

## Nutrição e reprodução em vacas leiteiras

*Nutrition and reproduction in dairy cows*

**Nadja Gomes Alves<sup>1</sup>, Marcos Neves Pereira<sup>1</sup>, Rodrigo Michelini Coelho<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup>Zootecnista

E-mail: [nadja@ufla.br](mailto:nadja@ufla.br)

### Resumo

O período de transição é caracterizado por adaptações no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas, visando suprir a demanda por nutrientes da lactação. O balanço energético negativo se inicia poucos dias antes do parto e se agrava no pós-parto. Este é associado à atenuação da frequência dos pulsos de LH, redução na concentração sanguínea de glicose, insulina e IGF-1, e aumento na concentração de ácidos graxos não esterificados e  $\beta$ -hidroxibutirato. O déficit energético pode reduzir a produção de estrógeno pelo folículo dominante, aumentar o intervalo do parto à primeira ovulação, e reduzir a concentração de progesterona no sangue e a qualidade de ovócitos e embriões. O fornecimento de dietas ricas em proteína é freqüentemente associado ao aumento da concentração de nitrogênio uréico no plasma, alterações no ambiente uterino e redução da viabilidade embrionária. O balanço energético negativo e o consumo de dietas ricas em proteína podem estar envolvidos no decréscimo da fertilidade em vacas leiteiras de alta produção.

**Palavras-chave:** período de transição, balanço energético, consumo de proteína, fertilidade

### Abstract

*The transition period is characterized by changes in lipid, carbohydrate, and protein metabolism, to meet the nutrient demand of lactation. The negative energy balance starts a few days before calving and is aggravated postpartum. It is associated to attenuation of LH pulse frequency, to reduced blood concentrations of glucose, insulin, and IGF-1 and increased concentrations of non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate. Energy deficiency may reduce estrogen production by the dominant follicle, increase the interval from calving to first ovulation, and reduce blood progesterone concentration and oocytes and embryo quality. The supply of protein rich diets is often associated with increased plasma urea nitrogen content, changes in uterine environment and reduced embryo viability. The negative energy balance and the intake of protein rich diets may be involved in the decreased fertility of high-yielding dairy cows.*

**Keywords:** transition period, energy balance, protein intake, fertility

### Introdução

O aumentado potencial genético para produção de leite, juntamente com as mudanças no manejo nutricional, tem sido associado ao aumento da produção de leite/vaca e à redução da fertilidade de vacas leiteiras (Butler, 1998, Washburn *et al.*, 2002). A demanda metabólica associada à alta produção de leite resulta em balanço energético negativo (BEN), caracterizado por redução na concentração sanguínea de glicose, insulina, IGF-1, aumento de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma e acúmulo de triglicerídeos no fígado (Bell, 1995, Drackley, 1999, Drackley *et al.*, 2001). O BEN e as alterações metabólicas associadas relacionam-se à fertilidade de vacas leiteiras, por meio de sua influência no desenvolvimento folicular e no momento da primeira ovulação pós-parto (Butler, 2001), na concentração sanguínea de progesterona (Britt, 1991), na qualidade de ovócitos (Britt, 1991, Leroy *et al.*, 2008a) e embriões (Leroy *et al.*, 2005a).

Em adição aos efeitos do BEN, o fornecimento de dietas ricas em proteína a vacas leiteiras tem sido associado à elevação da concentração de nitrogênio uréico no plasma (NUP) e redução da taxa de concepção (Ferguson *et al.*, 1993, Butler *et al.*, 1996). Elevação da concentração de amônia e uréia no ambiente uterino (Hammon, 2005), redução do pH uterino (Elrod *et al.*, 1993, Elrod e Butler, 1993) e da qualidade embrionária (Dawuda *et al.*, 2002, Rhoads, 2006, Alves, 2007) foram descritas em vacas com alta concentração de NUP.

Esta revisão tem o objetivo de abordar as informações recentes sobre os efeitos do BEN e do excesso de proteína na dieta, sobre a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção.

### Metabolismo do período de transição

No final da gestação e no início da lactação, diversas alterações são observadas no metabolismo das vacas leiteiras. Este período é denominado de período de transição, sendo definido como a fase entre as três semanas que antecedem o parto e as três primeiras semanas de lactação (Drackley, 1999). O período de transição é caracterizado por alterações no metabolismo do fígado, do tecido adiposo, do músculo esquelético e na secreção e ação de muitos hormônios envolvidos no parto, na lactogênese e na manutenção da lactação (Head e Gulay, 2001).

Os últimos dias de gestação coincidem com formação do colostro, aumento da demanda da glândula mamária por glicose, aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas. A necessidade de ajustes metabólicos durante a lactogênese pode ser enfatizada comparando-se as exigências de glicose, aminoácidos e ácidos graxos da glândula mamária pós-parto com as exigências destes nutrientes pelo útero gravídico, aos 250 dias de gestação (Bell, 1995). Estes autores estimaram que a absorção de glicose, aminoácidos e ácidos graxos pelo útero gravídico, aos 250 dias de gestação, de uma vaca Holandesa não lactante, com peso vivo de 650 kg foi de 666, 718 e 270 g/dia, respectivamente. A absorção de glicose, aminoácidos e ácidos graxos pela glândula mamária de vacas Holandesas produzindo 29,6±0,8 kg de leite/dia com 46,7±1,9 g/kg de gordura e 42,3±1,6 g/kg de proteína, no 4º dia pós-parto, foi de 1.775; 1.374 e 1.224 g/dia, respectivamente. A exigência mamária por estes nutrientes, nestas condições, foi de 2,7; 2,0 e 4,5 vezes maior, respectivamente, do que aquelas do útero no final da gestação e a exigência de energia pela glândula mamária foi três vezes maior do que a do útero.

Os ajustes metabólicos observados no período de transição envolvem, principalmente, o tecido adiposo, o fígado e o músculo esquelético. No tecido adiposo, observa-se grande mobilização de triglicerídeos. A taxa de lipólise é maior que a de lipogênese, disponibilizando AGNE que serão utilizados pela glândula mamária, fígado e outros órgãos. Intensa mobilização lipídica leva a aumentada captação de AGNE pelo fígado. No fígado, os AGNE podem ser completamente oxidados para produção de energia, incompletamente oxidados a corpos cetônicos, esterificados com o glicerol e armazenados como triglicerídeos (TG) ou exportados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). No entanto, o fígado dos ruminantes possui capacidade limitada para exportar VLDL, o que associado à intensa mobilização lipídica, pode levar ao acúmulo de TG neste órgão (Drackley, 1999). A baixa taxa de síntese e secreção hepática de VLDL pode estar relacionada à baixa concentração de apolipoproteína (Apo B) no sangue e fígado dos ruminantes (Drackley *et al.*, 2001). A diferença entre a absorção de AGNE e o gasto de ATP pelo fígado pode ser importante no desenvolvimento de lipídose hepática (Vazquez-Anón *et al.*, 1994). Considerando que a absorção de AGNE pelo fígado é de 140mmol/hora ou 928g/dia e que a oxidação de AGNE para suprir a demanda de energia deste órgão é de 60,8 mmol/hora, Drackley *et al.* (2001) estimaram que 70,2 mmol/hora ou 525 gramas de AGNE/dia estariam disponíveis para esterificação no fígado de vacas leiteiras periparturientes com concentração sanguínea de AGNE de 1000 µM.

A conversão de AGNE a corpos cetônicos pode ser considerada uma estratégia para poupar glicose em momentos de déficit. Assim, aumentada cetogênese durante o período de transição pode ajudar a compensar o consumo insuficiente de precursores de glicose (Drackley *et al.*, 2001). Segundo Wathes *et al.* (2007), aproximadamente 50% das vacas leiteiras desenvolvem cetose subclínica no primeiro mês de lactação. Lipidose hepática e cetose estão relacionadas à ocorrência de outras desordens de saúde, redução no consumo de matéria seca, perda de peso corporal, redução na produção de leite concomitante ao período de ocorrência da doença e ao longo de toda a lactação, além de produzir reflexos negativos no desempenho reprodutivo (Wallace *et al.*, 1998). Jorritsma *et al.* (2000) relataram que o acúmulo hepático de triglicerídeos foi associado ao maior intervalo do parto à primeira ovulação e à redução da fertilidade em vacas leiteiras.

Com relação ao metabolismo de carboidratos e proteínas, no período pós-parto inicial observa-se aumento da gliconeogênese hepática a partir de propionato, aminoácidos, glicerol e lactato, visando atender a exigência de glicose da glândula mamária (Drackley *et al.*, 2001). A utilização de glicose pelos tecidos periféricos é reduzida e a utilização de AGNE e corpos cetônicos como fonte de energia por estes tecidos aumenta (Bauman e Currie, 1980). Nas duas primeiras semanas após o parto também se observa aumento da mobilização das reservas corporais de proteína, principalmente do músculo esquelético, disponibilizando aminoácidos que serão utilizados na gliconeogênese hepática (Bell, 1995).

A insulina é um importante fator na adaptação do metabolismo de vacas leiteiras durante o período de transição. A concentração plasmática de insulina declina durante o período seco e permanece baixa durante as primeiras semanas do pós-parto (Moorby *et al.*, 2000). A baixa concentração de insulina após o parto associada à resistência a este hormônio nos tecidos adiposo e muscular inibe a captação e a utilização de glicose por estes tecidos (Bell, 1995).

O IGF-1 é secretado pelo fígado em resposta ao hormônio de crescimento (GH) e exerce *feedback* negativo sobre a secreção de GH pela hipófise. Durante o BEN, a relação entre estes hormônios é alterada devido à redução na expressão de receptores de GH no fígado (Lucy *et al.* 2001). Como consequência, a concentração sanguínea de IGF-1 é diminuída e a de GH elevada, o que juntamente com a baixa concentração sanguínea de insulina, promove a lipólise no tecido adiposo e a gliconeogênese hepática (Wathes *et al.*, 2007).

### Balço energético negativo e reprodução

O BEN começa poucos dias antes do parto e se agrava no pós-parto, alcançando o ponto mais negativo (*nadir*) cerca de duas semanas após o parto (Bell, 1995). A intensidade do BEN durante as primeiras três semanas de lactação e o *nadir* do BEN são altamente correlacionados com o intervalo à primeira ovulação (Butler, 2001). O desenvolvimento de uma onda folicular ocorre entre cinco e sete dias após o parto, independente do BEN. Assim, o início de uma onda folicular e a formação de um folículo dominante durante o BEN não parecem limitar a primeira ovulação (Butler, 2003). Contudo, Beam e Butler (1997) relataram três possíveis destinos do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto: 1) ovulação, que ocorrerá entre 16 e 20 dias pós-parto; 2) falha de ovulação, seguida por surgimento de uma nova onda folicular e 3) falha de ovulação, seguida pelo desenvolvimento de um cisto folicular. O desenvolvimento de um folículo dominante não-ovulatório ou de folículos císticos prolonga o intervalo do parto à primeira ovulação para 40 a 50 dias pós-parto.

A ovulação do folículo dominante no início da lactação é dependente do restabelecimento da secreção pulsátil de hormônio luteinizante (LH). Beam e Butler (1999) relataram que a frequência de pulsos de LH foi significativamente menor durante a primeira onda folicular pós-parto em vacas que desenvolveram um folículo dominante não ovulatório, comparadas àquelas em que o folículo dominante se desenvolveu até a ovulação. Baixa disponibilidade de energia durante o BEN não somente suprime a secreção pulsátil de LH, mas também reduz a responsividade ovariana ao LH (Butler, 2001), impedindo a ocorrência de ovulação.

A habilidade dos folículos de produzirem estradiol suficiente para desencadear a onda pré-ovulatória de LH e a ovulação parece depender da disponibilidade de insulina e de IGF-1 circulantes (Butler, 2003), que se encontram em baixa concentração em vacas em BEN. A concentração de IGF-1 no fluido folicular reflete a sua concentração sistêmica. O IGF-1, juntamente com a insulina, estimula a proliferação das células foliculares e a esteroidogênese (Wathes *et al.*, 2007). Pesquisando a relação entre o destino do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto, o balanço energético, o consumo de MS e o perfil metabólico de vacas leiteiras de alta produção, Butler *et al.* (2006) verificaram que as vacas que ovularam o primeiro folículo dominante pós-parto apresentaram balanço energético mais positivo na primeira semana pré-parto, balanço energético menos negativo nos primeiros 30 dias pós-parto, maior consumo de matéria seca, maior concentração de estradiol, insulina e IGF-1 e menor concentração de AGNE no plasma.

Marr *et al.* (2002) relataram que as concentrações plasmáticas de AGNE e de  $\beta$ -hidroxibutirato e o acúmulo de triglicerídeos no fígado foram maiores nas vacas em que o primeiro folículo dominante pós-parto não ovulou, em comparação àquelas que apresentaram folículos ovulatórios. Os autores sugeriram que altas concentrações de AGNE e de  $\beta$ -hidroxibutirato no sangue podem inibir a produção folicular de estradiol e a ovulação e que, possivelmente, estes compostos agem no hipotálamo, diminuindo a frequência dos pulsos de LH e nos ovários, diminuindo a sensibilidade folicular à insulina e ao IGF-1. Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de AGNE (palmítico, esteárico e oléico) ao meio de cultivo inibiu a proliferação das células da teca (Vanholder *et al.*, 2006b) e da granulosa (Vanholder *et al.*, 2005), reduziu a viabilidade das células da teca e a produção de progesterona pelas mesmas (Vanholder *et al.*, 2006b) e aumentou o número de células foliculares apoptóticas e necróticas (Vanholder *et al.*, 2005, Vanholder *et al.*, 2006b). Vanholder *et al.* (2006a) verificaram que a adição de  $\beta$ -hidroxibutirato ao meio de cultivo reduziu a produção de estradiol pelas células da granulosa. Os resultados destes trabalhos sugerem que os AGNE podem ser mediadores pelos quais o BEN compromete a função ovariana pós-parto em vacas leiteiras de alta produção.

A perda de ECC no início da lactação tem sido relacionada à redução da fertilidade em vacas cíclicas. Britt (1991) relatou que as vacas holandesas que perderam 0,58 pontos de ECC nas cinco primeiras semanas pós-parto tiveram menor taxa de concepção ao primeiro serviço (25%), se comparadas àquelas que ganharam 0,06 pontos de ECC no mesmo período (62%). Os mecanismos que relacionam a perda de ECC pós-parto à menor taxa de concepção provavelmente envolvem o momento da 1ª ovulação pós-parto (Butler, 2003). Existe associação positiva entre o reinício dos ciclos ovulatórios após o parto e o aumento da taxa de concepção. Ou seja, a ocorrência de maior número de ciclos estrais antes da inseminação artificial (IA) favorece a taxa de concepção. Vacas que permaneceram anovulatórias por mais de 50 dias após o parto apresentaram menor probabilidade de tornarem-se gestantes durante a lactação e maior risco de serem descartadas (Frajblat, 2000 citado por Butler, 2003).

O BEN no início da lactação pode influenciar negativamente os ovócitos que estão se desenvolvendo neste período. A foliculogênese leva em torno de 60 a 80 dias e os folículos que iniciam o seu desenvolvimento durante o BEN são adversamente afetados e liberam ovócitos de pior qualidade (Britt, 1991). De acordo com este modelo, o primeiro e o segundo folículos ovulatórios começam seu desenvolvimento no período seco, quando as condições metabólicas são favoráveis. Ao contrário, o terceiro, o quarto e o quinto folículos ovulatórios se desenvolvem durante o início da lactação, quando o BEN é mais intenso e, conseqüentemente, podem estar sujeitos às condições metabólicas adversas do pós-parto.

A competência de desenvolvimento do ovócito é intimamente relacionada à fase de crescimento e à saúde do folículo (Suton *et al.*, 2003, citado por Leroy *et al.*, 2008a). As mudanças endócrinas e metabólicas

observadas no início da lactação, em virtude do BEN, são acompanhadas por alteração na composição do fluido folicular, que podem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos, visto que estes são altamente sujeitos a qualquer distúrbio no seu microambiente (Leroy *et al.*, 2008a). Em vacas leiteiras de alta produção, que perderam  $0,94 \pm 0,09$  unidades de ECC nos primeiros 46 dias de lactação, Leroy *et al.* (2004) relataram correlações altas (entre 0,73 e 1,00) e significativas das concentrações de glicose,  $\beta$ -hidroxibutirato e uréia no soro e fluido folicular. Contudo, evidências científicas que comprovem os efeitos do BEN e das adaptações metabólicas associadas sobre a competência de desenvolvimento de ovócitos em vacas leiteiras de alta produção são escassas. Na sua maioria, os estudos que objetivaram pesquisar esta relação foram de curta duração e conduzidos *in vitro*.

Leroy *et al.* (2005b) observaram que a adição de ácido palmítico e esteárico, em concentrações observadas no fluido folicular de vacas leiteiras em BEN, ao meio de maturação, retardou este processo, como demonstrado pelo maior número de ovócitos em meiose I e menor número em meiose II, reduziu as taxas de fertilização e de clivagem e a produção de blastocistos e aumentou a proporção de células apoptóticas no complexo *cummulus oophorus*. Em estudo posterior, ovócitos bovinos maturados em meio contendo concentrações de glicose e de  $\beta$ -hidroxibutirato similares às observadas no fluido folicular de vacas com cetose clínica apresentaram reduzida competência de desenvolvimento, como demonstrado pelas menores taxas de clivagem e de produção de blastocistos (Leroy *et al.*, 2006). A glicose é uma molécula indispensável para a síntese de DNA durante a maturação do ovócito (Sutton *et al.*, 2003, citado por Leroy *et al.* 2008a) e a hipoglicemia observada em vacas com cetose clínica pode comprometer a capacidade de desenvolvimento do ovócito (Leroy *et al.*, 2006).

Em adição aos possíveis efeitos sobre a qualidade de ovócitos, as adaptações do metabolismo de vacas leiteiras de alta produção foram associadas a alterações no desenvolvimento e na qualidade embrionária (Leroy *et al.*, 2005a). Estes autores observaram que a resposta superovulatória não diferiu entre vacas leiteiras de alta produção, vacas não lactantes e novilhas, no entanto, o grau desenvolvimento embrionário foi menor nas vacas lactantes, com relativamente mais mórulas e menos blastocistos. Os embriões coletados das vacas lactantes foram de coloração mais escura e de pior qualidade. Embriões de coloração escura contêm 45% mais lipídeos que os de coloração pálida e são mais sensíveis ao estresse oxidativo, ao resfriamento e ao congelamento (Abe *et al.*, 1999). O acúmulo de lipídeos nas células embrionárias pode ainda prejudicar a função mitocondrial e reduzir a abundância de produtos resultantes da transcrição de genes, que são importantes para a qualidade e a viabilidade do embrião (Abe *et al.*, 2002).

A relação inversa entre a intensidade do BEN e a fertilidade de vacas cíclicas pode estar relacionada à concentração sanguínea de progesterona. Como o BEN no período pós-parto influencia a secreção de progesterona pelo corpo lúteo (CL)? Britt (1991) propôs que os folículos ovarianos que são negativamente influenciados pela exposição ao BEN no início de seu desenvolvimento originam CL com menor capacidade de secreção de progesterona. Para avaliar esta hipótese, estes autores compararam a concentração de progesterona no sangue durante a fase lútea dos primeiros cinco ciclos estrais pós-parto (dias 6 a 13 do 1º ciclo estral e dias 10 a 17 dos demais) de vacas Holandesas que ganharam 0,06 pontos ou perderam 0,58 pontos de ECC nas primeiras cinco semanas pós-parto, mas tiveram produção de leite similar. A concentração de progesterona nos dois primeiros ciclos estrais pós-parto não diferiu entre os grupos de vacas, contudo, foi menor no 3º, 4º e 5º ciclos estrais pós-parto, nas vacas que perderam ECC.

A menor concentração sanguínea de progesterona, normalmente observada em vacas de alta produção, provavelmente também está relacionada à maior metabolização hepática deste hormônio. Wiltbank *et al.* (2001) relataram que o fluxo sanguíneo hepático em vacas lactantes foi duas vezes maior do que nas não lactantes, o que foi associado à maior metabolização hepática de estradiol e de progesterona, reduzindo a concentração sanguínea destes hormônios em 25% durante o ciclo estral. Da mesma forma, Sangsritavong *et al.* (2002) observaram maior fluxo sanguíneo hepático ( $1183 \pm 90,8$  vs  $757 \pm 104,8$  litros/horas) e menores concentrações sanguíneas de estradiol ( $265,44 \pm 4,99$  vs  $351,19 \pm 5,77$  pg/mL) e de progesterona ( $2,43 \pm 0,17$  vs  $3,53 \pm 0,20$  ng/mL) em vacas lactantes do que em vacas não lactantes de peso semelhante. A menor concentração de hormônios esteróides pode estar relacionada à redução da fertilidade, à reduzida manifestação de estro e ao aumento da ocorrência de dupla ovulação em vacas leiteiras de alta produção.

### Proteína e reprodução

A ótima utilização de PB na dieta depende da seleção de alimentos protéicos e suplementos nitrogenados não protéicos (NNP) que forneçam quantidades de proteína degradável no rúmen (PDR) que satisfaçam, mas não excedam, o requerimento de nitrogênio (N) necessário para a máxima síntese de proteína microbiana e, em determinadas situações, a utilização de fontes adequadas de proteína não degradada no rúmen (PNDR) para o fornecimento de aminoácidos absorvíveis no intestino delgado. Em situações em que há excesso de PDR na dieta ou falta de sincronia na disponibilização de energia e proteína no rúmen, a taxa de liberação de amônia no rúmen excede a sua utilização pelos microrganismos, resultando em aumento da concentração de amônia e uréia no sangue (Nutrient ..., 2001).

A maioria das vacas leiteiras consome excesso de proteína na dieta, o que leva ao aumento da concentração sanguínea de uréia e ou amônia (Butler, 1998). A concentração de NUP superior a 19mg/dL parece ser inversamente relacionada à fertilidade (Ferguson *et al.*, 1993, Butler *et al.*, 1996). Embora os mecanismos envolvidos não tenham sido ainda elucidados, alterações no ambiente uterino e redução da viabilidade embrionária foram descritas em vacas e novilhas que consumiram dietas contendo excesso de proteína ou dietas em que parte da proteína foi substituída por uréia.

Jordan *et al.* (1983) observaram que o fornecimento de uma dieta com 23% de PB a vacas leiteiras resultou em maior concentração de uréia e amônia no sangue e de uréia na secreção uterina, além de menor concentração de P, Mg e K na secreção uterina, em comparação ao fornecimento de uma dieta com 12% de PB. Em vacas leiteiras com média de produção de 10.000 kg leite/lactação, média 50 dias de lactação, consumindo uma dieta com 20% de PB, Hammon *et al.* (2005) observaram que a concentração de NUP  $\geq 20$  mg/dL foi associada a elevada concentração de amônia e de N-uréico no fluido uterino no 7º dia do ciclo estral.

Fisiologicamente, o pH uterino é maior na fase de diestro do ciclo estral (pH=7,1) do que ao estro (pH=6,8), devido ao aumento nas concentrações de Mg, K e P durante a fase lútea e ao aumento na atividade da enzima anidrase carbônica endometrial. Nos experimentos realizados por Elrod e Butler (1993) e Elrod *et al.* (1993), o excesso de PDR e de PDNR na dieta oferecida a novilhas resultou em redução do pH uterino, no 7º dia do ciclo estral. Também Rhoads *et al.* (2004) relataram a existência de uma relação inversa entre a concentração de NUP e o pH uterino no 7º dia do ciclo estral, em vacas holandesas lactantes. O menor pH pode estar relacionado à redução de Mg, K e P durante a fase lútea e à inibição da anidrase carbônica endometrial, que é sensível às alterações na composição iônica (Elrod e Butler, 1993, Elrod *et al.*, 1993).

Os subprodutos (amônia e uréia) provenientes do metabolismo do N podem ser tóxicos ao ovócito e ao embrião (Leroy *et al.*, 2008b). Contudo, o efeito tóxico de dietas contendo uréia sobre a qualidade embrionária foi relacionado ao período de fornecimento (Dawuda *et al.*, 2002) e ao momento em relação a IA (Alves, 2007). Menores proporções de ovócitos fecundados e de embriões viáveis foram recuperadas de vacas que consumiram 100g uréia/dia por cinco dias após a IA, em relação às que consumiram a mesma quantidade de uréia por cinco dias antes da IA (Alves, 2007).

É provável que a elevada concentração de NUP seja prejudicial aos ovócitos ou aos embriões antes do 7º dia de gestação. Bode *et al.* (2001) e Rhoads *et al.* (2006) verificaram que embriões coletados de vacas com concentração de NUP inferior a 19mg/dL resultaram em taxa de gestação aproximadamente 24% maior do que embriões coletados de vacas com concentração de NUP igual ou superior a 19 mg/dL. Esta diferença ocorreu apesar dos embriões coletados de ambos os grupos de vacas nos dois estudos serem classificados como excelentes e bons.

Efeitos tóxicos de amônia sobre o desenvolvimento embrionário foram demonstrados *in vitro*. Em estudo realizado por Sinclair *et al.* (2000), menor proporção de ovócitos coletados de novilhas com alta concentração plasmática de amônia se desenvolveu a blastocistos. Da mesma forma, Hammon *et al.* (2000), demonstraram que a adição de amônia ao meio de cultivo reduziu a proporção de ovócitos fertilizados que se desenvolveu a blastocistos e aumentou a proporção de embriões degenerados, de forma dose-dependente. Segundo Gardner e Lane (1993), a amônia presente nos meios de cultivo *in vitro* pode afetar adversamente o desenvolvimento embrionário, por ocasionar redução da concentração de  $\alpha$ -cetogluturato, por meio de sua conversão a glutamato. Isto ocasionaria redução do fluxo de  $\alpha$ -cetogluturato pelo ciclo do ácido tricarbóxico e, assim, menor produção de ATP pelas células embrionárias.

Schneider *et al.* (1996), citados por Rooke *et al.* (2004), sugeriram dois possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos inibitórios da amônia sobre o crescimento *in vitro* de células de mamíferos: 1) a alteração do pH intracelular, ocasionada pela presença de amônia no meio, requer o envolvimento da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase para transportar  $\text{NH}_4^+$  através da membrana celular, um processo que envolve gasto de energia na forma de ATP; 2) a amônia pode interagir diretamente com enzimas e participar de uma série de ciclos relacionados à sua detoxicação, os quais consomem ATP. Assim, qualquer que seja o mecanismo, a inclusão de amônia ao meio de cultivo pode desviar o ATP que seria utilizado para o crescimento da célula para a manutenção do meio intracelular.

A alta ingestão de proteínas pode ainda influenciar o sistema reprodutivo como resultado da maior demanda energética associada a detoxicação do excesso de amônia. O custo energético associado com a detoxicação de grande quantidade de amônia a uréia pelo fígado pode exacerbar o BEN no início da lactação e contribuir para a redução da fertilidade (Wathes *et al.*, 2007). Este efeito aditivo dificulta a interpretação dos resultados de trabalhos que buscaram estabelecer relação entre o excesso de N na dieta e a fertilidade de vacas leiteiras no pós-parto.

### Conclusões

O decréscimo na fertilidade de vacas leiteiras, observado nas últimas décadas, parece ser de natureza multifatorial, refletindo a influência cumulativa das adaptações metabólicas, das alterações endócrinas e da saúde pós-parto. O BEN e as adaptações metabólicas associadas parecem ser os fatores mais importantes relacionados

à redução da fertilidade de vacas leiteiras. Embora os resultados dos trabalhos que buscaram estabelecer relação entre a ingestão de dietas ricas em proteína e a fertilidade de vacas leiteiras sejam controversos, parece que teores elevados de NUP são prejudiciais à fertilidade, enfatizando a necessidade de adequação dos teores de proteína da dieta conforme as exigências nutricionais determinadas pela produção de leite.

### Referências

- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H.** Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev*, v.53, p.325-335, 1999.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing medium. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.57-66, 2002.
- Alves FR. Efeitos do fornecimento de dietas contendo nitrogênio não-protéico (NNP) sem prévia adaptação, durante curto espaço de tempo e em diferentes fases do ciclo estral na produção, qualidade e grau de desenvolvimento de embriões de fêmeas bovinas superovuladas. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado Nutrição e Produção Animal) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga. 2007.
- Bauman DE, Currie WB.** Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci*, v.62, p.1514-1528, 1980.
- Beam SW, Butler WR.** Effects of energy balance on function follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil Suppl*, n.54, p.411-424, 1999.
- Beam SW, Butler WR.** Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod*, v.56, p.133-142, 1997.
- Bell AW.** Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, v.73, p.2804-2819, 1995.
- Bode ML, Gilbert RO, Butler WR.** Effect of high plasma urea nitrogen levels on bovine embryo quality and development. *J Anim Sci*, v.79, suppl.1, p.116, 2001. (Abstract).
- Britt JH.** Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. In: World Buiatrics Congress, 17, 1991, St. Paul, MN. *Proceedings ...* St. Paul, MN: WCB, 1991. p.143-149.
- Butler ST, Pelton SH, Butler WR.** Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Dairy Sci*, v.89, p.2938, 2951, 2006.
- Butler WR.** Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci*, v.83, p.211-218, 2003.
- Butler WR.** Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Anim Sci Occas Publ*, v.26, p.133-145, 2001.
- Butler WR.** Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.81, p.2533-2539, 1998.
- Butler WR, Calaman JJ, Beam SW.** Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci*, v.74, p.858-865, 1996.
- Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Leese HJ, Hall CJ, Peters AR, Drew SB, Wathes DC.** Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.58, p.1443-1455, 2002.
- Drackley JK.** Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. *J Dairy Sci*, v.82, p.2259-2273, 1999.
- Drackley JK, Overton TR, Neil Douglas G.** Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v.84, suppl E, p.100-110, 2001.
- Elrod CC, Butler WR.** Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci*, v.71, p.694-701, 1993.
- Elrod CC, Van Amburgh M, Butler WR.** Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J Anim Sci*, v.71, p.702-706, 1993.
- Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M.** Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *J Dairy Sci*, v.76, p.3742-3746, 1993.
- Gardner DK, Lane M.** Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*, v.48, p.377-385, 1993.
- Hammon DS, Holyoak GR, Dhiman TR.** Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.86, p.195-204, 2005.
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR.** Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, v.58, p.1-8, 2000.
- Head HH, Gulay MS.** Recentes avanços na nutrição de vacas no período de transição. In: SINLEITE – Simpósio Internacional de Bovinocultura de Leite, 2, 2001, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 2001. p.121-137.
- Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, Swanson LV.** Relationship of dietary crude protein to composition of

- uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*, v.66, p.1854-1862, 1983.
- Jorritsma R, Jorritsma H, Schukken YH, Wentink GH.** Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology*, v.54, p.1065-1074, 2000.
- Leroy JLMR, Opsomer G, De Vliegher S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PEJ, De Kruif A, Van Soom A.** Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, v.64, p.2022-2036, 2005a.
- Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts, IGF, Bols PEJ.** Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.612-622, 2008a.
- Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IGF, Bols PEJ.** Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.623-632, 2008b.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, De Kruif A.** Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, v.62, p.1131-1143, 2004.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, De Kruif A, Genicot G, Van Soom A.** Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, v.130, p.485-495, 2005b.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, De Kruif A.** The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.119-123, 2006.
- Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y.** Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci*, v.84, Suppl. E, p.113-119, 2001.
- Marr AL, Piepenbrink MS, Overton TR, Lucy MC, Butler WR.** The somatotrophic axis and lipid metabolism in transition dairy cows in relation to timing of first postpartum ovulation. *J Dairy Sci*, v.85, suppl. 1, p.66, 2002. (Abstract).
- Moorby JM, Dewhurst RJ, Tweed JKS, Dhanoa MS, Beck NFG.** Effects of altering the energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci*, v.83, p.1795-1805, 2000.
- Nutrient** requirements of dairy cattle. 7. ed. Washington: National Academy Press, 2001. 381p.
- Rhoads ML, Gilbert RO, Lucy MC, Butler WR.** Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *J Dairy Sci*, v.87, p.2896-2901, 2004.
- Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, Toole R, Butler WR.** Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.1-10, 2006.
- Rooke JA, Ewen M, Mackie K, Staines ME, Mcevoy TG, Sinclair KD. Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.53-71, 2004.
- Sangsrivavong S, Combs, DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC.** High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.85, p.2831-2842, 2002.
- Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb, R, Mcevoy TG.** Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci*, v.78, p.2670-2680, 2000.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Coryn M, De Kruif A, Opsomer G.** Effect of  $\beta$ -OH butyrate on bovine granulosa and theca cell function in vitro. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.39-40, 2006a.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Maes D, Coryn M, Fiers T, De Kruif A, Opsomer, G.** Effect of non-esterified fatty acids on bovine theca cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci*, v.92, p.51-63, 2006b.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, De Kruif A.** Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.33-44, 2005.
- Vazquez-Añon M, Bertics S, Luck M, Grummer RR, Pinheiro J.** Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.77, p.1521-1528, 1994.
- Wallace RL, Mccoy GC, Overton TR, Clark JH.** Effect of metabolic diseases on dry matter consumption and production parameters. 1998. Disponível em: <http://www.livestocktrail.uiuc.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=240>. Acessado em: 13/04/2009.
- Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, Mcdaniel BT, Mcallister AJ.** Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci*, v.85, p.244-251, 2002.
- Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J. Fitzpatrick R.** Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, v.68, (Suppl.1), p.232-241, 2007.
- Wiltbank MC, Sartori R, Sangsrivavong S, Lopez H, Haughian JM, Fricke PM, Gumen A.** Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, v.84, suppl.1, p.32, 2001. (Abstract).