

Efeitos do nível de nitrogênio na dieta sobre características do sêmen de ovinos

Effects of dietary nitrogen level on semen characteristics of sheep

Rodrigo Alonso FORERO GONZALEZ¹; Carlos de Sousa LUCCI²;
Carmen Neusa Cortada MARTINS³; Paulo Henrique MAZZA RODRIGUES⁴;
Renato Ranzini RODRIGUES⁴

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Rodrigo Alonso Forero Gonzalez
PESAGRO-RIO – Estação Experimental
de Itaguaí
Rodovia BR 465, km 7, s/n
23890-000 – Seropédica – RJ
e-mail: rodrigoforero@hotmail.com

1-Recria Assistência Agropecuária. São José de Rio Preto – SP
2-Departamento de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNISA – SP
3-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista – SP
4-Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – SP

RESUMO

No presente experimento foi pesquisada a influência do nível de nitrogênio ou de equivalente em proteína degradável no rúmen (PDR) da ração sobre características bioquímicas do sêmen e da congelação dos espermatozoides de carneiros deslanados. Empregaram-se 18 carneiros jovens divididos em três blocos de seis animais cada, conforme seus perímetros escrotais, e distribuídos ao acaso para três tratamentos: A (controle), alimentados com ração de manutenção, B e C alimentados com ração de manutenção e acréscimo de 20 g e 40 g de uréia (75% de PDR e 150% de PDR), respectivamente. Após três semanas de adaptação, coletaram-se amostras de sangue e sêmen (vagina artificial) de cada animal, semanalmente durante nove semanas, e determinados os níveis de uréia no plasma sanguíneo (UP) e de uréia, transaminases (AST, ALT), fosfatase ácida, frutose e ácido cítrico no sêmen. Durante seis semanas, foram determinadas as diferenças de motilidade, vigor, patologia de acrossoma e patologia total entre a pré e a pós-congelação de amostras de sêmen crioprotetido. Houve regressão linear ($p < 0,01$) para os níveis de UP, 18,26 mg%, 34,42 mg% e 49,77 mg%, e para os níveis de uréia no sêmen 32,47 mg%, 51,44 mg% e 60,46 mg%, respectivamente para os tratamentos A, B e C. Não houve efeito dos tratamentos sobre concentrações seminais de frutose, ácido cítrico ou das enzimas fosfatase ácida e transaminases nem sobre diferenças na motilidade, vigor, patologia de acrossoma e patologia total dos espermatozoides. Os teores elevados de nitrogênio ou PDR na ração de carneiros deslanados elevaram os níveis de uréia no plasma sanguíneo e sêmen, mas não afetaram características bioquímicas do sêmen ou de congelabilidade dos espermatozoides.

UNITERMOS: Sêmen animal; Nitrogênio; Reprodução animal; Bioquímica; Ovinos.

INTRODUÇÃO

Quantidades elevadas de proteína ou nitrogênio na dieta de ruminantes, acompanhadas de incrementos nos níveis de uréia no plasma sanguíneo^{10,21}, foram relacionadas com infertilidade em vacas de alta produção leiteira^{6,8,9,12} e com perdas embrionárias em ovelhas¹⁶. Estudos demonstraram que a amônia, uréia e seus metabólitos podem exercer ação tóxica para espermatozoide e oócito³².

A influência da quantidade da proteína na dieta e degradabilidade sobre a fertilidade do macho bovino tem merecido o interesse de alguns pesquisadores^{18,23,24}. No entanto, tem-se pouca informação a este respeito na espécie ovina.

O uso de parâmetros bioquímicos no sêmen é importante na avaliação da sua qualidade, permitindo

identificar indiretamente variações hormonais, químicas e funcionais dos espermatozoides, além de alterações dos órgãos sexuais acessórios^{5,15}. A congelabilidade do sêmen, por exemplo, pode contribuir na identificação de defeitos na estrutura dos espermatozoides, imperceptíveis nos exames rotineiros.

Constituíram-se como objetivos desta pesquisa estudar possíveis efeitos de níveis crescentes de nitrogênio na dieta de carneiros, com acréscimos feitos na forma de uréia, sobre características bioquímicas do sêmen e avaliar se dietas com elevados níveis de nitrogênio afetam, de alguma forma, a congelação dos espermatozoides de carneiros.

MATERIAL E MÉTODO

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente casualizados e generalizados²⁰, com repetição dentro dos blocos. Os 18 animais foram divididos com base em seu perímetro escrotal em 3 blocos experimentais com 6 carneiros cada. Posteriormente, foram sorteados os animais dentro de cada bloco para os diferentes tratamentos.

Material

Foram utilizados 18 ovinos machos, mestiços, deslançados, com idades variando entre 11 e 17 meses, mantidos em estabulação permanente em baia individual.

As dietas utilizadas foram isoenergéticas, diferindo nos níveis de nitrogênio, e formando os seguintes tratamentos: A ou controle, a ração foi formulada para atender às exigências do ARC¹, em termos de proteína degradável (PDR) e proteína não-degradável no rúmen (PNDR), para ovinos; B, dieta controle acrescida de 20 g de uréia por animal por dia, para atingir valor de equivalente protéico mais PDR 75% superior ao tratamento A; C, dieta controle, acrescida de 40 g de uréia por animal por dia, para atingir valor de equivalente protéico mais PDR 150% superior ao tratamento A.

Os alimentos utilizados nas dietas foram mistura peletizada, feno e milho moído. As quantidades finais de cada um dos componentes empregados para a preparação das dietas e do total da proteína bruta, PDR e nitrogênio nos três tratamentos estão especificadas na Tab. 1.

Tabela 1

Quantidades dos alimentos da ração, em gramas de matéria seca; níveis de proteína bruta (PB), proteína degradável no rúmen (PDR), nitrogênio (N) e energia metabolizável (EM) em megacalorias por tratamento, Pirassununga, jun./ago., 1996.

	Feno	Fubá	Far.	Uréia	Supl.	PB	PDR	N	EM
Trat.	g	g	g	g	g	g	g	g	Mcal
A	730	572	46	0	10	142	73	23	3,13
B	730	572	46	20	10	199	131	32	3,13
C	730	572	46	40	10	257	189	41	3,13

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; PDR: proteína degradável no rúmen.

Métodos

No dia 6 de junho, iniciou-se a fase experimental e colheita de amostras de sêmen, a qual encerrou-se no dia 6 de agosto de 1996. Água foi ministrada *ad libitum*, enquanto a mistura peletizada foi fornecida em duas refeições diárias, às 7 e às 17 horas. O feno, grosseiramente picado, era fornecido à parte, às 6 e às 12 horas. Os animais dos grupos B e C começaram a receber uréia gradativamente 33 dias antes do início do período de colheita de amostras, até serem atingidas

as quantidades desejadas.

Colheita de amostras de sêmen e plasma sanguíneo

No período experimental, as amostras de sêmen foram obtidas através de vagina artificial com uso de manequins (fêmeas ovinas), diariamente, no período da manhã. Amostras de plasma sanguíneo (separadas das células por centrifugação) foram coletadas semanalmente.

Análise laboratorial do sêmen

Após a ejaculação, foram medidas a concentração (1 x 10⁹/ml), motilidade (0 a 100%) e vigor (1-5). As amostras de sêmen destinadas a exames bioquímicos (frutose e ácido cítrico) tiveram uma parte separada para processamento imediato e outra congelada; amostras de sêmen foram centrifugadas (7.500 g por 15 minutos a 4°C), e separados os espermatozoides (*pellet*) do plasma seminal. Estes constituintes foram congelados e armazenados.

A concentração dos espermatozoides no ejaculado foi determinada em câmara de Neubauer, com as amostras diluídas 1:1.000. Os dados de patologia do sêmen foram obtidos através da técnica da gota úmida com microscópio de contraste de fase sobre 200 células. As patologias foram classificadas em defeitos maiores e defeitos menores, segundo Blom⁴.

Bioquímica do sêmen

As análises do teor de frutose e ácido cítrico no sêmen foram processadas pelas técnicas colorimétricas descritas por Mann e Saffran *et al.*^{14,25}, respectivamente. A fosfatase ácida (FAC) foi determinada pela técnica descrita no *kit* bioquímico cinético para determinação de fosfatase ácida prostática.

Para a determinação das transaminases (alanino-amino-transferase, ALT e aspartato-amino-transferase, AST), utilizaram-se amostras de espermatozoides em *pellet* de células. Para a determinação da concentração enzimática nos espermatozoides, diluiu-se cada *pellet* em 1 ml de solução livre de cálcio Krebs-Ringer tampão a pH para posteriormente ser sonificado à máxima potência (23 kHz) por 15 segundos com descansos de 15 segundos até completar 90 segundos de sonicação dentro de gelo¹⁷. Para a determinação enzimática, foi utilizado *kit* colorimétrico para transaminases.

A uréia foi determinada em amostras de plasma e sêmen. As amostras de sêmen foram desproteinizadas com tungstato de sódio (10%) e ácido sulfúrico (1N). A concentração de uréia foi determinada através de *kit* colorimétrico para uréia pelo método Berthelot.

Congelamento de sêmen

Para a congelação das amostras de sêmen, determinaram-se concentração, motilidade e vigor. Foi

utilizado o diluidor de Salomon para técnica de uma etapa⁷, e o sêmen, envasado manualmente em palhetas de 0,5 ml contendo 50 milhões de espermatozoides. As palhetas foram imediatamente levadas da temperatura de 33°C à refrigeração numa geladeira comum até atingir 5°C, curva de 0,12°C/min. A congelamento foi feita em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido, as palhetas (três por animal para cada congelamento semanal) foram colocadas a três centímetros do nível de nitrogênio líquido, expostos aos vapores (-80°C), por um período de 15 minutos. Após este período, foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C), o que resultou em uma curva de congelamento de 13,4°C/min. A descongelamento do sêmen foi feita em banho-maria a 35°C por 30 segundos e o sêmen avaliado para motilidade e vigor. Amostras de sêmen descongelado (3 a 4 gotas) para patologia foram colhidas de cada palheta e armazenadas em formol salino tamponado. As técnicas utilizadas e escalas de classificação para motilidade, vigor e patologia foram idênticas às já referidas.

Análise estatística

Os resultados da congelamento foram estabelecidos pela diferença entre as médias obtidas antes e após a congelamento do sêmen. Estes resultados, como os bioquímicos, foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (Proc. UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo teste F. Os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos a transformação logarítmica [$\log(X+1)$] ou pela raiz quadrada [$RQ(X+1/2)$]. Os dados originais ou transformados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (Proc. GLM) e os efeitos dos tratamentos foram separados através de contrastes ortogonais. Foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Uréia plasmática

Os valores médios totais de uréia encontrados no plasma sanguíneo dos carneiros nos tratamentos A, B e C foram de 18,26mg%, 34,42mg% e 49,77mg% respectivamente (Tab. 2). Neste experimento, os resultados dos tratamentos foram comparáveis com médias correspondentes em experimento semelhante ao presente, executado em ovelhas¹⁶.

Foi encontrada regressão linear significativa ($p < 0,01$) entre nível de PDR da dieta e o nível de uréia no plasma sanguíneo (UP) nas semanas 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Nas médias totais dos três tratamentos, houve relação linear com o aumento dos níveis de uréia plasmática à medida que os tratamentos implicavam maiores teores de PDR. O coeficiente de variação médio foi de 43,2% (Tab. 2).

As relações entre nível de nitrogênio da dieta e uréia plasmática já haviam sido determinadas previamente por alguns autores^{10,21}.

Uréia seminal

Os valores médios totais de uréia no sêmen para os tratamentos A, B e C foram respectivamente 32,47 mg%, 51,44 mg% e 60,46 mg% (Tab. 3). A relação proteína: energia das rações foi definida por Preston *et al.*²¹ como um fator que afeta a uréia plasmática de ruminantes, podendo alterar a quantidade de uréia no sêmen, como aliás foi determinado em touros¹¹. Existe uma relação direta entre quantidade de nitrogênio da dieta e uréia no sêmen, já que a uréia atravessa facilmente as membranas celulares, distribuindo-se homogeneamente pelos fluidos do corpo, como foi mostrado em ruminantes¹⁰, e nos fluidos da rede testicular desta espécie²⁷. No presente experimento, houve relação linear ($p < 0,01$), na maior parte do período experimental, entre o nível de nitrogênio da ração e o nível de uréia no sêmen. O coeficiente de variação médio

Tabela 2

Efeitos dos tratamentos sobre os níveis médios de uréia plasmática de carneiros. Coeficientes de variação, probabilidades de regressão linear e de desvios, e coeficiente de determinação, Pirassununga, jun./ago., 1996.

SEM	Tratamentos			C.V.	Probabilidades		
	A	B	C		Lienar	Desvio	R ²
1	15,91	34	44,25	47,01	0,0002	0,4234	0,6511
2	17,98	44,88	58,12	44,48	0,0001	0,0215	0,9184
3	14,96	30,80	47,68	47,57	0,0001	0,8622	0,8611
4	18,41	35,20	52,62	45,99	0,0001	0,9375	0,7788
5	21,56	35,65	50,63	37,37	0,0001	0,8428	0,8388
6	15,16	27,75	44,98	45,38	0,0001	0,9076	0,8489
7	16,27	36,11	49,92	42,76	0,0001	0,1266	0,9401
8	20,69	30,87	52,70	44,85	0,0001	0,1617	0,7443
9	23,40	32,56	46,72	37,79	0,0006	0,5896	0,5739
Méd. ¹	18,26	34,42	49,77	43,56	0,0001	0,1232	0,7525

Nota: Os tratamentos A ou controle (dieta base), B com 75% a mais de PDR na dieta que a do controle e C com 150% de PDR a mais que a do controle.

¹ Efeito de tratamento ($p < 0,01$).

foi de 30,3% (Tab. 3). Houve maior concentração de uréia no sêmen comparativamente à uréia plasmática em todos os tratamentos. Este resultado considera a hipótese da existência de mecanismo de transporte ativo, que permite a concentração de uréia no testículo, epidídimo ou glândulas sexuais acessórias. Turner *et al.*³¹ encontraram evidências de tal mecanismo nos fluidos do testículo e plasma epididimal de ratos e Ripoche e Rousselet²² comprovaram a existência de carregadores do tipo UT11 no testículo. A expressão gênica do transportador HU3 nas células de Sertoli foi encontrada³⁰; poderia estar associado com etapas iniciais de desenvolvimento do espermatócito, sugerindo que a uréia pode ser importante na espermatogênese. Em hamsters, a relação entre uréia no fluido testicular e no plasma não tinha superado 25% nos túbulos seminíferos, após 4 horas de sua administração²⁷, demonstrando o processo de concentração de uréia nessa espécie. No presente experimento, as relações entre as médias de uréia no sêmen e no plasma foram de 77%, 50% e 21,5%, respectivamente, para os tratamentos A, B e C, dando idéia da capacidade de concentração de uréia no trato reprodutivo do carneiro. Observou-se queda na capacidade de concentração de uréia de acordo com o aumento do PDR da dieta e conseqüentemente da uréia plasmática. Este fato indicaria desgaste do(s)

mecanismo(s) ativo(s) que regula(m) o processo de transporte de uréia com esgotamento da capacidade de transporte aos fluidos reprodutivos conforme aumenta o nível de uréia no plasma. Houve efeito dos tratamentos ($p < 0,01$), aumentando o nível de uréia no sêmen à medida que os níveis de uréia na dieta eram incrementados.

Enzimas (ALT, AST e FAC)

Os valores médios de AST e ALT nos espermatozoides para os tratamentos A, B e C foram de 2.120 UI, 2.108 UI, 2.134 UI e de 261 UI, 265 UI, 281 UI, respectivamente (Tab. 4). Neste experimento não foi registrada relação entre níveis de PDR na dieta e das transaminases no sobrenadante de espermatozoides submetidos a sonicação. Com base nos resultados do presente trabalho, a uréia não prejudicou ou alterou a permeabilidade da membrana, a ponto de levar à liberação de enzimas no plasma seminal, alterando assim os níveis destas nos espermatozoides. Não houve efeitos dos tratamentos sobre os níveis das transaminases, corroborando os resultados de Bhosrekar *et al.*³.

Os valores médios totais de FAC no plasma seminal para os tratamentos A, B e C foram de 342 UI, 381 UI e 331 UI, respectivamente (Tab. 4). Neste experimento, a relação entre o

Tabela 3

Efeitos dos tratamentos sobre os níveis médios de uréia no sêmen de carneiros. Coeficientes de variação, probabilidades de regressão linear e de desvios, e coeficiente de determinação, Pirassununga, jun./ago., 1996.

SEM	Tratamentos				Probabilidades		
	A	B	C	C.V.	Linear	Desvio	R ²
1	29,55	42,77	52,68	26,91	0,0001	0,5447	0,7504
2	36,10	49,35	64,32	28,83	0,0001	0,8437	0,6786
3	28,66	44,96	52	26,66	0,0001	0,0943	0,7715
4	38,11	57,83	67,25	25,82	0,0001	0,1685	0,7593
5	36,48	58,18	68,28	27,36	0,0001	0,0879	0,8081
6	27,22	43,23	50,47	26,57	0,0001	0,0649	0,8317
7	32,78	59	62,58	30,24	0,0001	0,0176	0,7726
8	34,91	60,02	70,02	30,09	0,0001	0,0616	0,7948
9	28,43	47,63	56,59	31,62	0,0001	0,2177	0,7159
Méd. ¹	32,47	51,44	60,46	30,31	0,0001	0,0048*	0,643

Nota: Os tratamentos A ou controle (dieta base), B com 75% a mais de PDR na dieta que a do controle e C com 150% de PDR a mais que a do controle.
¹ Efeito de tratamento ($p < 0,01$).

Tabela 4

Efeito dos tratamentos sobre os níveis médios totais de enzimas AST, ALT e FAC, da frutose e ácido cítrico nos espermatozoides, plasma seminal e sêmen total de carneiros, respectivamente. Coeficientes de variação, probabilidades de regressão linear e de desvios, Pirassununga, jun./ago., 1996.

		Tratamentos			Probabilidades		
		A	B	C	C.V.	Linear	Desvio
GOT (AST)	Méd. Total	2120	2108	2134	33,89	0,1986	0,2734
GPT (ALT)	Méd. Total	266	265	281	30,82	0,6590	0,7756
FAC	Méd. Total	342	380	331	43,87	0,9527	0,6032
Á. Cítrico	Méd. Total	1017	1018	996	25,29	0,8173	0,8864
Frutose	Méd. Total	880	844	832	24,2	0,5766	0,8768

Nota: Os tratamentos A ou controle (dieta base), B com 75% a mais de PDR na dieta que a do controle e C com 150% de PDR a mais que a do controle.

nível de nitrogênio da dieta e o nível de FAC no plasma seminal não foi significativa.

Frutose e ácido cítrico

Os valores médios de frutose no sêmen para os tratamentos A (controle), B e C foram 880 mg%, 844 mg% e 832 mg%, respectivamente (Tab. 4). Neste experimento, não houve efeito dos tratamentos sobre o nível de frutose no sêmen. A influência da nutrição sobre a frutose no sêmen tinha sido registrada por alguns pesquisadores^{2,14,28}, e a relação do tipo de fonte de nitrogênio (uréia, soja ou pastagem), sobre este açúcar¹⁹. Com base nos resultados do presente experimento, foi observado que mudanças nos teores de PDR na dieta de carneiros não afetaram a secreção de frutose e ácido cítrico pelas vesículas seminais do animal. É importante ressaltar que não houve deficiências nutritivas e sim relação desequilibrada entre energia e proteína (PDR) da dieta nos tratamentos B e C, de forma que o aporte de nutrientes básicos para funções reprodutivas foi atendido em todas as situações.

Os valores médios de ácido cítrico no sêmen para os tratamentos A, B e C foram de 1.017 mg%, 1.018 mg% e 996 mg%, respectivamente (Tab. 4). No presente experimento, não foram encontrados efeitos dos tratamentos entre nível de nitrogênio da dieta e de uréia no sêmen na média das semanas. Contrariamente, Hazarika *et al.*¹¹ encontraram correlação negativa entre nível elevado de uréia no sêmen de touros e ácido cítrico. Shirley *et al.*²⁸ relacionaram deficiências de proteína na dieta com diminuição do ácido cítrico no sêmen de touros de corte. A alimentação restrita (energia e proteína) também já tinha sido relacionada com a diminuição do ácido cítrico¹⁴, principalmente por decréscimo dos níveis de testosterona. No presente experimento, os níveis de proteína e energia foram suficientes para manter a função hormonal e dos órgãos sexuais acessórios.

Congelamento de sêmen (diferenças na motilidade, vigor, patologias totais e nos defeitos do acrossomo, durante a pré e pós-congelação)

Os valores médios da diferença para motilidade e vigor entre a pré-congelação e pós-descongelação do sêmen para os tratamentos A, B e C foram para a motilidade de -35.97%,

-38,61% e -39,44% e para vigor de -1.24, -1.32 e -1.35, respectivamente (Tab. 5). Não houve relação entre níveis de PDR das dietas e estas médias.

Os valores médios das diferenças para as variáveis patologia total e acrossomo entre a pré-congelação e a pós-descongelação do sêmen nos tratamentos A, B e C foram de 39,6%, 39,15% e 43,08%, respectivamente, para a primeira variável e de 37,76%, 39,08% e 42,21%, respectivamente, para a segunda (Tab. 5). Os resultados mostram-se elevados para todos os tratamentos e para as duas variáveis, sendo evidente que o aumento nas patologias de acrossomo foi o principal responsável pelo incremento na patologia total. As principais alterações de cabeça e de acrossomo evidentes foram: formação de vacúolos, perda de porções de acrossomo (em diferentes graus) e formação de edemas no ápice da cabeça. Estes tipos de alterações foram comuns nas amostras do sêmen congelado dos três tratamentos, não sendo causados pelas dietas. Não houve efeito dos tratamentos sobre as diferenças encontradas na pré e pós-congelação (Tab. 5). Watson e Martin³³ relataram alta sensibilidade dos espermatozoides de carneiros em sofrer alterações, quando comparados com os de touros. As principais alterações observadas nos espermatozoides de carneiros estão localizadas na sua estrutura²⁹. As membranas acrossomais e citoplasma do espermatozoide são mais sensíveis à congelação ou descongelação que o sistema de locomoção. Foi observado que sêmen de carneiros, após descongelação, apresenta 40% a 60% dos espermatozoides com motilidade e somente 20% a 30% permanecem biologicamente inalterados²⁶. Formação de edemas no ápice do acrossomo foram observados após descongelação³⁴.

Nas condições em que foi executado o presente experimento, puderam ser enunciadas as seguintes conclusões: os níveis da porção nitrogenada da dieta, que é trabalhada no rúmen, afetaram significativamente de maneira linear e direta os teores de uréia do plasma sanguíneo e do sêmen, porém, não afetaram significativamente as concentrações de frutose, ácido cítrico e da enzima fosfatase ácida nem os teores das enzimas intracelulares (transaminases), motilidade, vigor, patologia total e de acrossomo durante a pré e pós-congelação dos espermatozoides de carneiros.

Tabela 5

Efeito dos tratamentos sobre as diferenças de motilidade, vigor, patologias total e de acrossoma pré-congelação e pós-descongelação do sêmen de carneiros. Coeficientes de variação, probabilidades de regressão linear e de desvios e coeficiente de determinação, Pirassununga, jun./ago., 1996.

	SEM	Tratamentos			C.V.	Probabilidades	
		A	B	C		Linear	Desvio
Diferença de motilidade	Méd.	-35,97	-38,61	-39,44	34,07	0,1599	0,6619
Diferença de vigor	Méd.	-1,24	-1,32	-1,35	55,59	0,4639	0,8309
Diferença na patologia total	Méd.	39,60	39,15	43,08	38,95	0,4921	0,6162
Diferença na patologia de acrossomo	Méd.	37,76	39,08	42,21	36,13	0,3772	0,8335

Nota: Os tratamentos A ou controle (dieta base), B com 75% a mais de PDR na dieta que a do controle e C com 150% de PDR a mais que a do controle.

SUMMARY

The research looked upon the influence of dietary nitrogen level or equivalent ruminal degradable protein (RDP) on semen biochemistry characteristics and freezability of sheep spermatozoa. Eighteen young rams, were allocated in three blocs of six animals each, according to scrotal circumference. The rams were randomly distributed to three treatments: A (control) a maintenance diet, B and C, maintenance diet added 20 g and 40 g of urea (75% and 150% of RDP), respectively. Three weeks after dietary adaptation, blood and semen samples were collected every week for nine weeks, to analyze blood plasma and semen levels of urea, transaminases (AST and ALT), acid phosphatases, fructose and citric acid. Once a week for six weeks the motility percent, motility rates, abnormal acrosome percent and abnormal total percent between pre-freezing and post-thaw of cryoprotected semen samples were freezing, evaluated and calculated to mathematical difference. There was a linear regression ($p < 0.01$) between levels of UP 18.26 mg%, 34.42 mg% and 49.77 mg%, and levels of semen urea 32.47 mg%, 51.44 mg% and 60.46 mg%, for treatments A, B and C respectively. There was no effect of treatments on fructose, citric acid or enzymes acid phosphatase and transaminases levels, and of motility percent, motility rating, abnormal acrosome percent and abnormal total percent differences. The excess of nitrogen or RDP dietary levels elevates urea in blood plasma and semen, but did not affect biochemistry characteristics and freezability of rams spermatozoa.

UNITERMS: Semen; Nitrogen; Animal Reproduction; Biochemistry; Sheep.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ARC-AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. The nutrient requirements of ruminal livestock. Report of the Protein Group of Agricultural Research Council Working Party on the nutrient requirements of ruminants. **Farnham Royal. CAB**, 1980. p.351. Supplement n.1.
- 2- BARONOS, B.S.; MANN, T.; ROBSON, L.E.A.; SKINNER, J.D. The effect of nutrition and androgens on the composition of bovine blood plasma and seminal plasma at puberty. **Britannic Journal Nutrition**, v.23, n.1, p.191-200, 1969.
- 3- BHOSREKAR, M.R.; PUROHIT, J.R.; THOLE, N.S.; NISAL, P.R.; PANDE, A.B.; MANGURKAR, B.R. Semen quality of 50% crossbred (Holstein-Friesian x Gyr) bull fed three different levels of digestible crude protein. **Indian Journal Animal Science**, v.58, n.4, p.510-4, 1988.
- 4- BLOM, E. The ultra-structure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinæ Medicine**, v.25, n.7, p.383-91, 1973.
- 5- BORKOWSKI, K.; STRZEZEK, J. The use of biochemical indicators to evaluated semen quality. **Medycyna Weterynary**, v.50, n.5, p.200-2, 1994.
- 6- CHALUPA, W. Discussion of protein symposium. **Journal Dairy Science**, v.67, n.5, p.1134-46, 1984.
- 7- EVANS, G.; MAXWELL, M.W. **Salomon's artificial insemination of sheep and goat**. Sidney: Butterworths, 1987. 194p.
- 8- FERGUSON, J.D.; BLANCHARD, T.; GALLIGAN, D.T.; HOSHALL, D.C.; CHALUPA, W. Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen. **Journal American Veterinary Association**, v.192, n.5, p.659-62, 1988.
- 9- FERGUSON, J.D.; BLANCHARD, T.; SHUTZBERGER, T.; CHALUPA, W. Effect of protein degradability on reproduction in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.69, p.121, 1986. Supplement 1.
- 10- HARMEYER, J.; MARTENS, H. Aspects of urea metabolism in ruminant with reference to the goat. **Journal Dairy Science**, v.63, n.10, p.1707-28, 1980.
- 11- HAZARIKA, H.; SAXEMA, V.B.; TRIPATHI, S.S. Seminal biochemical constituents in crossbred bulls. **Indian Journal Animal Science**, v.59, n.5, p.579-81, 1989.
- 12- JORDAN, E.R.; SWANSON, L.V. Effect of crude protein on reproduction efficiency, serum total protein and albumin in the high producing of uterine secretion and blood in high producing postpartum dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.62, n.1, p.58, 1979.
- 13- MANN, T. Fructose content and fructolyses in semen. Practical applications in the evaluation of semen quality. **Journal of Agricultural Science**, v.38, p.323-31, 1948.
- 14- MANN, T. The testis: appraisal of endocrine testicular activity by chemical analysis of semen and male accessory secretions. **Colloquia on the Endocrinology CIBA Foundation**, v.16, p.233-48, 1967.
- 15- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. New York: Springer-Verlag, 1981. p.495.
- 16- McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; FINDLAY, P.A.; ROBERTSON, I.S. Dietary excesses of urea influence of viability and metabolism of pre-implantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. **Animal Reproduction Science**, v.47, n.1, p.71-90, 1997.
- 17- MURDOCH, R.N.; WHITE, I.G. Studies of distribution and source of enzymes in mammalian semen. **Australian Journal Biological Science**, v.21, n.4, p.483-90, 1968.
- 18- NDAMA, P.H.; ENTWISTLE K.W.; LINDSAY, J.A. Effect of protected protein supplements on some testicular traits in Brahman cross bulls. **Theriogenology**, v.20, n.6, p.639-59, 1983.
- 19- OLTJEN, R.R.; BONS, J.; GERRITS, R.J.; JOHNSON, L.A. Growth and reproductive performance of bulls and heifers fed purified and natural diets. V Free aminoacid in the semen and blood plasma of bulls (puberty at 148 weeks of age). **Journal Animal Science**, v.33, n.4, p.814-8, 1971.
- 20- PIMENTEL F.G. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. Piracicaba: Nobel, 1987. 467p.
- 21- PRESTON, R.L.; SCHANAKEMBERG, D.D.; PFANDER, W.H. Protein utilization in ruminants. I. Blood urea nitrogen as affect by protein intake. **Journal of Nutrition**, v.86, n.3, p.281-8, 1965.
- 22- RIPOCHE, P.; ROUSSELET, G. Urea transporters. **Nephrologie**, v.17, n.7, p.383-8, 1996.
- 23- ROCHA, A.; CARPENA, M.; TRIPPLETT, B.; FORREST, D.D.; RANDEL, R.D. Effect of ruminal undegradable protein from fishmeal on growth and reproduction of peripuberal Brahman bulls. **Journal Animal Science**, v.73, n.4, p.947-53, 1995.

- 24- ROCHA, A.; CARPENA, M.; TRIPPLETT, B.; NEUENDORFF, D.A. Testicular and epididimal function during peripuberal period in Brahman bulls receiving amounts of protein degradable on the rumen. **Theriogenology**, v.45, n.4, p.477-88, 1996.
- 25- SAFFRAN, M.; DENSTEDT, O.F. A rapid method for the determination of acid citric. **Journal Biology Chemical**, v.175, n.10, p.849-55, 1948.
- 26- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, n.1, p.1-36, 1995.
- 27- SETCHELL, B.P.; BROOCKS, D.E. Anatomy, vascular, enervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.J. **The physiology of the reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p.797-818.
- 28- SHIRLEY, R.L.; MEACHAM, A.C.; WARNIK, A.C.; HEMTGES, J.F.; CUNHA, J.; CUNHA, T.J. Effect of dietary protein on fructose, citric acid and 5-nucleotidase activity in the semen bulls. **Journal Animal Science**, v.22, n.1, p.14-8, 1963.
- 29- TARESSON, F.; AMIS, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal Reproduction and Fertility**, v.51, n.1, p.461-2, 1977.
- 30- TSUKAGUCHI, H.; SHAYAKUL, C.; BERGER, U.V.; BROWN, D.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of the urea transporter UT3: localization in rat kidney and testis. **Journal Clinical Investigation**, v.99, n.7, p.1506-15, 1997.
- 31- TURNER, T.T.; HERTMANN, P.K.; HOWARDS, S.S. Urea in the seminiferous tubule: evidence for active transport. **Biology of Reproduction**, v.20, n.4, p.511-5, 1979.
- 32- VISEK, W.J. Ammonia: it is effects on biological systems metabolic hormones and reproduction. **Journal Dairy Science**, v.67, n.5, p.481-98, 1984.
- 33- WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.28, n.1, p.99-101, 1972.
- 34- WOOLLEY, D.M.; RICHARDSON, D.W. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.53, n.2, p.389-94, 1978.

Recebido para publicação: 06/11/98
Aprovado para publicação: 10/08/00