicular recovery and oocyte quality in non-lactating goats. *Biology of Reproduction*, v.1, p.83, 2007. (Abstract)
- BANKIR, L. Urea and the Kidney. In: BRENNER, B. M.; RECTOR JR., F. C. *The Kidney* 5 ed. Philadelphia:Saunders, 1996. v.1, p.571-606.
- BERARDINELLI, J.B.; WENG, J.; BURFENING, P.J. *et al.* 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, p.193-199, 2001.
- BLAUWIEKEL, R.; KINCAID, R.L.; REEVES, J.J. Effect of high crude protein on pituitary and ovarian function in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.439-446, 1986.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; *et al.* The timed of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101, 2006.
- BOLAND, M.P.; 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.
- 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, p.858-865, 1996.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. *Bioquímica Ilustrada*. Artmed, Porto Alegre, 1996. 446p.
- CHURCH, D.C. The ruminant animal digestive physiology and nutrition. New Jersey: Prentice Hall, 1988. 564p.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. *Fundamentos de Nutrição dos Ruminantes*. Livroceres, Piracicaba, 1979. 380p.
- COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, P. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- DAWUDA, P.M.; SCARAMUZZI, R.J.; LEESE, H.J.; *et al.* 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, A.A.C.; CESAR, M.L.F.; KRUIPT 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, p.1800-1804, 2001.
- DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; *et al.* Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.345-370, 2003.

- DRIANCOURT, M.A.; THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reproduction Nutrition and Development*, v.38, p.345-362, 1998.
- D'OCCHIO, M.J.; NIASARI-NASLAJI, A.; KINDER, J.E. Influence of varied progesterone treatments on ovarian follicle status subsequent ovarian superovulatory response in cows. *Animal Reproduction Science*, v.45, p.241-253, 1997.
- ELROD, C.C.; VAN AMBURGH, M.; BUTLER, W.R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *Journal of Animal Science*, v.71, p.702-706, 1993.
- ELROD, C.C.; BUTLER, W.R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*, v.71, p.694-701, 1993.
- FERNANDEZ, J.M.; CROOM JR., W.J.; TATE, JR., L.P.; *et al.* Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on hepatic and portal drained visceral flux of metabolites and regulatory hormones. *Journal of Animal Science*, v.66, p.1726-1742, 1990.
- FERREIRA, F.A. *Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade de complexos cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões In vitro*. 2007. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. CD-ROM
- FOX, D.G.; SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle diet adequacy. *Journal of Animal Science*, v.70, p.3578-3596, 1992.
- GARCIA-BOJALI, C.M.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; *et al.* Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2537-2548, 1994.

- GONZÁLEZ, F.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.D. et al. (Eds). Perfil metabólico em ruminantes. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2000. p.63-74.
- GONZALES-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M.J.; *et al.* Effects of FSH preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, v.54, p.1055-1064, 2000.
- GONZALES-BULNES, A.; GARCIAA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J.; *et al.* Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v.58, p.1607-1614, 2002.
- GONZALES-BULNES, A.; CARRIZOSA, J.A.; DIAZ-DELFA, C.; *et al.* Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant and Research*, v.48, p.9-14, 2003a.
- GONZALES-BULNES, A.; GARCIAA-GARCIA, R.M.; CASELLANOS, V.; *et al.* Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatment in ewes. *Reproduction Nutrition and Development*, v.43, 17-28, 2003b.
- GUILBAUT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; *et al.* Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal Reproduction and Fertility*, v.91, p.81-89, 1991.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.
- 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, p.195-204, 2005.
- HAMMON, D.S. *The role of ammonia in reproductive inefficiency in high producing dairy cows fed excess rumen degraded protein*. 1998. 130p. Thesis (Doctor in Animal Science) – Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, 1998.
- HART, E.B.; BOHSTEDT, G.; DEOBALD, H.S.; *et al.* The utilization of simple nitrogenous compounds such as urea and ammonium bicarbonate by growing calves. *Journal of Dairy Science*, v.22, p.795-798, 1939.

- HELMER, L.G.; BARTLEY, E.E. Progress in utilization of urea as a protein replacer for ruminants: a review. *Journal of Dairy Science*, v.54, p.25-51, 1971.
- IWATA, H.; INOUE, J.; KIMURA, K.; *et al.* Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.91, p.215-223, 2006.
- JORDAN, E.R.; CHAPMAN, T.E.; HOLTAN, D.W. *et al.* Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.66, p.1854-1862, 1983.
- JORDAN, E.R.; SWANSON, L. V. Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed varying levels of crude protein. *Journal of Animal Science*, v.48, p.1154-1158, 1979.
- KAUR, H.; ARORA, S. P. Dietary effects on ruminant livestock reproduction with particular reference to protein. *Nutrition Research Reviews*, v.8, p.121-136, 1995.
- KENNY, D.A.; HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J.; *et al.* Effect of elevated systemic concentration of ammonia and urea on the metabolite and ion composition of oviductal fluid in cattle. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1797-1804, 2002.
- LANDAU, S.; BRAW-TAL, R.; KAIM, M.; *et al.* Preovulatory follicular status affects the insulin and glucose content of the follicles in high-yielding dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.64, p.299-314, 2006.
- LEHNINGER A.L. *Princípios de bioquímica*. 1.ed. São Paulo: Sarvier, 1986. 725p.
- LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGE, J.R.; *et al.* Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, v.62, p.1131-1143, 2004.
- MAJUMBAR, A.; MOGHA, I.V.; ANSARJ, M.R. Successful superovulation in prepubertal Barbari goats. *Indian Journal of Animal Science*, v.60, p.1304-1306, 1990.
- McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; *et al.* 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, p.71-90, 1997.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; *et al.* Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, v.68, p.1111-1117, 2007.
- MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH initiated on day 0 or day 3 postovulatory in goats. *Theriogenology*, v.58, p.1713-1721, 2002.
- MONIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory response in cattle. *Theriogenology*, v.19, p.105-116, 1983.
- NANDI, S.; GIRISH KUMAR, V.; MANJUNATHA, B.M.; *et al.* The biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Developmental Growth Differentiation*, v.49, p.61-66, 2007.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and New World camelids*. 6ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2007. 112p.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: National Academy, 2001. 381p.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of domestic animals: nutrient requirements of sheep*. 6.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1985. 99p.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL *Nutrient requirements of goats: Angora, dairy, and meat goats in temperate and tropical countries*. Washington, D.C.: National Academy, 1981. 91p.
- O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; *et al.* Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.303-313, 2000.
- OCÓN, O.M.; HANSEN, P.J. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1194-1200, 2003.
- PIRES, A. V.; SUSIN, I. Relações entre nutrição e reprodução. In: Simpósio de produção animal. 9, 1994. *Anais...* p.69-97.

- ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; *et al.* Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed science and Technology*, v.126, p.259-276, 2006.
- RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VINOLES, C.; *et al.* Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, v.47, p.1479-1488, 1997.
- RUSSEL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, v.292, p.1119-1122, 2001.
- SALLES, H.O.; SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-nubiana. *Ciência Animal*, v.10, p.137-138, 2000.
- SALLES, H.O.; SOARES, A.T.; ANDRIOLI, A.; *et al.* Diferentes posologias de flunixin meglumine na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em cabras superovuladas. *Ciência Animal*, v.8, p.69-74, 1998.
- SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; *et al.* 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, p.2670-2680, 2000.
- SMITH C. Use of embryo transfer in genetic improvements of sheep. *Animal Production*, v.42, p.81-88, 1986.
- SONDERMAN, J.P.; LARSON, L.L. Effect of dietary protein and exogenous gonadotropin-releasing hormone on circulating progesterone concentrations and performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.8, p. 2179-2183, 1989.
- STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, v.45, p.1091-1102, 1996.
- TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, v.37, p.963-807, 1992.
- TEIXEIRA, J.C.; SALVADOR, F.M. *Amiréia: "uma revolução na nutrição de ruminantes"*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 174 p.

- THAKUR, R.S.; CHAUHAN, R.A.S.; SINGH, B.K. Studies on biochemical constituents of caprine follicular fluid. *Indian Veterinary Journal*, v.80, p.160-162, 2003.
- THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. Reproduction in mammals and man. Paris: Ellipses, 1993. 790p.
- THOMPSON, J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, v.45, p.27-40, 1996.
- VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press, Ithaca. 2a. ed.1994. 476p.
- VEIGA-LOPEZ, A.; COCERO, M.J.; DOMINGUEZ, V.; *et al.* Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. *Reproductive Biology*, v.6, p.243-264, 2006.
- WISEK, W.J. Ammonia: Its effects on biological systems, metabolic hormones and reproduction. *Journal of Dairy Science*, v.67, p.481-498, 1984.
- WISEK, W.J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. *Nutrient Reviews*, v.37, p.273-282, 1979.
- WIKKIPEDIA A enciclopédia livre. Disponibilidade e acesso: <http://www.wikipedia.com.br> (palavras chave: uréia) Recuperado em 28/05/2008.
- WITTNER, F. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. In: GONZÁLEZ, F.D. et al. (Eds). Perfil Metabólico em ruminantes, Porto Alegre: UFRGS, 2000. p.53-62.

## Qualidade do embrião e *status* folicular de cabras da raça Toggenburg alimentadas com dieta à base de uréia

**RESUMO:** Objetivou-se investigar os efeitos da uréia na produção, qualidade e estágio de desenvolvimento embrionário e *status* folicular ao início do tratamento superovulatório de animais alimentados com uréia na dieta. Dezoito cabras da raça Toggenburg com  $48,6 \pm 7,9$  kg PV;  $2,9 \pm 0,5$  ECC e  $34,3 \pm 20,8$  meses de idade, foram distribuídas equitativamente em dois tratamentos: T1 (controle, n=8): sem uréia na dieta, e T2 (n=10): 2,4% de uréia na matéria seca total da dieta (UMS). As dietas a base de feno de capim Tifton (*Cynodon* spp) e concentrado (fubá de milho, farelo de trigo, farelo de soja, uréia, bicarbonato, núcleo e calcário calcítico) foram formuladas para serem isoenergéticas (1,54 Mcal/kg MS) e isoprotéicas (14% PB na MS). O estro foi sincronizado com esponjas vaginais com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 11 dias seguido da aplicação de 100 µg de cloprostenol, i.m., no dia nove. O protocolo de superovulação consistiu da aplicação i.m. de 200 mg de NIH-FSH-P1 em seis doses decrescentes a cada 12 horas, nos dias nove, 10 e 11 (D=0 inserção da esponja vaginal). O estro foi monitorado duas vezes ao dia por 30 minutos por rufiões e as fêmeas foram cobertas por bodes da raça Toggenburg de fertilidade comprovada, a cada 12 horas. Para prevenir a regressão luteal precoce administrou-se 1,1 mg/kg/dia de flunixin meglumine via i.m., a partir de 72 horas após a remoção das esponjas, por 3 dias. Os embriões foram recuperados entre o sétimo e o oitavo dias após o estro pela técnica transcervical. Os embriões recuperados foram classificados pela qualidade (I – excelente a V – degenerado) e estágio de desenvolvimento, sendo considerados viáveis os embriões de graus I (excelentes), II (bom) e III (regular), conforme os aspectos morfológicos descritos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). O *status* folicular foi determinado por ultrassonografia transretal no dia da aplicação da primeira dose de FSH. O número e a qualidade dos embriões não foram influenciados pela concentração de uréia na dieta ( $P>0,05$ ). Embriões em estágio avançado de desenvolvimento foram recuperados do tratamento com 2,4% de UMS. O *status* folicular na primeira aplicação de FSH indicou que a concentração de

uréia testada diminuiu o número de folículos menores de 5 mm de diâmetro ( $P < 0,05$ ). Esta categoria de folículos foi correlacionada ao número de embriões coletados, e ao número e à percentagem de embriões excelentes e bons.

**Palavras-chave:** cabra, embrião, status folicular, superovulação, uréia

## Embryo quality and follicular *status* of Toggenburg goats treated with urea on the diet

**ABSTRACT:** The aim of this research was to investigate the effect of the urea on production, quality and developmental stage of embryo and follicular status at the starting of superovulatory treatment in goats treated with urea. Eighteen Toggenburg breed goats with  $48.6 \pm 7.9$  kg BW,  $2.9 \pm 0.5$  BCS and  $34.3 \pm 20.8$  months of age, were allocated randomly to two treatments: T1 (control, n=8): no urea, and T2 (n=10): 2.4% of urea in dry matter (UDM) of the diet. The animals were fed diets based on Tifton hay (*Cynodon* spp) and the concentrate (14% CP, DM basis). The estrus was synchronized with intravaginal sponges impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate for 11 days plus i.m. injection of 100  $\mu$ g of cloprostenol, on the ninth day. The superovulatory protocol consisted of i.m. injection of 200 mg of NIH-FSH-PI, in six decreasing doses at 12 hours intervals, on day 9, 10 and 11 (D = 0, sponge insertion time). The estrus was monitored twice a day for 30 min from the sponge withdrawal by the use of teaser bucks and the female were mated by Toggenburg fertile bucks every 12 hours during standing estrus. Early luteal regression was preventing by administration of 1.1 mg/kg/day for 3 days of Flunixin meglumine, i.m. 72 hours after sponge withdrawal. The embryo recovery date was on the 7<sup>th</sup> or 8<sup>th</sup> day of estrus cycle by transcervical technique. The recovered embryos were classified by the quality (I – excellent to V – degenerated) and developmental stage (1: 1-cell stage, 2: 2-16 cell stage, 3: early morula, 4: morula, 5: early blastocyst, 6: blastocyst, 7 expanded blastocyst, 8: hatched blastocyst, 9: expanding hatched blastocyst, been considered viable the embryo grade I (excellent), II (good), and III (regular) by the morphological aspect described by International Embryo Transfer Society (IETS). The follicular status was determined by transrectal ultrasonography at first FSH administration day. The number and quality of embryos was not affected by urea concentration in the diet ( $P>0.05$ ). Advanced stage embryos were recovered in the 2.4% UDM treatment. Follicular status at first FSH administration showed that urea concentration in this trial decreased the follicle number less than 5 mm diameter

( $P < 0.05$ ). This follicle class was correlated with embryo recovered number, and with the number and the percentage of excellent and good embryos.

**Key words:** goat, embryo, follicular status, superovulation, urea

## INTRODUÇÃO

A relação entre a nutrição e reprodução em ruminantes é complexa e as respostas frente a esta interação são seguidas de respostas variáveis e inconsistentes. Um dos maiores desafios, se dá pela utilização de proteína em excesso na dieta e a sua influência sobre a reprodução, cujo mecanismo de ação é desconhecido, necessitando de mais estudos.

A uréia e amônia têm recebido muita atenção como compostos bioquímicos que podem afetar o desenvolvimento de embriões de mamíferos. Baseado em experimentos *in vivo* ou *in vitro*, a amônia e ou uréia gerada pelo metabolismo celular e do catabolismo de aminoácidos *in vitro* ou *in vivo* pela adição de uréia ou excesso de proteína da dieta e sua digestão, tem se mostrado tóxica a embriões e gametas murinos (GARDNER e LANE, 1993), ovinos (McEVOY et al., 1997), bovinos (HAMMON et al., 2002a; HAMMON et al., 2002b; FERREIRA, 2007; ALVES, 2007) e caprinos (ALVES et al., 2007). A maturação do oócito, fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial são todos modulados pelo micro-ambiente que os envolve, o qual é influenciado pela ingestão de proteína (JORDAN et al., 1983; ELROD e BUTLER, 1993).

Por afetar o metabolismo de uma maneira geral, as dietas com excesso de proteína ou uréia causam alterações dos padrões bioquímicos do sangue, que em última instância afetam o ambiente uterino, tubárico e folicular, desta forma podendo prejudicar o desenvolvimento normal do embrião.

Os principais reflexos dos efeitos adversos sobre os embriões se dão pela redução da sua viabilidade, alteração da expressão gênica, comprometimento de estruturas celulares, alteração de desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* e transporte uterino.

Tem-se postulado que os embriões são capazes de regular a quantidade de uréia captada para seu metabolismo e crescimento. Entretanto, poucos estudos esclarecedores a respeito têm sido conduzidos e que avaliem efetivamente a capacidade de troca metabólica com o meio aos quais estão inseridos (SEIDEL e GARDNER, comunicado pessoal).

Estudos anteriores com vacas (OLIVEIRA, 2002) e com cabras (ALVES, 2005) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de UMS como 0; 0,7; 1,4 e 2,24 % de UMS, e revelaram que as concentrações de UMS testadas não

foram suficientes para alterar as concentrações de uréia circulante no plasma que fossem relacionadas a fertilidade ou a qualidade dos embriões, respectivamente. Portanto uma maior concentração de uréia na dieta ainda permanece como um importante ponto de investigação em relação aos parâmetros reprodutivos de ruminantes.

Objetivou-se verificar o efeito do fornecimento de uma dieta controle e uma dieta com 2,4% de uréia na MS total a cabras da raça Toggenburg sobre o consumo de nutrientes, número de estruturas e embriões coletados, a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário e o *status* folicular no início do tratamento com FSH.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido de maio a julho de 2006, durante a estação de reprodução natural dos caprinos, equivalente ao outono no hemisfério sul, na Granja Água Limpa, localizada no município de Piau, Minas Gerais, região sudeste do Brasil. A região está localizada a 21° 35'S, 43° 15'W e a 435 metros de altitude. A região apresenta clima do tipo Cwa segundo a classificação de Köppen-Geiger (inverno seco e verão úmido). Dados meteorológicos médios do período experimental podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados meteorológicos médios do período experimental

Período (mês/ano)	Temperatura (°C)			Precipitação pluviométrica (mm)	Insolação diária (horas)*
	Média Máx.	Média Mín.	Média compensada		
Abril/2006	26,3	9,4	15,6	7,6	222,1
Maio/2006	24,6	11,4	16,5	7,1	187,7
Junho/2006	25,6	13,1	17,9	37,4	207,2
Julho/2006	28,2	17,3	21,4	50,1	188,6

Fonte: Estação Meteorológica - Embrapa Gado de Leite (distante 2 km da Fazenda) \* Horas de sol direto, sem a obstrução de nuvens.

Foram utilizadas 18 cabras da raça Toggenburg, *Capra hircus* (Linnaeus, 1758) selecionadas por exame clínico geral e histórico saudável, com escore de condição corporal (ECC)  $2,9 \pm 0,5$  (escala de 0 a 5; sendo 0 - animais muito magros a 5 - animais obesos (FONSECA, comunicado pessoal), livres de doenças, e as multíparas possuíam histórico de parição com crias vivas e saudáveis. Também foram avaliadas por meio de ultrassonografia<sup>1</sup> observando-se os ovários, quanto ao crescimento folicular e o útero quanto a presença de hidrometra e outras patologias uterinas e ovarianas, uma vez por semana, por no mínimo dois ciclos estrais regulares e consecutivos. Foram selecionadas fêmeas não gestantes, não lactantes, nulíparas, primíparas e multíparas com  $48,6 \pm 7,9$  kg de peso e  $34,3 \pm 20,8$  meses de idade ao início do experimento (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos animais experimentais, idade, peso e ECC.

Cabra	Idade (meses)	Peso (kg)	ECC (0 a 5)	Tratamento
219	67,78	56,80	3,25	TC
1564	56,38	60,20	3,25	TC
3383	28,70	43,90	3,00	TC
4406	24,85	44,50	3,00	TC
4428	19,46	42,30	2,75	TC
4436	19,40	39,00	2,50	TC
5465	13,31	41,00	2,75	TC
5469	13,18	41,70	3,00	TC
210	68,18	60,40	3,00	TU
220	67,78	46,80	2,75	TU
3369	28,24	54,90	4,00	TU
3392	28,34	53,80	4,00	TU
3394	38,23	44,00	2,75	TU
4411	24,62	37,70	3,00	TU
4433	19,43	42,50	2,75	TU
4450	18,74	49,50	2,75	TU
4453	18,51	39,30	3,00	TU
5494	13,15	37,10	3,00	TU

As cabras foram distribuídas conforme o peso, idade e ECC, equitativamente em dois tratamentos: controle (TC, n=8) e tratado (TU, n=10) com 2,4 % de UMS da dieta (Tabela 2). Estas foram instaladas em aprisco de

<sup>1</sup>Aloka, SSD 500 - Japão

madeira, em baias suspensas de piso ripado, onde permaneceram confinadas em baias individuais de 1,5 m<sup>2</sup>, com comedouros individualizados e bebedouros coletivos.

Os animais foram adaptados de forma gradual à dieta com 2,4% de uréia (dia zero início do tratamento com 2,4% de UMS, Figura 1), sendo que a cada semana antes do início do experimento foram incluídos níveis intermediários de uréia na dieta (0; 1,0 e 2,0%) para adaptação dos animais.

Dietas a base de feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* spp) e concentrado foram calculadas para serem isoenergéticas e isoprotéicas (1,4 Mcal/Kg MS e 14% PB/Kg MS) e conter 14 % da proteína total na forma de nitrogênio não protéico (NNP), no tratamento TU. As porcentagens de NNP advindas da uréia em relação a proteína total da dieta foram de 0%, 13%, 26% e 39,25% e as quantidades de PDR foram de 59,13; 63,23; 67,07 e 71,18 nas dietas com 0%, 1,0%, 2,0% e 2,4%, respectivamente. Detalhes da composição das dietas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (com base na MS)

Ingredientes	Tratamentos (% UMS da dieta)			
	0	1,0	2,0	2,4
Feno de capim Tifton	52	53	52	53
Fubá de milho	4	9	12	22,5
Farelo de soja	12	7	3	0
Farelo de trigo	27	27	27	18,2
Bicarbonato	1	1	1	1
Núcleo	1	1	1	1
Uréia	0	1	2	2,4
Calcáreo	3	3	3	2,3

A alimentação foi fornecida duas vezes por dia, às 7:30 e às 16:30 horas na forma de mistura completa, sendo a quantidade ajustada diariamente para permitir 5% de sobras. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. As

sobras foram recolhidas diariamente antes da alimentação matinal e pesadas para a determinação do consumo.

Aproximadamente 10% das sobras diárias recolhidas, foram pesadas e congeladas a -20 °C, o que constituiu uma amostra composta por semana para cada animal. Estas amostras compostas então foram descongeladas e moídas em moinho com peneira de 1 mm e acondicionadas em frascos de vidro com tampa, até a realização das análises bromatológicas. Da mesma forma uma amostra dos ingredientes da ração e do feno usado foi recolhida, congelada e descongelada para determinação da composição bromatológica.

A composição bromatológica do feno e dos ingredientes utilizados no concentrado é apresentada na tabela 4.

Tabela 4. Análise bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (<sup>1</sup> % na MS)

	Ingredientes			
	Feno de Capim Tifton	Fubá de milho	Farelo de trigo	Farelo de soja
MS (%)	91,75	86,94	87,15	88,35
PB <sup>1</sup>	6,53	7,19	13,81	48,78
EE <sup>1</sup>	0,86	3,55	3,38	2,09
Lignina <sup>1</sup>	6,16	1,16	4,0	1,33
FDN <sup>1</sup>	70,28	20,54	37,81	12,55
FDA <sup>1</sup>	39,79	4,08	13,52	9,86
CHOT <sup>1</sup>	87,49	87,89	77,27	42,67
NDT <sup>1</sup>	55,62	87,24	72,43	81,54
Cinzas <sup>1</sup>	5,12	1,38	5,54	6,47
Ca <sup>1</sup>	0,42	0,03	0,22	0,34
P <sup>1</sup>	0,17	0,25	1,00	0,58

CHOT = 100 – (%PB + %EE + %Cinzas)

MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, EE: extrato etéreo, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, CHO: carboidratos totais e NDT: nutrientes digestíveis totais.

Para sincronização e superovulação dos animais foram utilizados os mesmos procedimentos descritos por ALVES (2005) com algumas modificações. O protocolo descrito a seguir foi realizado uma única vez em cada animal, portanto apenas uma coleta de embriões após o recebimento das dietas experimentais. Inseriram-se esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon<sup>®</sup>)<sup>2</sup>, por 11 dias, o que coincidiu com o 7<sup>o</sup> dia de alimentação com a dieta com 2,4% de uréia na MS da dieta para o TU. A superovulação foi realizada com 200 mg de NIH-FSH-PI (Folltropin<sup>®</sup>)<sup>3</sup>, administrados em seis doses decrescentes, com intervalo de 12 horas entre aplicações (50 mg, 50 mg, 30 mg, 30 mg, 20 mg e 20 mg), a partir de 48 horas antes da remoção da esponja intravaginal. Simultaneamente a primeira aplicação de FSH foi administrada 100 µg de cloprostenol sódico (Ciosin<sup>®</sup>)<sup>4</sup>, por via i.m. Setenta e duas horas após a remoção da esponja iniciaram-se o tratamento antiluteolítico com flunixin meglumine (Banamine<sup>®</sup>)<sup>5</sup>, na dose de 1,1 mg/kg/dia, durante três dias consecutivos (Figura 1).

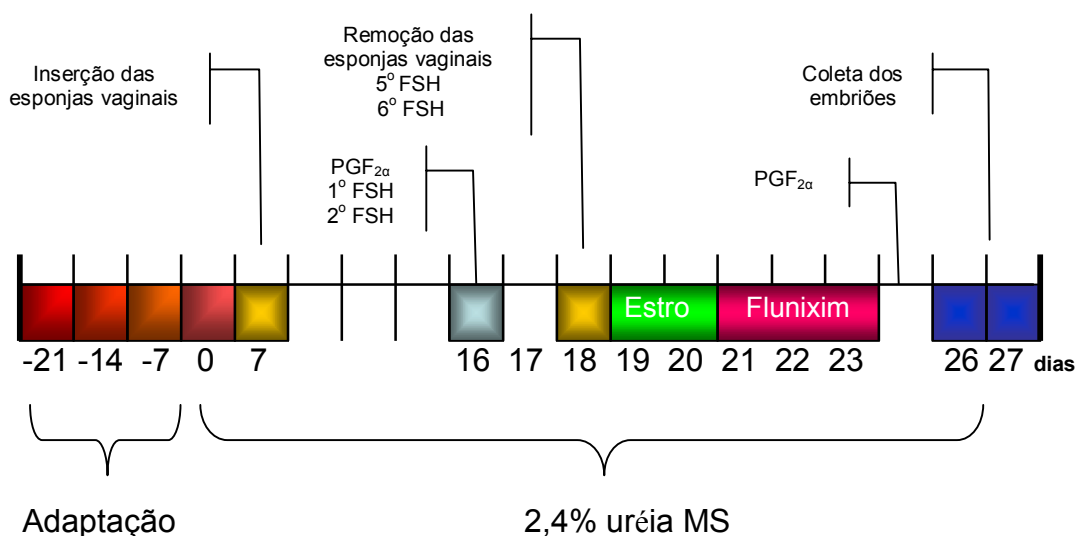


Figura 1. Protocolo de superovulação em cabras alimentadas com uréia na dieta.

<sup>2</sup> Sintex S.A. – Tecnopec LTDA, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Bioniche, Importado por Tecnopec LTDA, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Coopers

<sup>5</sup> Schering Plough Veterinária

Exames ultra-sonográficos dos ovários foram realizados para determinação do *status* folicular ao início do tratamento superovulatório, utilizando-se de um aparelho de ultrassom ALOKA (SSD 500, Tokyo, Japão) com um transdutor linear de 5.0 MHz acoplado a extensão rígida. Após contenção em tronco próprio e em posição de estação, as fezes foram removidas e inseriu-se gel de carboximetil celulose (Carbogel ULT<sup>®</sup>)<sup>6</sup> para melhor visualização das estruturas ovarianas. As ultra-sonografias foram realizadas após o tratamento de sincronização o que coincidia como o início das superovulações ou durante a primeira dose de FSH a fim de avaliar a atividade ovariana. Ambos os ovários foram examinados, e o número, o diâmetro e a posição de todos os folículos antrais  $\geq 3$  mm foram anotados em planilhas apropriadas. Os folículos foram classificados como pequenos, médios ou grandes (3 a 4 mm,  $>4$  a  $<5$  mm e  $\geq 5$  mm de diâmetro, respectivamente) conforme preconizado por MENCHACA et al. (2002).

A partir de 12 horas após a retirada das esponjas, as cabras foram observadas quanto à manifestação de estro, duas vezes ao dia, às 7 e 19 horas, por um período mínimo de 15 minutos cada, com auxílio de rufiões cirurgicamente preparados. As cabras em estro foram cobertas por bodes da raça Toggenburg, e de fertilidade comprovada, a cada 12 horas, até a recusa pela monta do macho. As coberturas iniciaram-se 12 horas após a detecção do estro.

Os embriões foram coletados pela técnica transcervical em circuito fechado, entre o sétimo e o oitavo dia do ciclo estral (estro = dia zero). Vinte e quatro horas antes do início da hora prevista para a coleta dos embriões, as cabras receberam uma aplicação de 125  $\mu$ g de cloprostenol sódico (Ciosin<sup>®</sup>)<sup>7</sup>, por via i.m.. A coleta de embriões foi realizada com o animal em estação, contido em tronco próprio. Após a tricotomia da cauda e higiene da região perineal, cada cabra submetida à coleta dos embriões recebeu 1mL/100kg p.v. de acepromazina 1%, i.m. (Acepran<sup>®</sup>)<sup>8</sup> como pré-anestésico (figura 2a), e 2 mL/animal de cloridrato de lidocaína a 2% sem vaso constritor (Lidovet<sup>®</sup>)<sup>9</sup>, epidural na região sacrococcígea. A cervice foi visualizada com o auxílio de um

---

<sup>6</sup> Carbogel Indústria e Comercio LTDA, SP, Brasil.

<sup>7</sup> Coopers

<sup>8</sup> Univet S.A. Indústria Veterinária, SP, Brasil.

<sup>9</sup> Bravet, RJ, Brasil.

espéculo vaginal e uma fonte de luz (Figura 2b e 2c). Em seguida uma gaze estéril impregnada com 2 mL de lidocaína a 2% (Lidovet<sup>®</sup>) foi introduzida e deixada em contato com o fórnix vaginal por 30 segundos. Em seguida, a cérvix foi pinçada e tracionada gentilmente com duas pinças modelo Pozzi em direção ao vestíbulo da vagina (Figura 2d). Então, uma sonda uretral 10 ou 12 estéril (Fabrimed<sup>®</sup>) foi utilizada para ultrapassar os anéis cervicais com auxílio de um mandril metálico, o qual era retirado após a passagem dos anéis. Foi confeccionado um circuito para coleta de embriões em sistema inteiramente fechado (Figura 3a), constituído por tubos vinílicos transparentes, atóxicos, estéreis e flexíveis (BD<sup>®</sup>)<sup>10</sup>, montado de forma a proporcionar duas vias de comunicação com a sonda uretral e ambas conectadas ao equipo em Y (Cremer<sup>®</sup>)<sup>11</sup>. Uma das vias do circuito se comunicava com o filtro de coleta de embriões e a outra conectava-se à mangueira, a qual estava ligada ao meio de lavagem (Dulbeco Modificado DPBS<sup>12</sup>) a 37°C (Figura 3b). Nesta última porção do filtro, uma seringa de 50 mL (BD<sup>®</sup>)<sup>13</sup> foi posicionada imediatamente antes da comunicação com o meio de lavagem, para controle do volume de líquido instilado em cada corno uterino, o que foi de aproximadamente 200 mL.

---

<sup>10</sup> BD, Juiz de Fora, Brasil.

<sup>11</sup> Cremer S.A., Brasil.

<sup>12</sup> Embriocare<sup>®</sup> - Cultilab, SP, Brasil.

<sup>13</sup> BD, Juiz de Fora, Brasil.

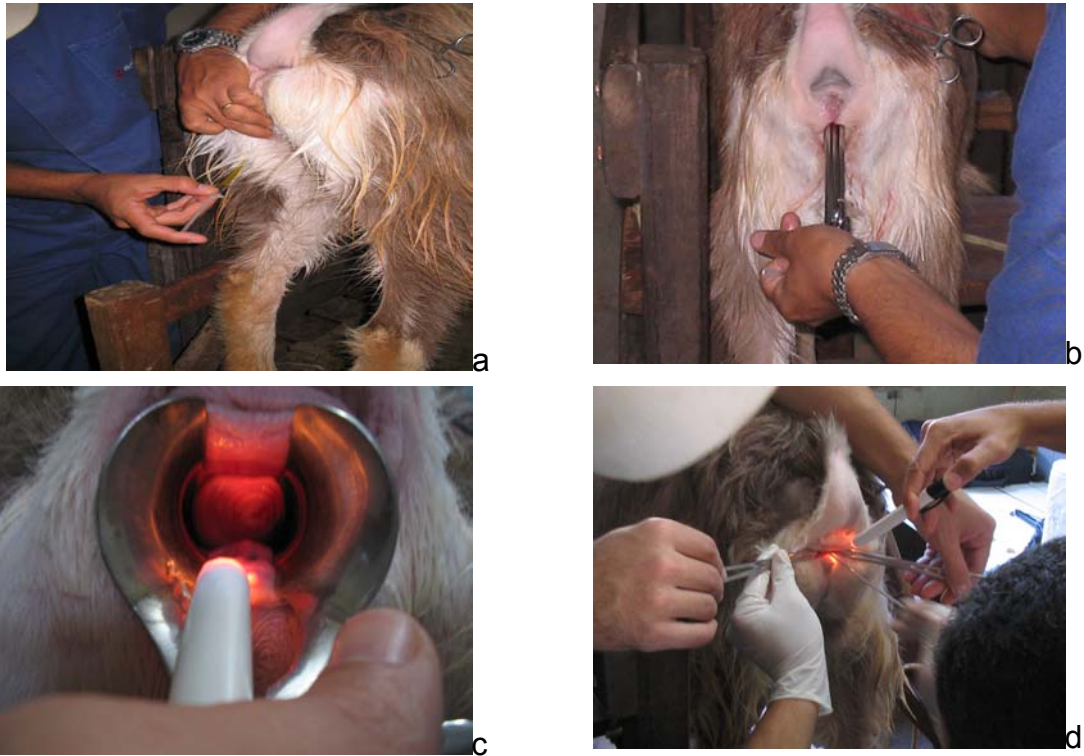


Figura 2. Passos durante a coleta dos embriões.



Figura 3. Detalhes do circuito fechado montado para coleta de embriões em cabras (a), sonda uretral acoplada ao circuito para lavagem dos cornos uterinos (b) e equipo em Y (c).

Para que cada corno uterino fosse lavado com meio de coleta de embriões, a via que se acoplava ao filtro de coleta de embriões foi fechada por obstrutores de fluxo (Cremer)<sup>14</sup>, e a via que estava ligada a sonda uretral posicionada em um dos cornos uterinos, foi aberta, para que o meio de lavagem fosse instilado em cada corno. Em seguida, essa mesma via foi fechada para que o meio de coleta permanecesse no corno uterino por alguns instantes, antes de ser recolhido no filtro de embriões. Após o meio permanecer por alguns instantes no lúmen uterino, a via de comunicação com o meio de lavagem foi fechada e a via que se comunicava com o filtro foi aberta, para que o fluido que foi instilado em cada corno uterino fosse sinfonado e filtrado para recuperação dos embriões. Aproximadamente 50 mL foram instilados em cada corno por vez até se completarem os 200 mL.

Após a recuperação dos lavados uterinos, estes foram filtrados e em seguida seu conteúdo foi disposto em placas de petri 100 x 20, as quais foram rastreadas para a identificação dos embriões em estereomicroscópio sob aumento de 10X (Olympus®). Imediatamente ao serem identificados, estes foram transferidos para placas de petri menores para avaliação da qualidade e estágio de desenvolvimento, sob aumento de 40X.

O número total de estruturas, embriões e ovócitos, bem como a qualidade e o estágio de desenvolvimento dos embriões recuperados, foram determinados em cada tratamento. Os embriões coletados foram avaliados quanto à qualidade (I – excelente a V – degenerado) e ao estágio de desenvolvimento conforme preconizado por (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1999). Sendo considerados viáveis os embriões de graus I (excelente), II (bom) e III (regular). Os estágios de desenvolvimento determinados foram: OO: oócitos; MO: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido; DEG: degenerados.

---

<sup>14</sup> Cremer S.A., Brasil.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa SAEG 9.0 (UFV, 2003).

Foi realizada a análise de variância dos dados e utilizado o teste Tukey para comparação de médias entre os tratamentos, com nível de significância de 5%. As variáveis: número de estruturas, embriões, embriões viáveis, embriões excelentes e bons; percentagem de embriões viáveis e excelentes e bons; os parâmetros ovarianos no dia da aplicação de FSH: total de folículos pequenos, médios, grandes e o diâmetro do maior folículo foram submetidas aos testes de Lilliefors e Cochran e Bartlett, a fim de verificar respectivamente, a normalidade dos dados e homocedacidade das variações dos tratamentos. As variáveis relativas ao estágio de desenvolvimento embrionário são apresentadas na forma de estatística descritiva. Correlações simples de Pearson foram realizadas entre os parâmetros embrionários e o *status* folicular na ocasião da primeira aplicação de FSH.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo médio individual de MS, PB, EE, FDN, MO, NDT e CHO em kg/dia não foi influenciado pelo tratamento com uréia na dieta (Tabela 5). Devido às dietas serem isoenergéticas e isoprotéicas, diferindo apenas na quantidade de NNP e PDR, o consumo dos nutrientes foi o mesmo para os dois tratamentos. De certa forma, a constituição e a proporção do volumoso utilizado nas diferentes dietas, possivelmente promoveram uma maior concentração de amônia ruminal no tratamento com 2,4% UMS, entretanto esta não interferiu no consumo de ingredientes.

Diminuição do consumo de MS foi relatado por KENNY et al. (2002) ao fornecerem 240g/dia de uréia a novilhas de corte. Da mesma forma CONRAD et al. (1977) relataram diminuição do consumo de vacas que recebem elevadas quantidades de NNP. SINCLAIR et al. (2000) também verificaram redução do tamanho do bocado quando novilhas receberam dietas que promoveram alta concentração de amônia plasmática.

Entretanto, ALVES (2005) observaram aumentos no consumo de MS, PB, EE, MO e NDT em cabras Alpinas alimentadas com 0, 0,7, 1,4 e 2,24% de uréia na MS da dieta, utilizando como volumoso a silagem de milho. No entanto, OLIVEIRA (2001) observou diminuição do consumo de MS com aumento nas concentrações de uréia na dieta até a concentração de 2,4% na MS total da dieta.

SINGHAL e MUDGAL, (1980) e FERNANDEZ et al. (1997) reportaram que a uréia pode ser fornecida em quantidades superiores as preconizadas pelo NRC (1981) até 1/3 da PB total ou até que 50% da proteína do concentrado, sem alterações no consumo

Tabela 5. Consumo médio individual de MS, PB, EE, FDN, CHO (kg/dia), em função das concentrações de uréia na dieta

	Concentrações de uréia (%MS)	
	0%	2,4%
MS <sup>1</sup>	1,05 ± 0,15	0,99 ± 0,25
PB <sup>1</sup>	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02
EE <sup>1</sup>	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,002
FDN <sup>1</sup>	0,33 ± 0,05	0,31 ± 0,08
NDT <sup>1</sup>	0,35 ± 0,05	0,33 ± 0,083
CHO <sup>1</sup>	0,46 ± 0,07	0,44 ± 0,11

<sup>1</sup> Kg/dia

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo, FDN: fibra solúvel em detergente neutro; NDT: nutrientes digestíveis totais, CHO: carboidratos.

Das 18 cabras utilizadas, 16 manifestaram estro após a sincronização. A duração do estro (DE) (h), o intervalo de retirada do dispositivo ao início do estro (IRIE) (h) e o intervalo de retirada do dispositivo ao final do estro (IRFE) (h) não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pelo tratamento com uréia (Tabela 6). Da mesma maneira, FAHEY et al. (2001) e ALVES et al. (2007), que forneceram uréia a ovelhas e cabras (50g de uréia por dia ou nas concentrações de 0; 0,7; 1,4 e 2,24% de UMS da dieta, respectivamente) também não observaram

efeitos sobre os parâmetros do estro em relação ao grupo não suplementado com uréia.

Tabela 6. Percentagem de animais em estro (PE) e médias da duração média do estro (DE) (h), intervalo da remoção da esponja ao início do estro (IRIE) (h) e intervalo da retirada da esponja ao final do estro (IRFE) (h), em função da concentração de uréia nas dietas

	Concentração de uréia na dieta (%MS)	
	0	2,4
PE (%)	100 (n=8)	80 (n=8)
DE (h)	28,8 ± 14,8	22,8 ± 15,4
IRIE (h)	31,4 ± 12,4	28,5 ± 18,2
IRFE (h)	60,2 ± 22,9	51,3 ± 28,8

Protocolos de sincronização do estro similares aos empregados neste estudo em cabras da raça Moxotó (ANDRIOLI et al., 2000), cabras mestiças (ANDRIOLI-PINHEIRO et al, 1996) e em cabras Alpinas (ALVES et al., 2007) evidenciaram 80, 60,9 e 81,2% de animais em estro, respectivamente, valores bem próximos aos observados neste estudo. A duração do estro em animais alimentados com 0 e 2,24% de UMS foi de 27,6 e 30,4 horas (ALVES et al., 2007), respectivamente, valores próximos aos encontrados neste estudo de 28,8 e 22,8 para 0 e 2,4% de UMS. Apesar de que no estudo citado anteriormente ter sido observado uma maior duração do estro dos animais tratados com uréia e estes não terem apresentado diferenças estatísticas, a DE, o IRIE e o IRFE foram numericamente menores nos animais tratados com 2,4 % de UMS em relação aos animais não tratados com uréia.

Das 18 cabras que manifestaram estro e foram submetidas à coleta de embriões, 6 cabras não produziram nenhuma estrutura ou embrião (n=3, 0% e n=3, 2,4% UMS). Doze cabras (n=5, 0% e n=7, 2,4% UMS) responderam a superovulação, com produção de 80 estruturas, sendo 75 embriões e 5 oócitos.

Do total de embriões coletados, 36 (48%) foram coletados do tratamento com 0% de UMS e 39 (52%) foram coletados do tratamento com 2,4% de UMS,

não havendo diferença entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) (Tabela 7). O número de oócitos não fertilizados coletados foi maior nos animais do tratamento com 2,4% de UMS ( $P<0,05$ ) em relação ao grupo não tratado com uréia (Tabela 7).

Reduções nas porcentagens de oócitos fecundados sobre o total de estruturas recuperadas em animais recebendo dietas com alta PDR foram relatadas em vacas superovuladas (BLANCHARD et al., 1990) e em ovelhas (BISHONGA et al., 1996). Da mesma forma, ALVES (2007) encontrou menor capacidade de fecundação do oócito em vacas alimentadas com 100g de uréia/animal/dia fornecidos depois da superovulação em relação ao grupo que recebeu uréia antes da superovulação. A uréia pode ser tóxica a gametas bovinos resultando em infertilidade, pois a amônia gerada pelo metabolismo da uréia pode resultar em aumento da mortalidade de espermatozóides e oócitos (VISEK, 1984). É sugerido que a uréia é deletéria em altas concentrações para espermatozóides de humanos e ratos (DASGUPTA et al., 1970; citado por BLANCHARD et al., 1990), e também por atuar na motilidade e diminuir a habilidade do espermatozóide de penetrar o muco cervical bovino *in vitro* (BLANCHARD et al., 1990).

O número total e médio embriões, bem como o número de embriões viáveis não foram influenciados pela concentração de uréia testada ( $P>0,05$ ), assim como a porcentagem de embriões viáveis ( $P>0,05$ ) (Tabela 7).

Tabela 7. Produção de embriões em função da concentração de uréia nas dietas

	Concentração de uréia na dieta (%MS)	
	0	2,4
Número de oócitos	0 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>
Fertilizados/recuperados (%)	100 <sup>a</sup>	88,64 <sup>a</sup>
Número de embriões coletados	36 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>
Número médio de embriões/cabra	7,2 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>
Número médio de embriões viáveis (I, II, III)	7,0 ± 2,12 <sup>a</sup>	5,4 ± 3,3 <sup>a</sup>
Percentagem de embriões viáveis	100 <sup>a</sup>	84,4 <sup>a</sup>
Número médio de embriões excelentes e bons (I, II)	6,80 ± 2,49 <sup>a</sup>	5,11 ± 3,44 <sup>a</sup>
Percentagem de embriões excelentes e bons	95 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem a 5% pelo teste t

Os fornecimentos de dietas que contenham uréia ou PDR em excesso parecem não serem relacionados à quantidade de embriões produzidos em vacas (BLANCHARD et al., 1990; ALVES, 2007), novilhas (GATH et al., 1999), ovelhas (McEVOY et al., 1997; FAHEY et al., 2001; PAPADOPOULOS et al., 2001) e cabras (ALVES et al., 2007). Para ALVES et al. (2007) o número médio de embriões/doadora obtidos pela técnica transcervical foi de 8,5 em cabras da raça Alpina alimentadas com dietas com concentrações de uréia variando de 0; 0,73; 1,46 e 2,24%. ANDROUKOVITCH et al. (2002), coletaram 13,2 embriões por doadoras da raça Bôer submetidas à coleta transcervical com sonda uretral humana. Outros autores citaram médias de estruturas coletadas de 8,4 para cabras da raça Bôer (GUSMÃO et al., 2003), 8,4 para cabras sem raça definida (SALLES et al., 2003), 7,6 para cabras da raça Saanen (PEREIRA et al., 1991) e 6,3 para cabras da raça Saanen (LIMA-VERDE, 2003). De maneira geral observa-se que os resultados de 6,8 embriões/cabra neste estudo, são próximos aos reportados na literatura para cabras de outras raças.

Em embriões bovinos, ovinos e caprinos oriundos de animais alimentados com uréia na dieta ou excesso de PDR foram relatados efeitos deletérios sobre a qualidade. Entretanto, em caprinos, embora a uréia prejudicasse o número e a percentagem de embriões viáveis, o comportamento

quadrático das curvas de regressão em função de concentrações intermediárias de uréia indicou que embriões oriundos de animais alimentados com 2,24% de UMS foram semelhantes aos animais controle que não receberam uréia (ALVES et al., 2007). O que corrobora os resultados encontrados quando se compara com as duas dietas deste estudo, 0 e 2,4% de UMS. Embriões bovinos também não sofreram prejuízos em relação a sua viabilidade quando vacas receberam 100g de uréia/animal/dia antes ou depois da superovulação (ALVES, 2007). Estes trabalhos sugerem que quando os animais são adaptados previamente a elevadas concentrações de uréia, parece não haver efeitos na qualidade dos embriões, devido à adaptações destes aos efeitos tóxicos de dietas com uréia. Contudo, a duração da exposição à amônia, a concentração de amônia e o estágio de desenvolvimento aos quais os embriões *in vitro* são expostos afetam o desenvolvimento de embriões (HAMMON et al., 2000 a e b).

BLANCHARD et al. (1990) verificaram que o número de embriões transferíveis (excelentes, bons e regulares) e não transferíveis recuperados de vacas alimentadas com 73 e 64% de PDR foram similares. Da mesma forma, BERARDINELLI et al. (2001) também não verificaram diferenças entre embriões de ovelhas alimentadas com 100 ou 200% das exigências de proteína para manutenção, em embriões recuperados em diferentes dias após a monta. DAWUDA et al. (2002), também não observaram diferenças na qualidade dos embriões de vacas alimentadas com 250 g/animal/dia em relação às controle, por um período longo anterior a inseminação. MIKKOLA et al. (2005) também não verificaram diferenças no número de embriões transferíveis em novilhas alimentadas com 14 ou 18% de PB na dieta.

Entretanto, a qualidade visual dos embriões observados em estereomicroscópio pode não refletir se estes seriam capazes de se desenvolver normalmente caso fossem ou não transferidos. POWELL et al. (2006) observaram que embriões provenientes de doadoras alimentadas com excesso de uréia apresentaram uma alta taxa de mortalidade embrionária quando foram transferidos para receptoras que não receberam uréia, e ainda apresentaram padrão diferencial de expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo e controle do desenvolvimento como o IGF-12R. Da mesma maneira RHOADS et al. (2006) encontraram embriões com reduzida

capacidade de desenvolvimento após transferência, oriundos de vacas alimentadas com dietas com diferentes quantidades de PB que foram capazes de promover diferentes concentrações de NUP.

ALVES (2005) selecionou embriões classificados como excelentes de cabras alimentadas com diferentes concentrações de UMS (0, 0,7 e 1,4%) e relatou que estes apresentaram imperfeições ultra-estruturais quando foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão. As principais alterações observadas foram relacionadas ao aumento de estruturas morfológicas relacionadas com os processos de reorganização e/ou degeneração celular, que aumentaram à medida que se aumentou a quantidade de uréia da dieta. Entretanto, em relação a exposição de embriões a concentrações de uréia igual (ALVES, 2005) ou superior a 2,24% UMS (AMORIM, dados não publicados) e a avaliação da ultra-estrutura, não se sabe quais os efeitos destas elevadas concentrações de UMS sobre a organização do citoesqueleto e sobre o desenvolvimento *in vivo* destes.

Em relação ao estágio de desenvolvimento foram coletadas, 19 mórulas (25,33%), 10 mórulas compactas (13,33%), 3 blastocistos iniciais (4%), 17 blastocistos (22,66%), 15 blastocistos expandidos (20%), 11 blastocistos eclodidos (14,66%). O número e a percentagem de embriões coletados em cada estágio de desenvolvimento são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. No tratamento com 0% de UMS foram verificados 16 mórulas (44,44%), 6 mórulas compactas (16,66%), 2 blastocistos iniciais (5,55%), 9 blastocistos (25%) e 3 blastocistos expandidos (8,33%) e no tratamento com 2,4% de UMS foram coletados 3 mórulas (7,69%), 4 mórulas compactas (10,25%), 1 blastocisto inicial (2,56%), 8 blastocistos (20,51%), 12 blastocistos expandidos (30,76%) e 11 blastocistos eclodidos (28,20%).

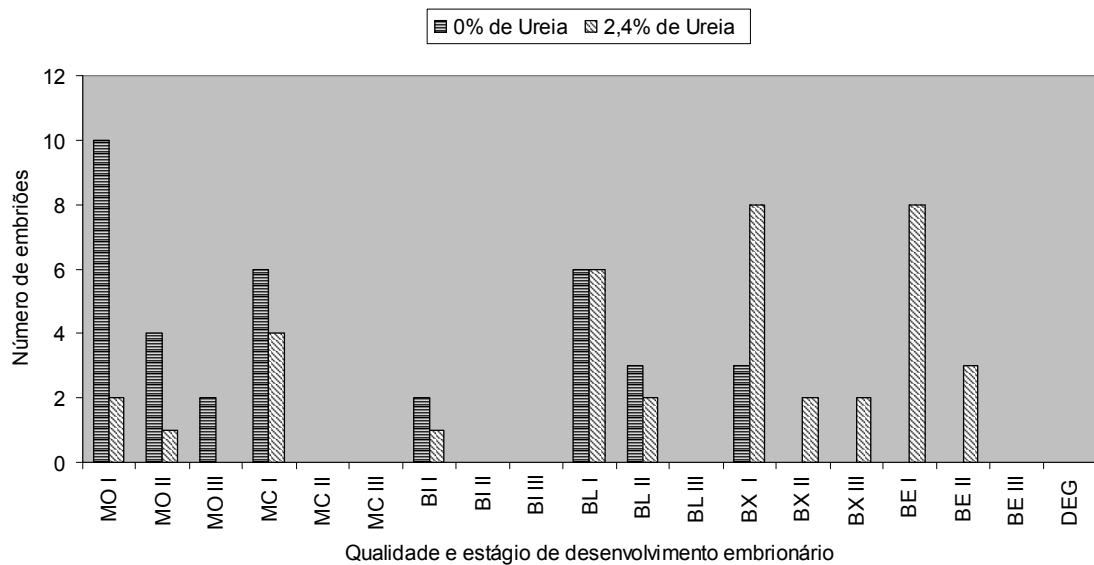


Figura 4. Número, qualidade e estágio de desenvolvimento embrionário de cabras Toggenburg alimentadas com uréia na dieta. MO: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido; DEG: degenerados; I: embrião excelente; II: embrião bom; III: embrião regular.

O estágio de desenvolvimento embrionário pode sofrer variação entre animais submetidos ao mesmo dia de coleta de embriões em relação ao dia do estro, bem como entre embriões coletados de uma mesma cabra (Baril et al., 1981; citados por GORDON, 1997). Entretanto, dietas com uréia (2,24% UMS) oferecidas a cabras da raça Alpina proporcionaram uma alta percentagem de embriões no estágio de blastocisto eclodido (ALVES et al., 2007), o que corrobora com a alta percentagem de blastocistos expandidos e eclodidos coletados das cabras Toggenburg desse estudo.

No tratamento com 2,4% de UMS, foram observados um maior número (Figura 2) e uma maior proporção (Figura 3) de embriões em estágio de desenvolvimento mais avançado, como blastocistos expandidos e eclodidos, em relação ao tratamento com 0% de UMS. Corroborando com esses resultados, McEVOY et al. (1997) observaram em embriões de ovelhas alimentadas com 30 g de uréia/kg de alimento, embriões em estágio avançado de desenvolvimento, em relação às que consumiram 2,5 g de uréia/kg de alimento. ALVES et al. (2007) também observaram uma maior proporção de

embriões em estádios avançados de desenvolvimento em cabras que foram alimentadas com 2,24% de uréia na matéria seca da dieta. O que sugere um efeito estimulatório da uréia sobre o desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, BERARDINELLI et al. (2001) encontraram maior número de células em embriões de ovelhas alimentadas no 5º dia após a monta com 200% das exigências de proteína para manutenção em relação às alimentadas com 100% das exigências. Glicoproteínas específicas dependentes de estrógeno secretadas pelo oviduto, e também presentes na zona pelúcida e no espaço perivitelino do embrião podem ter um efeito estimulatório sobre o desenvolvimento embrionário, conforme sugerido por BERARDINELLI et al. (2001). Onde pode-se inferir que a uréia possa atuar em um desses mecanismos e provocar uma aceleração no desenvolvimento do embrião, ou que houve aceleração do desenvolvimento relacionado a reprogramação do embrião exposto a elevadas concentrações de amônia ou uréia. Da mesma maneira, zigotos oriundos de doadoras alimentadas com 30g de uréia e que apresentaram elevadas concentrações de uréia plasmática foram coletados em estágio avançado de desenvolvimento e ainda foram relacionados a redução na expressão do gene receptor de insulina tipo II (IGF2R), um gene “imprimado”, associado a perda de metilação do segundo intron da região metilada diferencial. Também, este gene foi relacionado ao desenvolvimento de embriões com a síndrome da prole de peso elevado ao nascimento (POWELL et al., 2006).

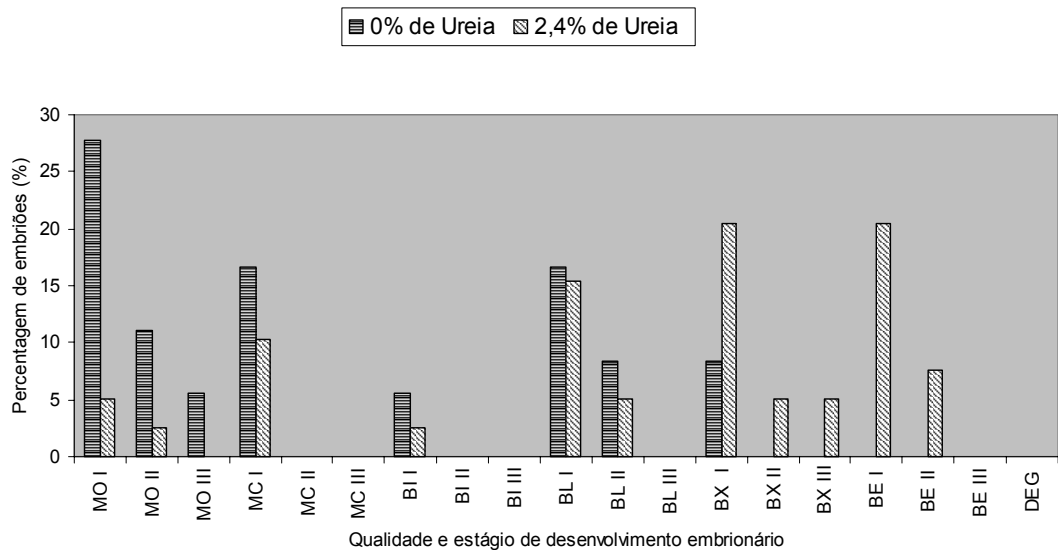


Figura 5. Percentagem, qualidade e estágio de desenvolvimento embrionário de cabras Toggenburg alimentadas com uréia na dieta. MO: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido; DEG: degenerados; I: embrião excelente; II: embrião bom; III: embrião regular.

Com exceção do número de folículos  $\geq 5$  mm de diâmetro ( $P < 0,05$ ), o tratamento com e sem uréia não influenciou as variáveis ovarianas avaliadas antes da primeira aplicação de FSH ( $P > 0,05$ ) (Tabela 8).

O número de folículos grandes foi reduzido nos animais tratados com 2,4% de uréia em relação àqueles dos animais não alimentados com uréia ( $P < 0,05$ ). Por ser este o primeiro estudo a avaliar o status folicular antes da superovulação em animais alimentados com uréia, não há como comparar com outros estudos.

Tabela 8. *Status* folicular antes da aplicação de FSH em cabras Toggenburg alimentadas com uréia na dieta

Número de folículos em cada classe de diâmetro	Concentrações de uréia na dieta (% MS)		
	0	2,4	CV (%)
≥ 3 e < 4 mm (pequenos)	5,9 ± 3,9 <sup>a</sup>	4,2 ± 3,5 <sup>a</sup>	79,5
≤ 4 e > 5 mm (médios)	1,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	79,5
≥ 5 mm (grandes)	2,5 ± 2,0 <sup>a</sup>	1,1 ± 1,0 <sup>b</sup>	88,6
Maior folículo (mm)	0,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	17,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem a 5% pelo teste t

O número de folículos grandes foi correlacionado positivamente com o número de embriões coletados ( $r=0,33$ ,  $P=0,14$ ), número de embriões viáveis ( $r=0,33$ ,  $P=0,14$ ), número de embriões excelentes e bons ( $r=0,34$ ,  $P=0,15$ ) e com a percentagem de embriões excelentes e bons ( $r=0,43$ ,  $P<0,10$ ). Da mesma forma, GONZALES-BULNES et al. (2003) observaram correlação positiva entre o número de folículos de 4-6 mm de diâmetro e o número de embriões coletados e embriões viáveis em cabras. A falta de uma associação entre o número de folículos com diâmetro de 2-3 mm e o número de embriões coletados, também foram descritos por GONZALES-BULNES et al. (2003) em cabras, o que sugere que pequenos folículos crescem até o estágio pré-ovulatório, mas não são capazes de liberar um oócito viável. Possivelmente estes folículos estariam em estádios iniciais de atresia ou imaturos. Parece que a uréia exerce um efeito no seu crescimento, pois como pode ser observado na Tabela 6, o número destes folículos foi numericamente inferior aos das cabras alimentadas com 2,4% de UMS.

## **CONCLUSÃO**

O fornecimento de 2,4% de uréia na matéria seca da dieta não influenciou o número e a qualidade dos embriões coletados de cabras não lactantes da raça Toggenburg, porém houve um maior desenvolvimento nos animais tratados com uréia na dieta.

O status folicular avaliado antes da primeira aplicação de FSH teve correlação com o número de embriões coletados e com o número e a porcentagem de embriões excelentes e bons.

## **AGRADECIMENTOS**

CNPq, Shering Plough<sup>®</sup>, Tecnopec<sup>®</sup>, Carbogel<sup>®</sup>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, N.G.; TORRES, C.A.A.; RODRIGUES, M.T.; *et al.* Efeito do nível de uréia na dieta sobre o desempenho, a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário em cabras Alpinas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.996-1005, 2007.
- ALVES, N.G. *Efeito de uréia na dieta sobre características reprodutivas e concentração de progesterona e metabólicos em cabras da raça Alpina*. 2005. 150f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- ALVES, F.R. *Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante o 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. 79f. Tese (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; VISINTIN, J.A.; *et al.* Superovulação em caprinos da raça Moxotó com FSH-p. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, p.32-36, 2000.
- ANDRIOLI-PINHEIRO, A.; SALLES, H.O.; MOURA SOBRINHO, P.A.; *et al.* Fatores relevantes para implantação de um programa de transferência de embriões em caprinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 11, 1996. Anais...Canela, RS: SBTE, p. 193, 1996.
- ANDROUKOVITCH, J.L.; KOZICKI, L.E.; KOZENJAKIN, D.A.; *et al.* Coleta de embriões caprinos com sonda uretral humana. *Archives of Veterinary Science*, v.7, p. 37-41, 2002.
- BERARDINELLI, J.B.; WENG, J.; BURFENING, P.J. *et al.* 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, p.193–199, 2001.
- BISCHONGA, C.; ROBINSON, J.J.; McEVOY, T.G.; *et al.* Excess dietary urea intake in ewes and its effect on ovulation rate and embryo

- developmental. *Japan Journal Veterinary Research*, v.44, p.139-151, 1996.
- BLANCHARD, T.; FERGUSON, J.; LOVE, L. *et al.* 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.
- 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 Cattle*, v.60, p.1725-1733, 1977.
- DAWUDA, P.M.; SCARAMUZZI, R.J.; LEESE, H.J.; *et al.* Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.58, p.1443-1455, 2002.
- ELROD, C.C.; BUTLER, W.R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*, v.71, p.694-701, 1993.
- 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, p.395-400, 2001.
- FERNANDEZ, J.M.; SAHLU, T.; LU, C.D.; *et al.* Production and metabolic aspects of nonprotein nitrogen incorporation in lactation rations of dairy goats. *Small Ruminant and Research*, v.26, p.105-117, 1997.
- FERREIRA, F.A. *Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade do complexo cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões In vitro*. 2007. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- GARDNER, D.K.; LANE, M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction*, v.48, p.377-385, 1993.
- GATH, V.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P. *et al.* Effects of diet type on establishment of pregnancy and embryo development in beef heifers. *Theriogenology*, v.51, p.224, 1999 (Abstract).

- GONZALES-BULNES, A.; CARRIZOSA, J.A.; DIAZ-DELFA, C.; *et al.* Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant and Research*, v.48, p.9-14, 2003
- GORDON, I. Embryo transfer and associated techniques in goats. In: \_\_\_\_ *Controlled reproduction in sheep and goats*. Cambridge, UK: University Press, 1997, v.2, p.416-439.
- JORDAN, E.R.; CHAPMAN, T.E.; HOLTAN, D.W.; *et al.* Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.66, p.1854-1862, 1983.
- HAMMON, D.S.; WANG, S.; HOLYOAH, R.G. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. *Animal Reproduction Science*, v.58, p.1-8, 2000a.
- HAMMON, D.S.; WANG, S.; HOLYOAH, R.G. Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v.59, p.23-30, 2000b.
- KENNY, D.A.; BOLAND, M.P.; DISKIN, M.G.; *et al.* Effect of rumen degradable protein with or without fermentable carbohydrate supplementation on blood metabolites and embryo survival in cattle. *Animal Science*, v.74, p.529-537, 2002.
- LIMA-VERDE, J.B.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; *et al.* Colheita de embriões pela técnica trans-cervical em cabras da raça Saanen criadas nos trópicos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.489-490, 2003.
- McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; *et al.* 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, p.71-90, 1997.
- MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH initiated on day 0 or day 3 postovulatory in goats. *Theriogenology*, v.58, p.1713-1721, 2002.
- MIKKOLA, M.; MANTYSAARI, P.; TAMMIRANTA, J.P.; *et al.* Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Animal Reproduction Science*, v.87, p.193-202, 2005.

- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL Nutrient requirements of goats: Angora, dairy, and meat goats in temperate and tropical countries. Washington, D.C.: National Academy, 1981. 91p.
- OLIVEIRA, M.M.N.F. *Uréia para vacas leiteiras no pós-parto: dinâmica folicular e características reprodutivas*. Viçosa, MG: UFV, 2001. 93p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa.
- PAPADOPOULOS, S.; LONERGAN, P.; GATH, V.; *et al.* Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology*, v.55, p.1059-1069, 2001.
- POWELL, K.; ROOKE, J.A.; MCEVOY, T.G.; *et al.* Zygote nitrogen metabolism and in vitro embryo culture perturbs in utero development and IGF2R expression in ovine fetal tissues. *Theriogenology*, v.66, p.1901-1912, 2006.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3.ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. 180p.
- SINCLAIR, K. D.; KURAN, M.; GEBBIE, F. E.; *et al.* 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, p.2670-2680, 2000.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 2003. 149p.

## **Perfil Hormonal e metabólico do sangue e do fluido folicular de cabras da raça Saanen doadoras de oócitos alimentadas com uréia**

**RESUMO:** Este estudo foi conduzido com 10 cabras da raça Saanen não gestantes e não lactantes, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado e alimentadas com 0% de uréia na Matéria Seca da dieta (UMS) (T1, n=5) ou 2,4% UMS (T2, n=5). Previamente à aspiração folicular por laparotomia os animais foram adaptados semanalmente a concentrações crescentes de uréia na dieta (0, 1,0 e 2,4% UMS, respectivamente para semana cada semana 1, 2 e 3), sincronizados e superestimulados. Após 19 dias de alimentação com 2,4% (semana 3) de UMS procedeu-se a aspiração folicular para recuperação de fluido folicular (FF) que foi analisado para determinação das concentrações de estradiol, progesterona, testosterona, glicose e uréia. Paralelamente, uma coleta de sangue para dosagem de glicose e uréia no plasma foi obtida por punção da veia jugular, no dia da aspiração folicular. A concentração de estradiol no FF das cabras alimentadas com uréia foi menor em relação às não alimentadas ( $P < 0,05$ ), a concentração de progesterona não diferiu entre os animais dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) e a concentração de testosterona foi menor no FF dos animais que não consumiram uréia ( $P < 0,05$ ). As concentrações de glicose e uréia no FF foram maiores nos animais consumindo dietas com 2,4% de uréia ( $P < 0,05$ ). As concentrações de glicose e de uréia no plasma foram influenciadas pelo tratamento com 2,4% UMS, sendo observadas maiores concentrações nos animais tratados em relação aos não tratados com uréia na dieta ( $P < 0,05$ ). Correlações foram observadas entre a concentração de glicose e uréia no plasma e as concentrações FF, sendo maiores concentrações observadas no FF em relação às concentrações plasmáticas para ambos os metabólitos. O fornecimento de uréia na dieta pode alterar a concentração de hormônios e metabólitos do FF relacionados à esteroideogênese e ao metabolismo do oócito.

**Palavras-chave:** cabras, esteroideogênese, fluido folicular, metabólitos sangüíneos

## **Blood and follicular fluid Hormone and metabolic pathway from oocyte donors Saanen breed goats feed with urea in the diet**

**ABSTRACT:** This study was conducted with 10 non-pregnant and non-lactating Saanen goats, which had been distributed in a randomized design and fed with diets with 0 (n=5) and 2.4% of urea in the Dry Mater (UDM) of the diet (n=5). Previously to follicular aspiration by laparotomy the animals had been weekly adapted to increase urea in the diet (0, 1.0 and 2.4%, respectively to 1, 2 and 3 week), estrus synchronized and stimulated hormonally. After 19 days of fed with 2.4% UDM, follicular aspiration was proceed for follicular fluid (FF) recovery, which was analyzed to determine oestradiol, progesterone, testosterone, glucose and urea concentration. One blood sample was collected from jugular vein puncture at follicular aspiration time to determine plasmatic urea and glucose concentration. Follicular fluid oestradiol concentration was lower in goats fed with urea compared with those without urea ( $P<0.05$ ), but progesterone concentration did not differ among animal from treatments ( $P>0.05$ ), and the follicular testosterone concentration was lower in the control animals ( $P<0.05$ ). The FF glucose and urea concentration were higher in the animals treated with 2.4% of urea ( $P<0.05$ ). The plasma glucose and urea concentration were affected by treatment with 2.4% UDM, and higher concentration were observed in the animals treated in relation to those not treated with urea in the diet. Pearson correlation was observed between plasma glucose and urea and FF concentration, including high concentration observed in FF in relation to plasma concentration in both metabolites. Urea concentration in the diet may alter the hormone and some metabolites concentration on FF profile related to steroidogenesis and oocyte metabolism.

**Key words:** goats, steroidogenesis, follicular fluid, blood metabolites

## INTRODUÇÃO

Para aperfeiçoar a utilização da aspiração folicular em termos de número e qualidade dos complexos *cumulus* oócitos (COCs) recuperados e a competência para o desenvolvimento *in vitro* é necessário conhecer melhor a fisiologia reprodutiva da fêmea, principalmente no que diz respeito à foliculogênese e seu controle endócrino.

A qualidade do oócito recuperado é determinada, entre outras características, pela presença ou ausência de células do *cumulus*. O papel destas células no desenvolvimento completo da competência dos oócitos é investigado há bastante tempo (LEIBFRIED e FIRST, 1979). Assim, tem se demonstrado que não há maturação ou esta ocorre em menor escala, quando as células do *cumulus* são removidas antes dos oócitos serem maturados *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002).

Estudos recentes têm revelado relações entre nutrição e melhora da fertilidade de ruminantes nos períodos em que a sensibilidade aos fatores nutricionais é maior, como na produção de gametas (ROBINSON et al., 2006).

Aliado a isso, com a utilização cada vez maior das biotecnologias da reprodução na espécie caprina e frente à demanda de menores custos de produção, a inclusão de uréia na dieta de doadoras de oócitos poderia ser uma medida econômica, desde que não se observa efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e maturação de oócitos e também sobre a qualidade futura do embrião formado, após a fecundação.

Uma das maneiras de se verificar o desenvolvimento normal de oócitos seria por meio de estudos das concentrações dos hormônios e metabólitos do fluido folicular, que provê um micro-ambiente para o curso normal de desenvolvimento destes. As concentrações de alguns constituintes do fluido folicular podem estar relacionadas à aquisição da competência do desenvolvimento pelo oócito. A progesterona e o estradiol do fluido folicular, produzidos pelas células somáticas dos folículos, são os dois maiores reguladores do desenvolvimento folicular e sua atresia. A atresia tem sido caracterizada pelo aumento das concentrações de progesterona e decréscimo na produção de estradiol pelo folículo (IRELAND e ROCHE, 1982; IRELAND e ROCHE, 1983; SPICER et al., 1987). Contrariamente, folículos sadios têm alta

concentração de estradiol e baixa progesterona (HAZELEGER et al., 1995). Portanto, as variações nas concentrações destes esteróides no fluido folicular indicam mudanças na taxa de produção pelas células foliculares, que também podem ter efeitos nos oócitos.

Outra maneira de se verificar o desenvolvimento normal dos oócitos seria por meio do seu cultivo em sistemas *in vitro* em meios propícios que provessem condições para o desenvolvimento até a fertilização e bom desenvolvimento dos embriões. Para tal o conhecimento da composição do fluido folicular ovariano se faz necessário, visto que, esse é responsável por manter o desenvolvimento da meiose, proteção contra a proteólise, extrusão do oócito durante a ovulação, aumento da atração espermática, motilidade e reação do acrossoma além de agir como tampão contra efeitos hematológicos adversos (ORCI et al., 2005).

Ruminantes alimentados com dietas que continham excessiva quantidade de proteína e uréia ou que foram infundidos com uréia ou amônia apresentaram alterações das composições iônica, hormonal e metabólica dos fluidos do útero e do oviduto (ELROD et al., 1993; ELROD e BUTTLER, 1993; KENNY et al., 2002; RHOADS et al., 2004). Poucos trabalhos relacionaram os efeitos destas dietas sobre o ambiente folicular (SINCLAIR et al., 2000; HAMMON et al., 2000; HAMMON et al., 2005), sendo a maioria destes relacionadas à concentração de amônia no fluido folicular de vacas.

A determinação das concentrações dos constituintes do fluido folicular e suas correlações com as concentrações séricas dos mesmos constituintes sanguíneos são necessários, pois como o conteúdo sérico é em parte uma extensão dos constituintes foliculares e de compostos produzidos localmente, a mensuração de um desses fluidos poderia refletir indiretamente na determinação de outro. Além disso, o maior conhecimento do ambiente onde o oócito se desenvolve pode ser um indicativo da atividade das células foliculares (GERARD et al., 2002).

Assim, objetivou-se avaliar se a inclusão de uréia na dieta (2,4% da matéria seca total) teria efeito sobre as concentrações metabólicas e hormonais do fluido folicular e ainda relacionar estas alterações com as concentrações plasmáticas de glicose e de uréia.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado na Fazenda Água Limpa, município de Piau-MG, no período de junho a julho de 2006, durante a estação de acasalamento natural das cabras.

Foram utilizadas cabras (n=10) da raça Saanen, não gestantes, não-lactantes, nulíparas, primíparas e múltíparas com  $55,60 \pm 30,8$  meses,  $52,4 \pm 7,12$  kg e  $2,12 \pm 1,2$  ECC, divididas em dois tratamentos em função da concentração de uréia na MS da dieta. O tratamento 1 (controle, n=5 cabras), recebeu dieta a base de feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* spp) e concentrado formulado com 0% de uréia na matéria seca total da dieta (UMS). O tratamento 2 (2,4% UMS, n=5 cabras) recebeu o mesmo volumoso e concentrado com 2,4% de UMS da dieta, com adaptação semanal às concentrações intermediárias de uréia (Tabela 1). A relação dos animais, data de nascimento, peso e ECC são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Adaptação semanal dos animais as dietas experimentais.

Tratamento	Sem. 1 (adaptação)	Sem. 2 (adaptação)	Sem. 3 (adaptação)	Sem. 4	Sem. 5 até a aspiração
T1	0 %UMS	0 %UMS	0 %UMS	0 %UMS	0 %UMS
T2	0 %UMS	1,0 %UMS	2,0%UMS	2,4%UMS	2,4%UMS

Tabela 2. Relação dos animais experimentais, idade, peso e ECC.

Cabra	Data de nascimento	Peso (kg)	ECC (0 a 5)	Tratamento
0018	31/12/00	49,00	1,25	T1
0029	31/12/97	51,60	1,25	T1
2283	17/06/02	67,20	3,50	T1
4444	14/09/04	47,40	3,50	T1
97014	31/12/97	49,20	1,25	T1
0022	31/12/97	50,10	1,50	T2
0023	31/12/00	56,00	1,25	T2
2328	11/09/02	50,10	2,75	T2
5483	30/04/05	46,20	3,25	T2
97004	31/12/97	49,20	1,25	T2

Os animais foram manejados em grupo, instalados em baia coberta, com de piso ripado de 5m<sup>2</sup>, providas de comedouro, bebedouro e cocho para sal mineral.

Dietas a base de feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* spp) e concentrado foram calculadas para serem isoenergéticas e isoprotéicas (1,4 Mcal/Kg MS e 14% PB/Kg MS) e conter 14 % da proteína total na forma de nitrogênio não protéico (NNP). As porcentagens de NNP advindas da uréia em relação a proteína total da dieta foram de 0%, 13%, 26% e 39,25% para as dietas com 0%, 1,0%, 2,0% e 2,4% respectivamente. Detalhes da composição da dieta são apresentados na Tabela 3.

A alimentação foi fornecida duas vezes por dia, às 7:30 e 16:30 hs na forma de mistura completa, sendo a quantidade ajustada diariamente para permitir 10% de sobras. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

A composição bromatológica do feno e dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (com base na MS)

Ingredientes	Tratamentos (% UMS da dieta)			
	0	1,0	2,0	2,4
Feno de capim Tifton	52	53	52	53
Fubá de milho	4	9	12	22,5
Farelo de soja	12	7	3	0
Farelo de trigo	27	27	27	18,2
Bicarbonato	1	1	1	1
Núcleo	1	1	1	1
Uréia	0	1	2	2,4
Calcáreo	3	3	3	2,3

Tabela 4. Análise bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (<sup>1</sup> % na MS)

	Ingredientes			
	Feno de Capim Tifton	Fubá de milho	Farelo de trigo	Farelo de soja
MS (%)	91,75	86,94	87,15	88,35
PB <sup>1</sup>	6,53	7,19	13,81	48,78
EE <sup>1</sup>	0,86	3,55	3,38	2,09
Lignina <sup>1</sup>	6,16	1,16	4,0	1,33
FDN <sup>1</sup>	70,28	20,54	37,81	12,55
FDA <sup>1</sup>	39,79	4,08	13,52	9,86
CHOT <sup>1</sup>	87,49	87,89	77,27	42,67
NDT <sup>1</sup>	55,62	87,24	72,43	81,54
Cinzas <sup>1</sup>	5,12	1,38	5,54	6,47
Ca <sup>1</sup>	0,42	0,03	0,22	0,34
P <sup>1</sup>	0,17	0,25	1,00	0,58

CHOT = 100 – (%PB + %EE + %Cinzas)

As cabras tiveram seus ciclos estrais sincronizados com esponja intravaginal contendo 60 mg de acetato medroxiprogesterona (Progespon<sup>®</sup>)<sup>15</sup> por 10 dias e 125 µg de cloprostenol (Ciosin<sup>®</sup>)<sup>16</sup> 48 horas antes da remoção da esponja. A esponja foi removida imediatamente antes do procedimento de aspiração folicular. Em adição, o desenvolvimento folicular foi estimulado com 70 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V<sup>®</sup>)<sup>17</sup> e 300 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>)<sup>18</sup>, via i.m., administrados 36 horas antes da aspiração folicular (BALDASSARE et al., 2003) (Figura 1).

<sup>15</sup> Sintex

<sup>16</sup> Coopers

<sup>17</sup> Bioniche, Importado por Tecnopec LTDA, SP, Brasil.

<sup>18</sup> Sintex

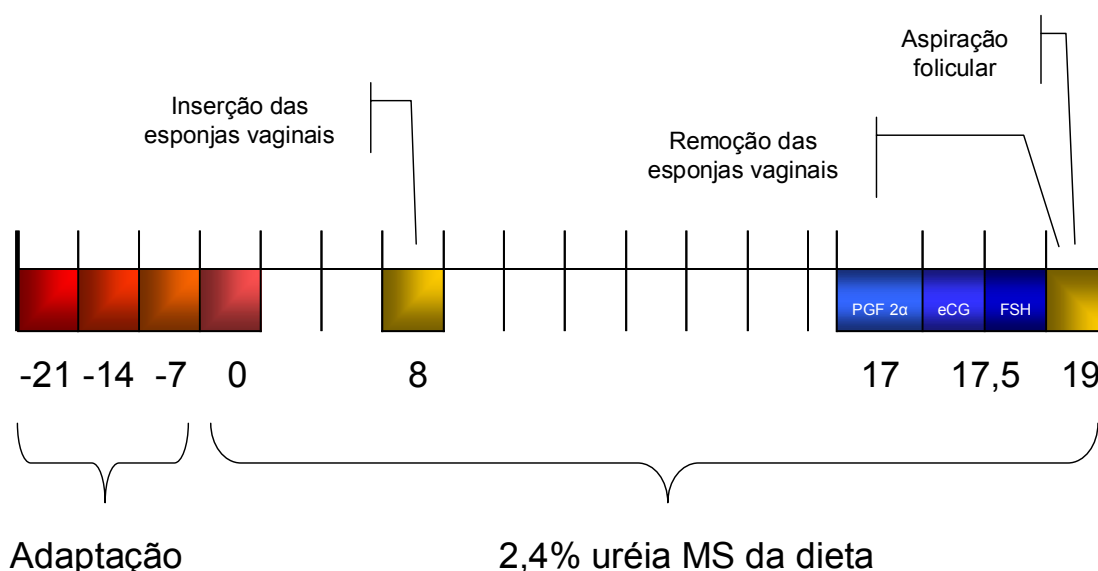


Figura 1. Esquema da sincronização do ciclo estral e estimulação ovariana para aspiração folicular.

Após jejum hídrico e alimentar de 24 h, os animais receberam, como medicação pré-anestésica, realizada 10 minutos antes do início dos procedimentos, 1 mL/100kg/i.m. de acepromazina a 1% (Acepran<sup>®</sup>)<sup>19</sup> e, em seguida procedeu-se a aplicação de lidocaína 2% sem vaso constritor (Lidovet<sup>®</sup>)<sup>20</sup>, 2 mL/animal, epidural. Após a sedação, a fêmea foi colocada em maca cirúrgica apropriada, e posicionada em *Trendelenburg*, contida nas patas dianteiras e traseiras. No campo cirúrgico, região do abdome cranial ao úbere, foi feita tricotomia e anti-sepsia com tintura de iodo, e em seguida, a anestesia local infiltrativa com 20 mL de cloridrato de lidocaína 2% com vaso constritor (Lidovet<sup>®</sup>)<sup>21</sup>, na região periférica à linha branca (Figura 2a). Em seguida fez-se a incisão de 10 cm na linha branca até a abertura do peritônio, para exposição do ovário e aspiração folicular (Figura 2b). Foram administrados Flunixin-Meglumime (Banamine<sup>®</sup>)<sup>22</sup>, 1,1 mg/kg p.v., 10 min antes do procedimento de laparotomia. Após a cirurgia foram administrados cloridrato de oxitetraciclina,

<sup>19</sup> Univet S.A. Indústria Veterinária, SP, Brasil.

<sup>20</sup> Bravet, RJ, Brasil.

<sup>21</sup> Bravet, RJ, Brasil.

<sup>22</sup> Schering Plough Veterinária

(Terramicina LA<sup>®</sup>)<sup>23</sup>, 1 mL/10 kg p.v., em duas aplicações com intervalo de 3 dias. Após as aspirações os ovários foram banhados com soro fisiológico e aplicou-se heparina gel (Trombofob<sup>®</sup>)<sup>24</sup> a fim de evitar futuras aderências.

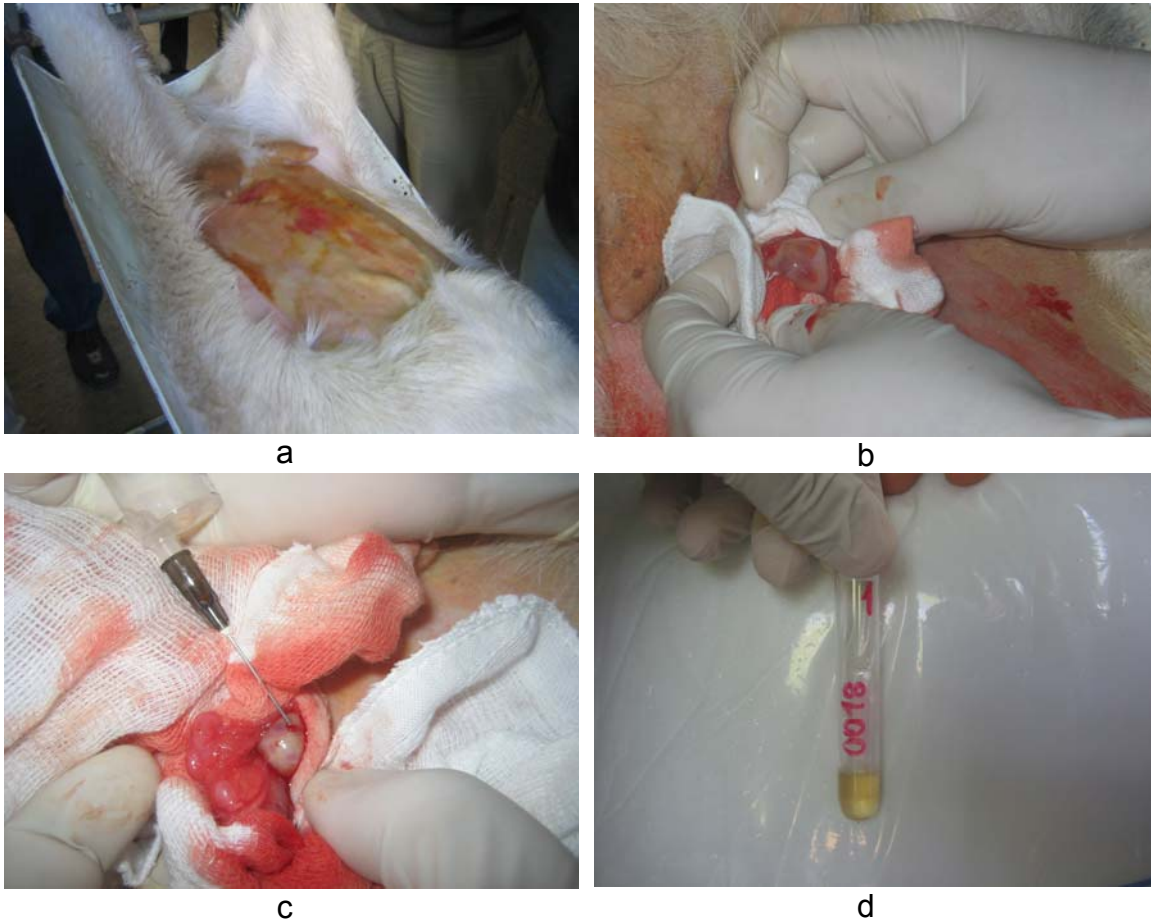


Figura 2. Passos para a coleta do fluido folicular.

As aspirações para a colheita do fluido folicular foram realizadas uma vez em cada animal e os dois maiores folículos presentes em cada ovário (Figura 2b) foram aspirados com auxílio de seringa descartável de 5mL, sem êmbolo de borracha, acoplada a agulha hipodérmica de 22G1 (BD<sup>®</sup>)<sup>25</sup> (Figura 2c). O fluido recolhido foi transferido para tubos estéreis (Figura 2d) mantidos em banho de gelo até a sua centrifugação a 894 G por 15 minutos em centrífuga laboratorial refrigerada a 5 °C. O sobrenadante foi aspirado sob

<sup>23</sup> Pfizer Saúde Animal

<sup>24</sup> Knoll Produtos Químicos e Farmacêuticos. Ltda.

<sup>25</sup> BD – Juiz de Fora, Brasil.

banho de gelo e acondicionado em tubos *ependorfs* estéreis, os quais foram armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a realização das análises de progesterona, testosterona, estradiol, glicose e uréia. As análises foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Utilizando-se de metodologia enzimática-colorimétrica, as análises dos metabólitos descritos foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico e automático de Bioquímica Alizé<sup>26</sup> (Figura 3a), segundo as recomendações dos kits comerciais da marca Bioclin<sup>®27</sup>. Os hormônios descritos foram determinados por quimioluminescência<sup>28</sup> (Figura 3b) pela técnica imunoenzimática, utilizando-se de kits comerciais da marca Beckman Coulter INC<sup>®</sup>.



Figura 3. Equipamentos utilizados para as dosagens hormonais e metabólicas do sangue e do flúido folicular.

Amostras de sangue foram coletadas no dia da aspiração folicular por punção da veia jugular em tubos de vidro de coleta à vácuo, com EDTA ou Fluoreto, respectivamente, para dosagem de uréia e de glicose no plasma. O sangue coletado foi acondicionado em banho de gelo e centrifugado a 2739 G por 15 minutos a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi aspirado e armazenado em tubos

<sup>26</sup> Biomérieux, USA.

<sup>27</sup> Glicose Monoreagente K082, Uréia Cinética K056, - Bioclin<sup>®</sup> fabricado por Quibasa Química Básica, MG, Brasil.

<sup>28</sup> Access<sup>®</sup> - USA

*eppendorfs* estéreis, a -20 °C até as análises. As análises de glicose e uréia foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Utilizando-se de metodologia enzimática-colorimétrica, as análises dos metabólitos descritos foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico e automático de Bioquímica Alizé (Figura 3a), segundo as recomendações dos kits da marca Bioclin®.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados pelo programa SAEG 8.0 (UFV, 1997). Foi realizada a análise de variância e utilizado o teste SNK para comparação de médias entre os tratamentos, com nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os animais utilizados apresentaram resposta ao tratamento superestimulatório, confirmado por meio da visualização de folículos na superfície dos ovários.

As concentrações hormonais do fluido folicular analisado encontram-se na Tabela 5. As concentrações intra-foliculares de estradiol foram menores no tratamento com 2,4% de UMS em relação ao tratamento com 0% UMS ( $P < 0,05$ ). As concentrações intra-foliculares de progesterona não foram influenciadas pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ) e as concentrações de testosterona foram maiores no tratamento com 2,4% de UMS ( $P < 0,05$ ). A relação estradiol:progesterona (ETP) foi maior no tratamento com 0% de UMS em relação ao tratamento com 2,4% de UMS ( $P < 0,05$ ). Da mesma maneira, a relação estradiol:testosterona (ETT) foi maior no fluido folicular de cabras alimentadas com 2,4% de UMS ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5. Concentrações hormonais (média  $\pm$  desvio padrão) do fluido folicular de cabras alimentadas com uréia

Hormônios e suas relações	Concentrações de uréia (%MS)	
	0%	2,4%
Estradiol (ng/mL)	4,97 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	4,02 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
Progesterona (ng/mL)	2,48 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	3,37 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
Testosterona (ng/mL)	1,17 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	3,20 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>
Taxa Estradiol/Progesterona	4,24	1,19
Taxa Estradiol/Testosterona	1,56	1,25

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem a 5% pelo teste SNK

O fluido folicular forma o ambiente bioquímico do oócito antes da ovulação, o qual fica contido em um compartimento avascular do ovário de mamíferos, separado do estroma peri-folicular ovariano pela parede folicular, que constitui a barreira hemato-folicular. Mudanças nas concentrações hormonais e metabólicas deste ambiente podem refletir na qualidade do oócito.

As concentrações de alguns constituintes particulares do fluido folicular pode ser relacionada à aquisição da competência do desenvolvimento pelo oócito. A progesterona do fluido folicular e o estradiol, produzidos pelas células somáticas dos folículos, são os dois maiores reguladores do desenvolvimento folicular e atresia. A atresia tem sido caracterizada pelo aumento das concentrações de progesterona e decréscimo na produção de estradiol pelo folículo (IRELAND e ROCHE, 1982; IRELAND e ROCHE, 1983; SPICER et al., 1987). Contrariamente, folículos saudáveis têm alta concentração de estradiol e baixa de progesterona. Então, conforme pode ser observado na Tabela 5, folículos provenientes de ambiente folicular com maior concentração de estradiol e menor concentração de progesterona do tratamento sem uréia tem indícios de serem mais saudáveis que aqueles onde estas concentrações são mais elevadas, como no caso daqueles provenientes dos animais alimentados com 2,4% de UMS.

Sabe-se também que o estradiol é responsável pela promoção da expressão de receptores de FSH e de LH, aumentar a atividade da aromatase e síntese de IGF-1 pelas células da granulosa. Assim, a diminuição da

concentração de estradiol no fluido folicular de oócitos de animais alimentados com uréia na dieta pode ser um indicativo que algum desses mecanismos seria afetado e poderia levar ao desenvolvimento de um oócito de baixa qualidade.

Por outro lado, SINCLAIR et al. (2000) não observaram efeitos do fornecimento de dietas geradoras de alta e baixa concentração de amônia plasmática a novilhas, sobre as concentrações de estradiol no fluido folicular após 17 dias de fornecimento destas dietas. Entretanto as concentrações de progesterona intra-foliculares foram maiores nos animais alimentados com dieta que promoveu uma alta concentração de amônia plasmática em relação aqueles de baixa amônia plasmática. Concomitante, foram observados poucos oócitos que se desenvolveram ao estágio de blastocisto após maturação, fertilização e cultivo *in vitro* provenientes de animais que apresentaram altas concentrações de amônia circulante.

Para WEHRMAN et al (1993), citados por O'CALLAGHAN et al. (2000) baixas taxas de concepção foram verificadas e atribuídas a qualidade do oócito que se desenvolveram em presença de baixas concentrações de progesterona e alta de estradiol.

Concentrações de progesterona e de LH nos períodos pré e peri-ovulatórios fora dos padrões considerados normais são responsáveis por alterações na maturação do oócito. Apesar de não se ter observado diferenças nas concentrações de progesterona entre os animais dos tratamentos deste estudo, observa-se que para os animais alimentados com 2,4% de UMS, uma tendência no aumento das concentrações intra-foliculares deste hormônio. Ainda são escassos os trabalhos relativos aos efeitos de concentrações de uréia na dieta sobre as concentrações de hormônios intra-foliculares relacionados à esteroideogênese.

As concentrações de testosterona encontradas no presente estudo indicaram que animais alimentados com 2,4% de UMS podem possuir uma menor atividade de esteroideogênese, provavelmente relacionada a ineficiência da enzima P450<sub>scc</sub>, a qual é responsável pela conversão da testosterona em estradiol nas células da granulosa, sob estímulo do FSH. Sendo que, esta conversão refletiu na menor concentração de estradiol nos folículos dos animais alimentados com 2,4% de UMS. O que também poderia ser relacionado ao maior número de receptores de LH nas células da teca o que

promoveria uma maior concentração de testosterona no fluido folicular dos animais alimentados com 2,4% de UMS.

Tem sido sugerido que o potencial de desenvolvimento de oócitos humanos é intimamente relacionado a razão estrógeno:andrógeno no fluido folicular, em relação somente a concentração absoluta de estrógeno (ANDERSEN, 1993). Esta mesma razão serve como parâmetro para distinguir folículos saudáveis de folículos em processo de atresia com diâmetro maior que 6 mm (SEIBEL et al., 1989). Folículos saudáveis contêm uma ETT significativamente maior em relação aqueles atrésicos (FUKUDA et al., 1995).

As concentrações de N-uréia e de glicose no fluido folicular foram influenciadas pela adição de uréia na dieta ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5). Maiores concentrações intra-foliculares destes, foram observadas em fluido folicular de animais alimentados com 2,4% de UMS ( $P < 0,05$ ).

Tabela 6. Concentrações de metabólitos (média  $\pm$  desvio padrão) do fluido folicular de cabras alimentadas com uréia

Metabólitos	Concentrações de uréia (%MS)	
	0%	2,4%
Glicose (mg/dL)	84,78 $\pm$ 5,58 <sup>b</sup>	91,44 $\pm$ 3,60 <sup>a</sup>
N-Uréia (mg/dL)	18,00 $\pm$ 2,35 <sup>b</sup>	23,04 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem a 5% pelo teste SNK

Os folículos são capazes de isolar os oócitos de concentrações baixas de glicose. Nas células do *cumulus*, a glicose é primariamente convertida pela via glicolítica em piruvato e lactato, os quais são responsáveis pela produção de ATP (SUTTON et al., 2003). No oócito, entretanto, a glicose é predominantemente utilizada pela via da pentose fosfato para a síntese de DNA e RNA (SUTTON et al., 2003). Apesar deste relativo nível de utilização, a glicose é uma molécula indispensável durante a maturação do oócito, especialmente por causa da atividade da via da pentose fosfato, sendo que a glicólise (produção de ATP), é envolvida no progresso da meiose e crítica para a capacidade de desenvolvimento do oócito (CETICA et al., 2002; SUTTON et

al., 2003). A adição de glicose aos meios de maturação *in vitro* aumenta a expansão das células do *cumulus*, a maturação nuclear, a clivagem de embriões e o desenvolvimento de blastocistos (KRISHER e BAVISTER 1998; SUTTON-McDOWALL et al. 2004; BILODEAU-GOESEELS 2006).

Entretanto, o aumento das concentrações de glicose *in vivo* e *in vitro* aumenta a produção de ATP nas células do *cumulus*, devido a utilização de glicose pela via glicolítica, e contribui para redução da maturação do oócito (COLTON et al., 2002).

BAREJ e HARMEYER (1979) citados por VISEK (1984) sugeriram que a amônia tem um efeito inibitório sobre a secreção das células  $\beta$ -pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina. Assim, devido a este efeito inibitório a glicose estaria disponível na circulação e não estaria sendo utilizada pelos tecidos para geração de ATP.

As concentrações de glicose intra-foliculares são maiores que as concentrações séricas (LEROY et al., 2004), apesar de haver um grande consumo deste pelas células foliculares e pelo oócito. A glicose tem um importante papel no metabolismo ovariano como um todo, devido ser a maior fonte de energia para o ovário, possivelmente metabolizada pelo ovário pelas vias anaeróbicas, levando à formação de lactato. As concentrações de glicose têm sido correlacionadas positivamente com o diâmetro do folículo em cabras (THAKUR et al., 2003), ovelhas (NANDI et al., 2007) e vacas (LEROY et al., 2004; LANDAU et al., 2006).

Concentrações plasmáticas de N-uréia  $\geq 20$  mg/dL foram relacionadas a maiores concentrações de N-uréia no fluido folicular, em relação àquelas com concentrações plasmáticas  $< 20$  mg/dL (HAMMON et al., 2005). De WIT et al. (2001), encontraram menor proporção de oócitos que foram fertilizados, clivaram e de embriões que se desenvolveram quando 6mM de uréia foi adicionada ao meio de maturação. OCON e HANSEN (2003) encontraram uma menor proporção de oócitos bovinos que se desenvolveram a blastocistos quando 7,5 mM de uréia foi adicionado ao meio de maturação. Da mesma maneira, FERREIRA (2007) encontrou diminuição da taxa de eclosão de oócitos cultivados e inseminados *in vitro*, advindos de novilhas alimentadas com 75g de uréia sem previa adaptação.

O desenvolvimento normal de oócitos se dá pelo ambiente que o circunda, e assim, caso níveis inapropriados de alguns metabólitos se elevassem neste ambiente o desenvolvimento do oócito poderia ser comprometido. Ou ainda, o crescimento das células foliculares dependente de gonadotrofinas é necessário para o crescimento do folículo e ovulação, o qual também é controlado por fatores locais produzidos em processos autócrinos e parácrinos (KNIGHT & GLISTER, 2003) envolvendo comunicação entre o oócito e as células somáticas; estes processos, entretanto, podem ser modificados pelo ambiente folicular. Elevações nas concentrações de uréia no fluido folicular foram descritas em bovinos e foram relacionadas ao tamanho do folículo e também ao estado nutricional da fêmea (SINCLAIR et al., 2000; LEROY et al., 2004; HAMMON et al., 2005).

A concentração de amônia no fluido folicular de bovinos foi relacionada ao tamanho do folículo e esta diminuiu com o aumento do diâmetro do mesmo (HAMMON et al., 2005) o que pode indicar um modelo dinâmico da concentração de amônia no desenvolvimento de folículos, relacionado ao desenvolvimento de oócitos imaturos em um ambiente que contém concentrações elevadas de amônia maiores que a maioria das células somáticas.

Elevadas concentrações de amônia no fluido folicular pode indicar folículos em estágio de atresia, entretanto esta hipótese foi rejeitada por HAMMON et al. (2005) que utilizou fluido obtido de folículos advindos de ovários de animais sem nenhum tratamento com uréia. Segundo FORTUNE (1994) que revisou o desenvolvimento de folículos bovinos, indicou que folículos de maior diâmetro têm maiores proporções de atresia em relação a folículos de menor diâmetro. Os mecanismos envolvidos na ineficiência reprodutiva de animais com elevada concentração de amônia circulante são desconhecidos, mas a amônia nos fluidos reprodutivos, devido a elevada concentração de proteína na dieta ou da elevada concentração de nitrogênio não protéico, podem estar relacionados (VISEK, 1984).

Além disso, POWELL et al. (2006) concluíram que os efeitos do metabolismo do nitrogênio materno anterior a recuperação dos zigotos influenciou o desenvolvimento fetal e a expressão gênica destes, o que

sustenta a hipótese que os efeitos do ambiente folicular e conseqüentemente no oócito pode contribuir para a etiologia da síndrome da prole grande.

As concentrações médias de glicose e de N-uréia no plasma no dia das aspirações foliculares foram influenciadas pelos tratamentos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 7). Nos animais alimentados com 2,4% de UMS foram observadas maiores concentrações plasmáticas de glicose e de uréia em relação àqueles não alimentados ( $P < 0,05$ ).

Tabela 7. Concentrações plasmáticas de glicose e uréia (média  $\pm$  desvio padrão) de cabras alimentadas com uréia na dieta

Metabólitos	Concentrações de uréia (%MS)	
	0%	2,4%
Glicose (mg/dL)	73,76 $\pm$ 7,73 <sup>b</sup>	76,77 $\pm$ 5,90 <sup>a</sup>
N-Uréia (mg/dL)	15,57 $\pm$ 3,31 <sup>b</sup>	17,18 $\pm$ 3,21 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem a 5% pelo teste SNK

Concentrações de uréia plasmáticas prejudiciais a fertilidade foram citadas como sendo próximas ou maiores que 40 mg/dL ou de 19 mg/dL de nitrogênio uréico plasmático (FERGUSON et al., 1989; FERGUSON et al., 1993; BUTTLER et al., 1996). O fornecimento de uréia na dieta tem resultado em aumento da concentração sistêmica deste metabólico (KENNY et al., 2002; DAWUDA et al., 2002; McEVOY et al., 1997; FAHEY et al., 2001; BISHONGA et al., 1996). Entretanto, outros estudos que utilizaram concentrações de uréia intermediárias na dieta, não observaram efeitos sobre as concentrações de uréia plasmática em vacas alimentadas com 0%; 0,7%; 1,4% e 2,1% de UMS (OLIVEIRA, 2001) e cabras alimentadas com 0%; 0,7%; 1,4% e 2,24% de UMS (ALVES et al., 2007) submetidas a tais dietas. Tal fato pode estar relacionado à alta degradabilidade ruminal da fonte protéica utilizada nos concentrados, ou devido à adaptação dos animais a altas concentrações de uréia na dieta, devido à alteração na atividade dos microorganismos ruminais e também à maior concentração das enzimas hepáticas relacionadas ao ciclo da uréia (PAYNE e MORRIS, 1969, citados por JORDAN et al., 1983). Tais hipóteses

não corroboram com as diferenças registradas nas concentrações deste metabólitos neste experimento.

As concentrações de glicose foram relacionadas à qualidade dos embriões no dia da coleta em cabras Alpinas alimentadas com 0; 0,7; 1,4 e 2,24% de UMS (ALVES et al., 2007), entretanto estas não diferiram entre os tratamentos supracitados. Da mesma forma FERNANDEZ et al. (1997) não verificaram diferenças nos teores de glicose no plasma de cabras da raça Alpina suplementadas com 1,43%; 1,77% e 2,86% de uréia na MS da dieta. Da mesma forma, KENNY et al. (2002) relataram que a concentração de glicose sistêmica não foi influenciada pelo fornecimento de 0 ou 240g de uréia/dia às novilhas.

Contrariamente, McEVOY et al. (1997) verificaram que o fornecimento de 30g de uréia/kg de alimento resultou em elevação do teor de glicose plasmática, comparado ao fornecimento de 2,5g de uréia/kg de alimento.

Por meio do perfil metabólico é possível estudar e corrigir doenças metabólico-nutricionais, monitorar a adaptação metabólica e diagnosticar desequilíbrios da homeostase de nutrientes (GONZÁLEZ, 2000). Alguns metabólitos sanguíneos são fortemente relacionados à qualidade dos gametas e embriões produzidos, pois refletem o estado nutricional das doadoras. Dentre estes se destacam a glicose e a uréia, pois um reflete o estado energético e o outro o estado protéico dos animais.

Os valores clínicos de referência para as concentrações de glicose e de N-uréia plasmáticas para caprinos variam de 50 a 75 mg/dL e 10 a 20 mg/dL, respectivamente (KANEKO et al., 1997), entretanto, valores de 21 a 60 mg/dL de N-uréia foram citados por PUGH, 2005.

Foram observadas ainda, correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de glicose e de N-uréia, onde o aumento ou diminuição na concentração de um metabólito foi acompanhado pelo aumento ou diminuição na concentração do outro ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,93$ ) entre as cabras alimentadas ou não com uréia na dieta, respectivamente.

As concentrações de uréia no plasma foram correlacionadas às concentrações foliculares deste metabólito ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,83$ ), e ainda, foram observados maiores concentrações foliculares em relação a concentrações plasmáticas ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, as concentrações de glicose no

plasma foram correlacionadas às concentrações foliculares ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,71$ ) e estas foram maiores no fluido folicular em relação às concentrações plasmáticas ( $P < 0,05$ ).

## **CONCLUSÃO**

A adição de uréia na dieta de cabras altera a concentração de hormônios relacionados à esteroideogênese e metabólitos relacionados ao metabolismo embrionário.

## **AGRADECIMENTOS**

CNPq, Shering Plough<sup>®</sup>, Tecnopec<sup>®</sup>, Embrapa Gado de Leite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, N.G.; TORRES, C.A.A.; RODRIGUES, M.T.; *et al.* Efeito do nível de uréia na dieta sobre o desempenho, a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário em cabras Alpinas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.996-1005, 2007.
- ANDERSEN, C.Y. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after *in vitro* fertilization. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v.77, p.1227-1234, 1993.
- BALDASSARE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; *et al.* Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v.59, p.831-839, 2003.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effect of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.66, p.297-306, 2006.
- BISCHONGA, C.; ROBINSON, J.J.; McEVOY, T.G.; *et al.* Excess dietary urea intake in ewes and its effect on ovulation rate and embryo developmental. *Japan Journal Veterinary Research*, v.44, p.139-151, 1996.
- 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, p.858-865, 1996.
- CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; *et al.* Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction*, v.124, p.675-681, 2002.
- COLTON, S.A.; PIEPER, G.M.; DOWNS S.M. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biology of Reproduction*, v.67, p.220-231, 2002.
- DAWUDA, P.M.; SCARAMUZZI, R.J.; LEESE, H.J.; *et al.* 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, A.A.C.; CESAR, M.L. F.; KRUIPT, 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, p.1800-1804, 2001.
- ELROD, C.C.; VAN AMBURGH, M.; BUTLER, W.R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *Journal Animal Science*, v.71, p.702-706, 1993.
- ELROD, C.C.; BUTLER, W.R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*, v.71, p.694-701, 1993.
- 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, p.395-400, 2001.
- FERGUSON, J.D.; BLANCHARDT, T.; GALLIGAN, D.T.; *et al.* Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.72, p.746-766, 1989.
- FERGUSON, J.D.; GALLIGAN, D.T.; BLANCHARD, T.; *et al.* Serum urea and conception rate: the usefulness of test information. *Journal of Dairy Science*, 76, 3742-3746, 1993.
- FERNANDEZ, J.M.; SAHLU, T.; LU, C.D.; *et al.* Production and metabolic aspects of nonprotein nitrogen incorporation in lactation rations of dairy goats. *Small Ruminant and Research*, v.26, p.105-117, 1997.
- FERREIRA, F.A. *Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade do complexo cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões In vitro*. 2007. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, v.50, p.225-232, 1994.
- FUKUDA, M.; FUKUDA, K.; ANDERSEN, C.Y.; *et al.* Healthy and atretic follicles: vaginosonographic detection and follicular fluid hormone profiles. *Human Reproduction*, v.10, p.1633-1637, 1995.
- GERARD, N.; LOISEAU, S.; DUCHAMP, G.; *et al.* Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the

- mare using proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>HNMR). *Reproduction*, v.124, p.241-248, 2002.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002, p.498-199.
- GONZÁLEZ, F.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.D. et al. (Eds). Perfil metabólico em ruminantes. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2000. p.63-74.
- 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, p.195-204, 2005.
- HAMMON, D.S.; WANG, S.; HOLYOAH, R.G. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. *Animal Reproduction Science*, v.58, p.1-8, 2000.
- HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STUBBINGS, R.B.; *et al.* Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, v. 43, p.509-522, 1995.
- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Growth and differentiation of large antral follicle after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal of Animal Science*, v.20, p.95-101, 1983.
- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Development of antral follicle in cattle following prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid and gonadotropin receptors. *Endocrinology*, v.111, p.2077-2086, 1982.
- JORDAN, E.R.; CHAPMAN, T.E.; HOLTAN, D.W. *et al.* Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.66, p.1854-1862, 1983.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>a</sup>ed., Academic press, California, 1997, 932p.
- KENNY, D.A.; HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J.; *et al.* Effect of elevated systemic concentration of ammonia and urea on the metabolite and ion

- composition of oviductal fluid in cattle. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1797-1804, 2002.
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*, v.15, p.165-183, 2003.
- KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, v.49, p.103-114, 1998.
- LANDAU, S.; BRAW-TAL, R.; KAIM, M.; *et al.* Preovulatory follicular status affects the insulin and glucose content of the follicles in high-yielding dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.64, p.299-314, 2006.
- LEIBRIFIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, v.48, p.76-86, 1979.
- LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGE, J.R.; *et al.* Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, v.62, p.1131-1143, 2004.
- McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; *et al.* 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, p.71-90, 1997.
- NANDI, S.; GIRISH KUMAR, V.; MANJUNATHA, B.M.; *et al.* The biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Developmental Growth Differentiation*, v.49, p.61-66, 2007.
- OCÓN, O.M.; HANSEN, P.J. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1194-1200, 2003.
- O'CALLAGAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; *et al.* Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p. 303-313, 2000.
- OLIVEIRA, M.M.N.F. *Uréia para vacas leiteiras no pós-parto: dinâmica folicular e características reprodutivas*. Viçosa, MG: UFV, 2001. 93p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa.

- ORCI, N.M.; GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H.J. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the estrus cycle. *Reproduction*, v.129, p.219-228, 2005.
- PAYNE, E.; MORRIS, J.G. The effect of protein content of the diet on the rate of urea formation in sheep liver. *Biochemistry Journal*, v. 113, p.659, 1969.
- POWELL, K.; ROOKE, J.A.; MCEVOY, T.G.; *et al.* Zygote nitrogen metabolism and in vitro embryo culture perturbs in utero development and IGF2R expression in ovine fetal tissues. *Theriogenology*, v.66, p.1901-1912, 2006.
- PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005, 513p.
- ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; *et al.* Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed science and Technology*, v.126, p.259-276, 2006.
- RHOADS, M.L.; GILBERT, R.O.; LUCY, M.C.; *et al.* Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.2896-2901, 2004.
- SEIBEL, M.M.; SMITH, D.; DLUGI, A.M.; *et al.* Periovulatory follicular fluid hormone levels in spontaneous human cycles *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v.68, p.1073-1077, 1989.
- SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; *et al.* 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, p.2670-2680, 2000.
- SPICER, L.J.; MATTON, P.; ECHTERNKAMP, S.E.; *et al.* Relationships between histological signs of atresia, steroids in follicular fluid, and gonadotropin binding in individual bovine follicles during postpartum anovulation. *Biology of Reproduction*, v.36, p.890-898, 1987.
- SUTTON-MCDOWALL M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*, v.128, p.313-319, 2004.
- SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex

and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, v.9, p.35-48, 2003.

THAKUR, R.S.; CHAUHAN, R.A.S.; SINGH, B.K. Studies on biochemical constituents of caprine follicular fluid. *Indian Veterinary Journal*, v.80, p.160-162, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genética). Viçosa: UFV, 1997. 149p.

VISEK, W.J. Ammonia: Its effects on biological systems, metabolic hormones and reproduction. *Journal of Dairy Science*, v.67, p.481-498, 1984.

## **Classificação dos folículos ovarianos e aspectos morfológicos de oócitos em cabras doadoras de gametas alimentadas com uréia na dieta**

**RESUMO:** Objetivou-se verificar os efeitos da adição de uréia na dieta sobre o número de folículos presentes nos ovários no momento da aspiração folicular e a qualidade dos oócitos recuperados. Cabras da raça Saanen, não lactantes, foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado e alimentadas com dietas que provessessem 0 (T1, n=5) e 2,4% (T2, n=5) de uréia na MS total da dieta, após período de adaptação a concentrações intermediárias de uréia. Os animais tiveram o ciclo estral previamente sincronizados e estimulados antes da aspiração folicular por laparotomia. Para sincronização, esponjas intravaginais contendo 60mg de acetato de medroxiprogesterona, foram usadas por 10 dias e 125 µg cloprostenol administrado antes da remoção da esponja. As esponjas foram removidas antes da aspiração folicular. Em adição, o desenvolvimento folicular foi estimulado com 70 mg de NIH-FSH-P1, i.m., e 300 UI de eCG 36 horas antes da aspiração folicular. O número de folículos em cada classe de diâmetro não foi influenciado pela concentração de uréia na dieta ( $P>0,05$ ), entretanto um maior número de oócitos parcialmente desnudos, desnudos e ou degenerados foi registrado para animais alimentados com uréia na dieta ( $P<0,05$ ).

**Palavras-chave:** cabras, folículos, laparotomia, oócitos, uréia

## **Ovarian follicle classification and morphological aspect of oocytes on gamete donors goats feed with urea in the diet**

**ABSTRACT:** The aim was to investigate the effects of urea addition to the diet on follicle number in the ovary at follicular aspiration time and the recovered oocyte quality. Saanen goats, non-lactating, was distributed in a entirely randomized design and fed with diets with 0 (T1, n=5) and 2.4% (T2, n=5) of urea in the total DM of the diet (n=5), after previous adaptation with intermediary urea concentration. The animals had been previously synchronized and stimulated before the follicle aspiration by laparotomy. For synchronization, intravaginal sponge was used with 60 mg of acetate medroxiprogesterona for 10 days and 125 µg cloprostenol 48 hours before the removal of the sponge. The sponge was removed immediately before the follicular aspiration. In addition, the follicular development was stimulated with 70 mg of NIH-FSH-P1, i.m., and 300 UI of eCG was given at 36 hours before the follicular aspiration. The follicles number in each diameter classification was not affected by urea concentration in the diet ( $P>0.05$ ), however a high number of partially denuded, denuded and or degenerated oocytes was found in the goats treated with urea in diet ( $P<0.05$ ).

**Key words:** goat, follicles, laparotomy, oocytes, urea

## INTRODUÇÃO

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da produção *in vitro* de embriões em animais domésticos e estes podem ser colhidos *in vitro* de ovários obtidos em abatedouros ou por ovariectomia, ou *in vivo* por aspiração de folículos utilizando-se métodos de laparotomia, laparoscopia ou via transvaginal guiada por ultra-som (ARMSTRONG et al., 1997).

A taxa de produção de embriões transferíveis *in vitro* pode ser influenciada pela variação dos oócitos selecionados para a maturação e ou condições de cultura as quais os oócitos estão sujeitos após a coleta (HAZELEGER et al., 1995).

A eficiência do sistema de produção de embriões *in vitro* é influenciada por diversos fatores, dentre os quais destacam-se, a qualidade das células do *cumulus* (CC) e dos oócitos. Habitualmente, as equipes que realizam estas técnicas empregam uma seleção visual dos complexos do *cumulus oophorus* (COCs). A qualidade morfológica avaliada é indicativa de competência do oócito para a produção de embriões *in vitro*.

Os folículos, juntamente com os seus COCs, são submetidos a várias alterações durante o ciclo estral e podem ativar diferentes mecanismos ligados a sobrevivência e a morte das CC. Atualmente, vem sendo estudado os efeitos nutricionais sobre a qualidade do oócito produzido e o reflexo sobre a produção de embriões *in vivo* ou *in vitro*.

Dietas com grande quantidade de uréia e que são capazes de gerar altas concentrações de amônia circulante aumentaram a segunda onda de dominância folicular, diminuíram a capacidade de oócitos inclusos em folículos pequenos e médios de clivarem quando fertilizados *in vitro*, e reduziram a habilidade dos embriões clivados advindos de oócitos obtidos de folículos de diâmetro médio a se desenvolverem em cultura ao estágio de blastocisto (SINCLAIR et al., 2000).

A maturação de oócitos pode ser prejudicada quando estes estão em meio com uréia, o que reflete na quantidade de oócitos que se tornam blastocistos. De WIT et al. (2001) observaram que a adição de 6 mM de uréia ao meio de maturação acelerou a metáfase I, inibiu a metáfase II, reduziu a

taxa de fertilização e diminuiu a proporção de oócitos que se tornaram blastocistos. Entretanto OCON e HANSEN (2003) não observaram redução no desenvolvimento de embriões clivados quando se usou 5 e 7,5 mM de uréia, e ainda na concentração de 10 mM não foram observados efeitos na maturação e nem na clivagem ou desenvolvimento subsequente. Por isso, possivelmente altas concentrações de uréia podem disparar algum mecanismo compensatório no oócito que aumenta a resistência a toxidez por uréia, como por exemplo a mudança no transporte de uréia pela membrana.

Objetivou-se verificar o efeito do fornecimento de uréia na dieta a cabras não-lactantes sobre a quantidade e a qualidade dos oócitos recuperados por aspiração folicular e sobre o número de folículos nos ovários avaliados por intervenção cirúrgica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado na Fazenda Água Limpa, município de Piau-MG, no período de Junho a Julho de 2006, durante a estação de acasalamento natural das cabras. Foram utilizadas cabras (n=10) da raça Saanen, não-gestantes, não-lactantes, nulíparas, primíparas e multíparas, com  $55,60 \pm 30,8$  meses,  $52,4 \pm 7,12$  kg e  $2,12 \pm 1,2$  ECC, divididas em dois tratamentos em função da concentração de uréia na MS da dieta.

Os animais foram manejados e alimentados em grupo conforme cada tratamento, e adaptados de forma gradual a dieta com 2,4% de uréia, sendo que semanalmente foram incluídos níveis intermediários de uréia na dieta (0, 1,0 e 2,4% UMS).

Dietas a base de feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* spp) e concentrado foram calculadas para serem isoenergéticas e isoprotéicas (1,4 Mcal/Kg MS e 14% PB/Kg MS) e conter 14 % da proteína total na forma de nitrogênio não protéico (NNP). As porcentagens de NNP advindas da uréia em relação a proteína total da dieta foram de 0%, 13%, 26% e 39,25% para as dietas com 0%, 1,0%, 2,0% e 2,4% respectivamente. Detalhes da composição da dieta são apresentados na Tabela 2.

A alimentação foi fornecida duas vezes por dia, as 7:30 e 16:30 hs na forma de mistura completa, sendo a quantidade ajustada diariamente para permitir 5% de sobras. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Tabela 2. Composição percentual dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (com base na MS)

Ingredientes	Tratamentos (% de uréia na MS da dieta)			
	0	1,0	2,0	2,4
Feno de capim Tifton	52	53	52	53
Fubá de milho	4	9	12	22,5
Farelo de soja	12	7	3	0
Farelo de trigo	27	27	27	18,2
Bicarbonato	1	1	1	1
Núcleo	1	1	1	1
Uréia	0	1	2	2,4
Calcáreo	3	3	3	2,3

Tabela 3. Análise bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (<sup>1</sup> % na MS)

	Ingredientes			
	Feno de Capim Tifton	Fubá de milho	Farelo de trigo	Farelo de soja
MS (%)	91,75	86,94	87,15	88,35
PB <sup>1</sup>	6,53	7,19	13,81	48,78
EE <sup>1</sup>	0,86	3,55	3,38	2,09
Lignina <sup>1</sup>	6,16	1,16	4,0	1,33
FDN <sup>1</sup>	70,28	20,54	37,81	12,55
FDA <sup>1</sup>	39,79	4,08	13,52	9,86
CHOT <sup>1</sup>	87,49	87,89	77,27	42,67
NDT <sup>1</sup>	55,62	87,24	72,43	81,54
CINZAS <sup>1</sup>	5,12	1,38	5,54	6,47
Ca <sup>1</sup>	0,42	0,03	0,22	0,34
P <sup>1</sup>	0,17	0,25	1,00	0,58

As cabras foram sincronizadas com esponja intravaginal contendo 60 mg de acetato medroxiprogesterona (Progespon® – Sintex) por 11 dias e 125 µg de cloprostenol (Ciosin® – Coopers), i.m., 48 horas antes da remoção da esponja. A esponja foi removida imediatamente antes do procedimento de aspiração folicular. Em adição, o desenvolvimento folicular foi estimulado com 70 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V® – Vetrepharm) e 300 UI de eCG (Novormon® – Sintex), via i.m., administrados 36 horas antes da aspiração folicular (BALDASSARE et al., 2003). Detalhes dos dias e dos hormônios administrados podem ser visualizados na figura 1.

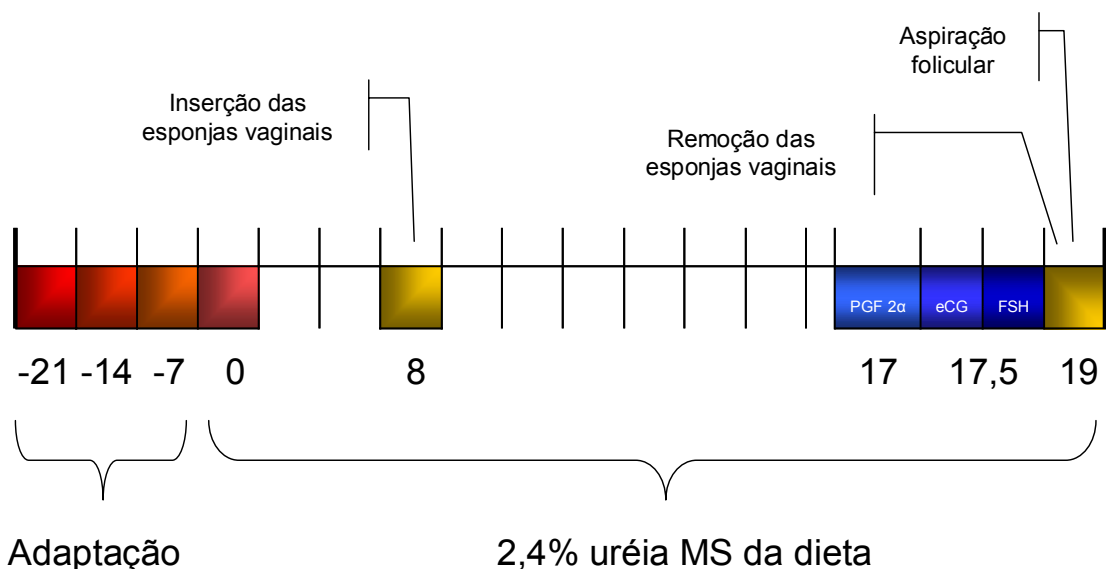


Figura 1. Esquema da sincronização e estimulação ovariana para aspiração folicular.

Após jejum hídrico e alimentar de 24 h, os animais receberam, como medicação pré-anestésica, realizada 10 minutos antes do início dos procedimentos, 1 mL/100kg/i.m. de acepromazina a 1%<sup>1</sup> (Acepran - Univet S.A.) e, em seguida procedeu-se a aplicação de lidocaína 2% sem vaso constritor (Lidovet), 2 mL/animal, epidural. Foram administrados Flunixin-Meglumime (Banamine), 1,1 mg/kg p.v., antes do início da intervenção cirúrgica. Em seguida a fêmea foi colocada em maca cirúrgica apropriada, e posicionada em *Trendelenburg*, contida nas patas dianteiras e traseiras. No

campo cirúrgico, região do abdome cranial ao úbere, foi feita a tricotomia e anti-sepsia com tintura de iodo, e em seguida, a anestesia local infiltrativa com 20mL de cloridrato de lidocaína 2% com vaso constritor (Anestésico Bravet). Na região periférica da linha alba, foi feita uma incisão de 15cm até a abertura do peritônio, por onde se realizou a laparotomia exploratória de ovário, para aspiração folicular.

Inicialmente à exposição ovariana, e antes da aspiração, todos os folículos foram contados e estimados. Os dois maiores folículos presentes em cada ovário, tiveram seu fluido folicular aspirado, para determinação de hormônios e metabólitos. Antes do início das aspirações os ovários foram examinados e o número de folículos visíveis na superfície ovariana de cada um foi registrado. As aspirações foram realizadas por um único assistente, os ovários foram imobilizados com gaze estéril para facilitar a manipulação durante as seções. Os folículos foram aspirados com seringa hipodérmica de 5 mL sem látex de borracha e agulha hipodérmica de 22G1<sup>2</sup> (BD Juiz de Fora) (Figura 2a). O conteúdo das seringas foi disposto em tubos plásticos estéreis de 15 mL<sup>5</sup> (BD – Juiz de Fora) (Figura 2b), contendo solução de 40 mL de DPBS (Nutricel<sup>®</sup>)<sup>29</sup> acrescidos de 100µL de heparina (Liquemine<sup>®</sup>)<sup>30</sup> e 500 µL de soro fetal bovino (SFB), até a sua classificação (Figura 2b). O transporte até o laboratório foi realizado em câmara mantida à temperatura de 39 °C (Figura 2b).

---

<sup>29</sup> Nutrientes Celulares, SP, Brasil.

<sup>30</sup> Roche, SP, Brasil.

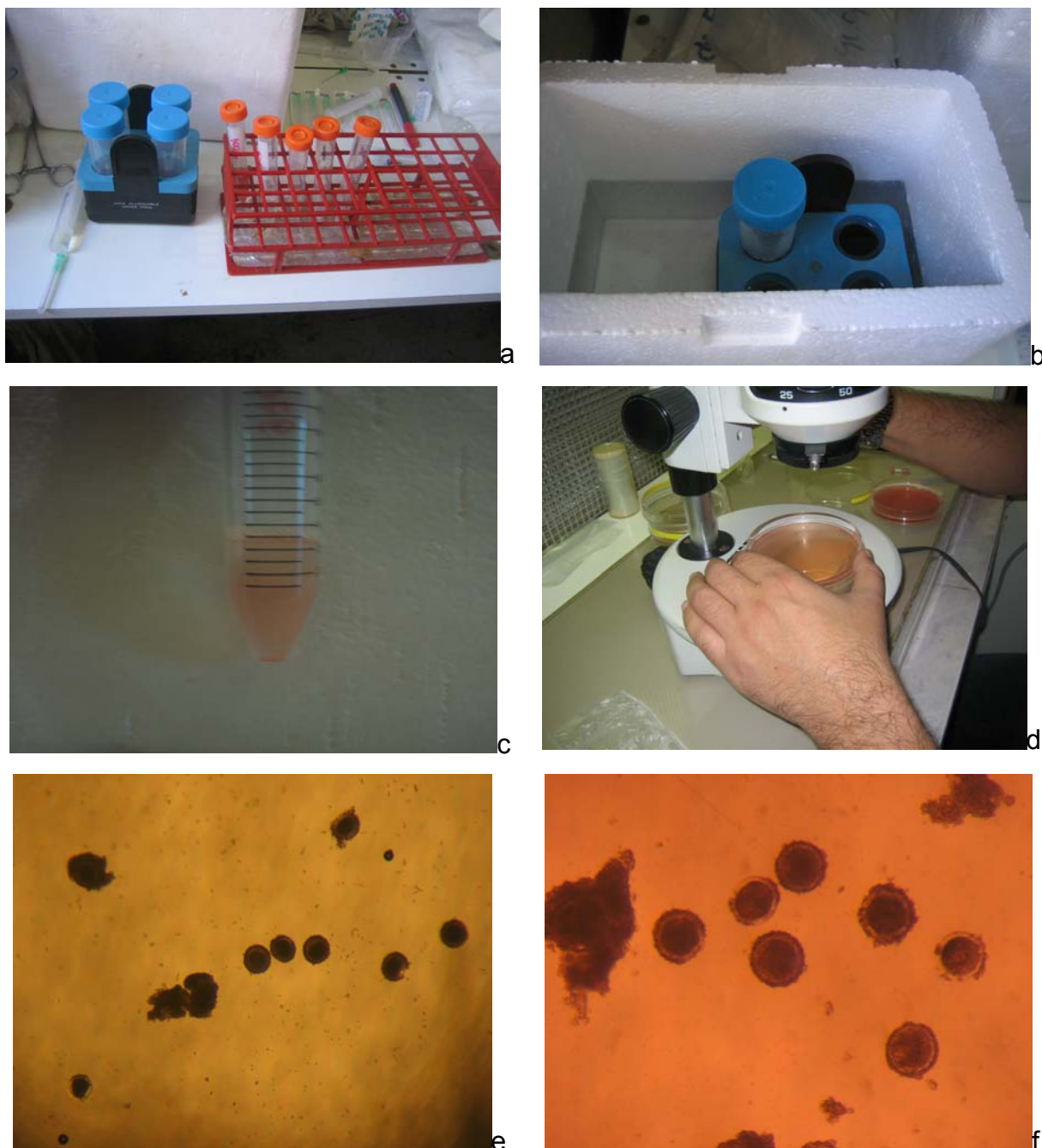


Figura 2. Etapas da coleta dos oócitos.

Ao final das laparotomias os ovários foram umedecidos com heparina (Trombofob<sup>®</sup>)<sup>31</sup>, e administrado nas fêmeas cloridrato de oxitetraciclina, (Terramicina LA), 1 mL/10 kg p.v., i.m..

No laboratório de reprodução animal da Embrapa Gado de Leite, distante 20 minutos do local das punções, o conteúdo dos tubos com os oócitos

<sup>31</sup> Knoll Produtos Químicos e Farmaceuticos. Ltda.

(Figura 2c) foi cuidadosamente lavado em um filtro de coleta de embriões com malha de 80 $\mu$  (Milipore<sup>®</sup>). Os complexos *cúmulos*-oócitos foram transferidos para placas Petri e levado à observação em estereomicroscópio (Olympus<sup>®</sup>) (Figura 2d) em aumento de 50x para classificação conforme (COSTA, 1994), Quadro 1, com algumas modificações. Foram utilizados como critérios de avaliação a presença de células, o número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus*, e o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade (Figura 2e e 2f).

Quadro 1. Critérios para a classificação morfológica dos complexos *cúmulos*-oócitos recuperados

Categoria	Descrição
Grau I	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos compactos apresentando mais de três camadas de células do complexo <i>cumulus</i> , oócito com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Grau II	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos compactos apresentando menos de três camadas de células do <i>cumulus</i> , oócito com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Parcialmente desnudos	Oócitos apresentando áreas inferiores a um terço de sua superfície sem células da granulosa.
Desnudos e/ou degenerados	Oócitos apresentando a maior parte ou a totalidade de sua superfície sem células da granulosa e/ou apresentando sinais evidentes de degeneração, como vacuolização intensa ou desintegração do citoplasma.
Expandidos	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos apresentando expansão das células do <i>cumulus</i> -oócito, com aumento do volume total e aspecto gelatinoso
Zona pelúcida	Zona pelúcida rompida, sem o conteúdo citoplasmático.

Fonte: COSTA (1994).

Para cada categoria descrita no Quadro 1, a coloração do citoplasma foi classificada em A e B, sendo A aqueles que apresentaram citoplasma escuro e homogêneo, e B aqueles que apresentaram pequenas alterações de coloração, desuniforme e presença de vacúolos (VIANA, comunicado pessoal).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa SAEG 8.0 (UFV, 1997). Foi realizada a análise de variância e utilizado o teste SNK para comparação de médias entre os tratamentos, com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de folículos e a sua divisão em cada categoria conforme seu diâmetro no momento da aspiração folicular está ilustrado na Tabela 3.

Nenhum desses parâmetros avaliadas foi influenciada pela alimentação com 0 ou 2,4% de UMS ( $P>0,05$ ). Embora se tenha observado maior número de todas no tratamento com 2,4% de UMS.

Tabela 3. Número ( $n^{\circ}$ ) médio de folículos visualizados em cada categoria de diâmetro de cabras alimentadas ou não com 2,4% de UMS

Parâmetros	Concentração de uréia na dieta (%MS)	
	0	2,4
$n^{\circ}$ de folículos visualizados	10,2 $\pm$ 2,8	14,2 $\pm$ 4,5
diâmetro do maior folículo	0,62 $\pm$ 0,13	0,67 $\pm$ 0,22
$n^{\circ}$ de folículos $\geq$ 9 mm	0,40 $\pm$ 0,54	0,75 $\pm$ 0,95
$n^{\circ}$ de folículos com 6-8 mm de diâmetro	0,60 $\pm$ 0,89	1,00 $\pm$ 1,15
$n^{\circ}$ de folículos com diâmetro $\leq$ 5 mm	9,2 $\pm$ 3,0	12,5 $\pm$ 4,4

GARCIA-BOJALI et al. (1994), não observaram diferenças no desenvolvimento folicular de vacas alimentadas com alto teor de proteína bruta na dieta, apesar da diferença significativa entre os teores de n-uréia no plasma dos animais alimentados com alta ou baixa proteína bruta. LAVEN et al. (2004) não observaram diferenças no tocante ao desenvolvimento folicular em vacas alimentadas com 250 g de uréia/dia. Da mesma forma, ALVES (2005) não

verificou diferenças no desenvolvimento folicular de cabras alimentadas com concentrações de uréia semelhantes a testada neste estudo. DAWUDA et al. (2004) também não observaram efeito de dietas com diferentes degradabilidades ruminais de proteína suplementadas com 250 g de uréia/dia, sobre o número de folículos presentes nos ovários em diferentes momentos da sincronização e antes da inseminação artificial, e do diâmetro do folículo ovulatório. SINCLAIR et al. (2000) não observaram diferenças no número de folículos de diâmetro pequeno e médio entre dietas que proovessem alta ou baixa concentração de amônia plasmática, entretanto observou-se maior diâmetro do maior folículo dos animais alimentados com dietas que elevou as concentrações de amônia plasmática em relação àquelas que elevaram baixas concentrações.

A cabra possui uma população folicular estimada ao nascimento de aproximadamente 37.000 por ovário (BEZERRA et al., 1998) e um padrão predominantemente de quatro ondas de crescimento folicular com ovulação na quarta onda (GINTHER & KOT, 1994). Todavia durante a vida útil de uma fêmea altamente produtiva, menos de 0,05% dos oócitos irão se desenvolver até gerar um descendente vivo (KEISLER, 1999). Isto significa que este animal através de técnicas para a máxima obtenção de oócitos e de embriões, pode produzir um número muito maior de descendentes, durante a sua vida reprodutiva, do que de forma natural. Sendo assim, a utilização da aspiração folicular de fêmeas alimentadas com uréia associada com as técnicas de produção *in vitro* de embriões pode ser uma alternativa para se diminuir os custos de produção de embriões considerando o aspecto nutricional das fêmeas doadoras de oócitos.

A resposta ovariana encontrada neste estudo associado ao tratamento de estimulação e a alimentação com uréia, ainda não foram descritas em caprinos efetivamente. Sabe-se que as respostas foliculares de ovários são dependentes de vários fatores, dentre eles a idade da doadora (ARMSTRONG et al., 1994). Oócitos obtidos por laparoscopia destes folículos são capazes, após serem submetidos a FIV, de se desenvolverem-se em cultivo, até o estágio de blastocisto, entretanto o tratamento das doadoras com uréia pode acarretar em prejuízos ao desenvolvimento normal destes.

A qualidade e a proporção de cada classe de oócito recuperado são expressas na tabela 4.

A maioria dos parâmetros de qualidade dos oócitos recuperados não foi influenciada pela concentração de uréia na dieta ( $P>0,05$ ) com exceção dos oócitos da classe parcialmente desnudo e desnudos e ou degenerados ( $P<0,05$ ) que foi recuperado em maior quantidade dos animais tratados com 2,4% de UMS. A qualidade dos oócitos recuperados de animais alimentados com dietas que promovam aumento nas concentrações circulantes de amônia ou uréia, ou o consumo excessivo de PB, ou ainda da suplementação direta de uréia na dieta, há muito tempo tem sido postulado como sendo prejudicial ao desenvolvimento e qualidade dos embriões gerados. E, se tem afirmado que estes efeitos poderiam ser manifestados antes da fertilização, como a ovulação de oócitos de má qualidade que não gerariam um embrião sadio após a fertilização.

Tabela 4. Classificação de oócitos quanto ao número ( $n^{\circ}$ ) e percentagem (%) de cabras alimentadas ou não com 2,4% de UMS

Classificação dos oócitos	Concentração de uréia na dieta (%MS)			
	0		2,4	
	$n^{\circ}$	%	$n^{\circ}$	%
A Grau I	6	11,7 <sup>a</sup>	2	3,2 <sup>a</sup>
A Grau II	21	41,2 <sup>a</sup>	20	31,7 <sup>a</sup>
B Grau I	2	3,9 <sup>a</sup>	4	6,3 <sup>a</sup>
B Grau II	7	13,7 <sup>a</sup>	7	11,1 <sup>a</sup>
Parcialmente desnudos	8	15,7 <sup>b</sup>	15	23,8 <sup>a</sup>
Desnudos e ou degenerados	7	13,7 <sup>b</sup>	14	22,2 <sup>a</sup>
Expandidos e zona pelúcida	0	0 <sup>a</sup>	1	1,6 <sup>a</sup>
Total	51	100	63	100

Percentagens seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $P<0,05$ ).

Embora não tenha apresentado diferença estatística o número de oócitos viáveis Grau I foi menor numérica e percentualmente nas cabras

alimentadas com 2,4% de UMS em relação às que não consumiram uréia. (Tabela 4).

Na Tabela 5, podem ser observadas as médias dentro de cada classe de qualidade.

Tabela 5. Média e desvio padrão (Média  $\pm$  sd) dos oócitos obtidos e percentagem (%) em cada classe de cabras alimentadas ou não com 2,4% de UMS

Classificação dos oócitos	Concentração de uréia na dieta (%MS)			
	0		2,4	
	Média $\pm$ sd	%	Média $\pm$ sd	%
A Grau I	1,20 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	11,7	0,50 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	3,2
A Grau II	4,20 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>	41,2	3,50 $\pm$ 3,10 <sup>a</sup>	31,7
B Grau I	0,40 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	3,9	0,25 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	6,3
B Grau II	1,40 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	13,7	1,75 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	11,1
Parcialmente desnudos	1,60 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	15,7	3,00 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	23,8
Desnudos e ou degenerados	1,40 $\pm$ 0,89 <sup>b</sup>	13,7	2,80 $\pm$ 3,42 <sup>a</sup>	22,2
Expandidos e zona pelúcida	0	1	1,00 $\pm$ 0,45	1,6

Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Testando a competência de complexos *cumulus oócito* de novilhas submetidas à dieta com alta ou moderada PB, SINCLAIR et al. (2000) obtiveram CCO de folículos médios com menor competência a atingirem o estágio de blastocisto que CCO provenientes de folículos maiores de doadoras com alto teor de amônia plasmática. Da mesma maneira, FERREIRA (2007) não observou diferenças na qualidade de oócitos puncionados de novilhas alimentadas com 7,5g de uréia por dia fornecidos 5 dias antes da aspiração folicular. Entretanto, os oócitos gerados do tratamento com uréia do estudo anterior tiveram menor proporção de eclosão de blastocistos totais quando cultivados *in vitro* por 11 dias em relação àqueles oriundos de doadoras não alimentadas com uréia na dieta.

Cabras sem raça definida submetidas ao mesmo protocolo de superestimulação utilizado neste estudo e aspiradas semanalmente apresentaram 94,87 e 86,7 % de oócitos viáveis, respectivamente para animais adultos (n=10) e pré-púberes (n=10) na primeira aspiração por laparoscopia (CORDEIRO 2006), sendo incluído nesta categoria oócitos de grau I, II e III, representados respectivamente por, CCO completo, mais de duas camadas de células do *cumulus* e uma camada de células do *cumulus* (conforme classificação derivada de LEIBRIFRIED & FIRST, (1979)). A média de oócitos viáveis oriundos de cabras alimentadas com 0% de UMS registrado no presente estudo é próxima aos valores anteriormente relatados. Entretanto o número de oócitos viáveis de cabras alimentadas com 2,4% de UMS não são tão próximo.

O estudo ultra-estrutural destes oócitos e das células foliculares podem revelar informações importantes, pois poderão esclarecer com mais detalhes quais os efeitos impressos aos oócitos, células. E ainda, o cultivo desses oócitos poderia fornecer com maior precisão se a uréia adicionada a dieta causasse um efeito sobre a capacidade de viabilidade deste, avaliada pela real capacidade de maturação, clivagem fertilização e desenvolvimento embrionário.

## CONCLUSÃO

A alimentação com uréia não influencia a população folicular em animais estimulados, entretanto um maior número de oócitos parcialmente desnudos, desnudos e ou degenerados aumenta quando recuperados em cabras da raça Saanen.

### **AGRADECIMENTOS**

CNPq, Embrapa Gado de Leite

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALVES, N.G. *Efeito de uréia na dieta sobre características reprodutivas e concentração de progesterona e metabólicos em cabras da raça Alpina*. 2005. 150f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryo in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reproduction Fertility and Development*, v.55, p.1303-1322. 2001.
- BALDASSARE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N., *et al.* Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v. 59, p. 831-839, 2003.
- CORDEIRO, M.F. *Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal*. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006. 58p. (Tese – Doutorado em Cirurgia Veterinária).
- COSTA, E.P. *Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos in vitro*. Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1994. 155p. (Tese - Doutorado em Ciência Animal).
- DAWUDA, P.M.; SCARAMUZZI, R.J.; DREW, S.B.; *et al.* The effect of diet containing excess quickly degradable nitrogen (QDN) on reproductive and hormonal profiles of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.81, p.194-208, 2004.
- DeWIT, A.A.; CESAR, M.L.; KRUIP, T.A. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. *Journal of Dairy Science*, v.8, p.1800-1804, 2001.
- FERREIRA, F.A. *Alimentação de novilhas com uréia por curto prazo afeta a qualidade do complexo cumulus oócito e o desenvolvimento de embriões In vitro*. 2007. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

- GARCIA-BOJALIL, C.M.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; *et al.* Protein intake and development of ovarian follicles and embryo of superovulated nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2537-2548, 1994.
- HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STUBBINGS, R.B.; *et al.* Relations of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, v.43, p.509-522, 1995.
- LAVEN, R.A.; DAWUDA, P.M.; SCARAMUZZI, R.J.; *et al.* The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.84, p.41-52, 2004.
- LEIBRIFIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, v.48, p.76-86, 1979.
- OCON, O.M.; HANSEN, P.J. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1194-1200, 2003.
- SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; *et al.* 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, p.2670-2680, 2000.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 1997. 149p.

## CONCLUSÕES GERAIS

O fornecimento de 2,4% de uréia na matéria seca da dieta para cabras leiteiras das raças Toggenburg e Saanen foram relacionados:

- A recuperação de embriões em estágio avançado de desenvolvimento, a diminuição no número de folículos com 5 mm de diâmetro antes da coleta de embriões,
- As alterações nas concentrações hormonais relacionadas à esteroideogênese e aos metabólitos do fluido folicular,
- A elevação das concentrações de glicose e de uréia no plasma,
- A recuperação de oócitos desnudos, parcialmente desnudos e ou degenerados.