

Influência do nível de uréia plasmático sobre parâmetros citogenéticos de machos ovinos deslanados *

Plasmatic urea levels influence on cytogenetic parameters of wool-less rams

Carmen Neusa Martins CORTADA¹; Carlos de Sousa LUCCI²;
Rodrigo Alonso FOREROGONZALEZ³; Carla Balzano de MATTOS³; Maria Amélia ZOGNO²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Carmen Neusa Martins Cortada
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP
Cidade Universitária Armando de Salles
Oliveira
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de
Paiva, 87
05508-000 – São Paulo – SP
e-mail: ccortada@uol.com.br

1-Departamento de Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP – SP
2-Departamento de Nutrição e Produção
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da USP – SP
3-Universidade Paulista (UNIP), ICS – SP

RESUMO

O experimento foi planejado para verificar o efeito do aumento dos níveis plasmáticos de uréia, resultantes do acréscimo de uréia à dieta, sobre parâmetros citogenéticos de ovinos (*Ovis aries*) deslanados brasileiros, da raça Santa Inês, com idade entre 13 e 18 meses. Dezoito animais foram distribuídos a três dietas que consistiam de: dieta A – ração contendo níveis de nitrogênio de acordo com NRC (1985); dieta B – ração contendo nível de nitrogênio 133% superior ao da ração A; e dieta C – ração contendo nível de nitrogênio 166% superior ao da ração A. O aumento no nível de nitrogênio foi obtido com acréscimo de 20 e 40 g de uréia grau alimento, para os tratamentos B e C, respectivamente. A colheita de sangue para determinação do nível de uréia no plasma foi semanal. Para a realização da cultura de linfócitos, para a verificação do número de cromossomos e índice mitótico, 60 dias após terem sido alcançados os níveis de uréia desejados na dieta, foi coletado sangue de cada animal. O aumento dos níveis de uréia no plasma ($p < 0,0001$) não afetou os parâmetros observados.

UNITERMOS: Ureia; Citogenética; Cromossomos; Carneiros.

INTRODUÇÃO

A citogenética é uma técnica empregada para detectar alterações numéricas e/ou morfológicas dos cromossomos¹⁹ que possam estar interferindo no desempenho do animal ou do rebanho, cuja produção está sujeita também a fatores relacionados com a reprodução e a nutrição.

Por ser a nutrição o componente mais oneroso da criação, muitas vezes emprega-se uréia na dieta do ruminante como fonte nitrogenada de baixo custo, o que pode elevar os teores de uréia sanguíneos, havendo porém o receio de que este aumento provoque, no macho, infertilidade como nas fêmeas^{1,2,3,5,6,8,9,15,16}. A redução na fertilidade poderia ser causada não somente por ação direta da uréia sanguínea sobre os órgãos reprodutivos, mas também por ação da uréia sobre os cromossomos, visto terem sido observadas alterações cromossômicas em células humanas⁹ e animais^{4,10,14} após utilização de uréia.

Segundo Fechheimer⁷, deve-se, portanto, examinar

os reprodutores quando estes receberem dietas contendo aditivos alimentares potencialmente genotóxicos como a uréia^{4,10,14,19}.

O aumento de uréia na circulação pode ocorrer quando há problema renal ou excesso de produção de uréia pelo fígado devido ao consumo excessivo de compostos nitrogenados ou carência de alimentos ricos em carboidratos, na alimentação de ruminantes.

Estudou-se o efeito do aumento da uréia plasmática, provocado por dietas com quantidades crescentes de fonte nitrogenada não-protéica, sobre o número dos cromossomos e o índice mitótico de linfócitos, em machos ovinos.

MATERIAL E MÉTODO

Dezoito ovinos mestiços da raça deslanada Santa Inês com idades entre 11 e 18 meses e peso vivo entre 33,1 kg e 41,4 kg, foram alimentados com dietas isoenergéticas com diferentes níveis de nitrogênio. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado¹¹ com três tratamentos estruturados

* Financiamento: FAPESP N° 95/2902-1.

em níveis crescentes de nitrogênio na dieta: dieta A - ração com teor de nitrogênio segundo o NRC¹⁸; dieta B- aumento de 133% de nitrogênio em relação à dieta A; e dieta C - aumento de 166% de nitrogênio em relação à dieta A. O aumento no equivalente protéico foi obtido com acréscimo de uréia, respectivamente para os tratamentos B e C. A todas as dietas foi acrescentado fubá de milho, que nas dietas B e C servia de veículo para a uréia. Para os animais dos tratamentos B e C as porções de uréia foram aumentadas gradativamente até atingir a quantidade desejada. A composição da ração pode ser vista na Tab. 1.

Semanalmente, alíquotas de plasma sanguíneo foram congeladas à temperatura de -20°C para posterior determinação de uréia por método enzimático colorimétrico (kit CELM[®]- Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, SP - Brasil).

As amostras de sangue (5 ml) foram colhidas em frasco contendo heparina (500 UI) e centrifugadas por 15 minutos a 7.000 g, a 4°C para separação do plasma.

Os exames citogenéticos foram realizados no Laboratório de Citogenética do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Como exames citogenéticos, foram realizados a contagem do número de cromossomos e o índice mitótico, 60 dias após terem sido alcançados os níveis desejados de uréia nas dietas B e C.

Colheita de sangue

Foram colhidos 5 ml de sangue da veia jugular, em seringa estéril contendo heparina (500 UI), após assepsia com algodão embebido em álcool 70° GL, até que o algodão permanecesse limpo.

Imediatamente após a colheita de sangue, a agulha usada foi desprezada e trocada por outra estéril. A amostra foi mantida na seringa de colheita, sob refrigeração, até o momento da cultura, que ocorreu em até 24 horas após a colheita.

Cultura de Linfócitos

A cultura de linfócitos foi realizada segundo método descrito por Halnan¹², modificado por Zogno²⁴.

Contagem do número de cromossomos: a contagem dos cromossomos foi realizada em microscópio de contraste de interferência (Dialux 20[®] - Ernst Leitz Wetzlar GMBH-Alemanha), sob imersão, com aumento de 1.250 vezes, em pelo menos 11 metáfases^{13,20}.

Índice mitótico: o índice mitótico representou a porcentagem de núcleos em metáfases encontrada após a observação de 1.000 núcleos¹⁹, em microscópio de contraste de interferência.

Análise estatística

O modelo matemático proposto testou os efeitos de concentração de uréia (tratamentos A, B, C) sobre o número de cromossomos e índice mitótico. Para análise do número de cromossomos, os dados podem ser descritos pelo seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}, \text{ no qual,}$$

$$Y_{ij} = \text{número de cromossomos}$$

$$\mu = \text{média geral}$$

$$\alpha_i = \text{efeito do iésimo tratamento}$$

e_{ij} = erro aleatório inerente a cada observação, sendo que: $e \sim N(\mu, \sigma^2)$.

Os dados foram analisados pelo método dos quadrados mínimos utilizando o programa computacional²².

Os dados de uréia plasmática foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (PROC GLM) e os efeitos de tratamento foram testados através de contrastes ortogonais, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (Proc UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo teste F.

Para os dados de índice mitótico, os tratamentos foram testados através de estatística não-paramétrica de ordem, com o emprego do teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O efeito do aumento de uréia plasmática sobre uma cultura de linfócitos foi testado através da contagem do número de cromossomos de células em metáfase e da contagem do número de metáfases encontradas a cada 1.000 células (Índice mitótico).

Mesmo havendo aumento ($p < 0,0001$) do nível de uréia no plasma sanguíneo (Tab. 2), o número de cromossomos foi de 54, número normal para a espécie ovina¹²

Tabela 1

Quantidades diárias de ingredientes e nutriente na matéria seca. Pirassununga, 1996.

Ingredientes (g)	Tratamentos		
	A	B	C
Mistura peletizada ^a	650,4	650,4	650,4
Feno de <i>Coast cross</i> (IFN 1-00-716)	534,6	534,6	534,6
Fubá de milho (IFN 4-21-018)	172,4	172,4	172,4
Uréia	-	20	40
Nutrientes			
EM (Mcal/kg)	2,10	2,08	2,07
Proteína bruta (%)	11,9	15,9	19,8
Nitrogênio (%)	1,9	2,5	3,2

^a Composição (% da matéria seca) da mistura peletizada: Feno de *Coast cross* (IFN 1-00-716), 30,0%; farelo de soja (IFN 5-04-604), 7,0%; Fubá de milho (IFN 4-21-018), 61,5%; Suplemento mineral, 1,5%.

Tabela 2

Teores de uréia no plasma (média ± e.p.^a), coeficiente de variação, probabilidades estatísticas, equações de regressão e coeficientes de determinação de machos ovinos com níveis plasmáticos de uréia aumentados. Pirassununga, 1996.

	Tratamento			C.V.(%)	Probabilidade ^b		Equação	R ²
	A	B	C		Linear	Desvio		
Concentração de uréia (mg/dl)	18,3 ± 0,9	34,4 ± 2,2	49,8 ± 1,7	43,56	0,0001	0,1232	Y = 18,39 + 0,31 X	0,75

^aE.p. Erro padrão da média; ^bValores de P para regressão linear e desvios.

Tabela 3

Índice mitótico (± e.p.^a), coeficiente de variação e probabilidade estatística de machos ovinos com níveis plasmáticos de uréia aumentados. Pirassununga, 1996.

Índice mitótico (%)	Tratamentos			C.V. (%)	Probabilidade ^b
	A	B	C		
	4,3 ± 1,5	8,0 ± 1,3	3,6 ± 0,96	63,01	0,062

^aE.p. Erro padrão da média; ^bProbabilidade de Kruskal Wallis.

e o índice mitótico (Tab. 3) não diferiu (P = 0,062) entre os tratamentos.

As concentrações aumentadas de uréia no plasma não provocaram efeitos deletérios sobre os linfócitos destes animais talvez por não terem sido suficientemente altas para se tornarem danosas, pois permaneceram abaixo do amplo

espectro considerado normal para ovinos, isto é, 17 a 42 mg/dl¹⁷ ou 43 to 75 mg/dl^{21,23}.

Oppenheim; Fishbein¹⁹ também verificaram que uréia em nível considerado fisiológico pelos autores, 1 mM (6 mg/dl) na cultura celular, não provocou efeitos danosos sobre culturas de leucócitos humanos.

SUMMARY

The experiment was planned to verify the effects of increasing blood urea levels resulting from increasing urea in the diet on cytogenetic parameters of Santa Ines Brazilian breed rams (*Ovis aries*), aged 13 to 18 months. Eighteen animals were divided into three experimental treatments consisted of: diet A ration with nitrogen levels, according to NRC (1985); diet B - ration with a 133% higher level of nitrogen than diet A; and C- ration with a 166% higher level of nitrogen than diet A. The increase in nitrogen level was obtained by adding 20, 40 g of feed grade urea in treatments B and C, respectively. Blood was collected on a weekly basis to determine urea concentration. Blood was also collected from each animal, 60 days after desired diet urea levels were reached, to obtain a lymphocyte culture in order to count chromosome number and determine mitotic index. Increases in plasma urea level were observed (p < 0.0001), but did not affect the observed traits.

UNITERMS: Urea; Cytogenetics; Chromosomes; Rams.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BUTLER, W.R.; CALAMAN, J.J.; BEAM, S.W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, n.4, p.858-65, 1996.
- 2- CANFIELD, R.W.; SNIFFEN, C.D.; BUTHER, W.R. Effect of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.9, p.2342-9, 1990.
- 3- CARROL, D.J.; BARTON, B.A.; ANDERSON, G.W.; GRINDLE, B.P. Influence of dietary crude protein intake on urea-nitrogen and ammonia concentration of plasma, ruminal and vaginal fluids of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.117, 1987. Supplement 1.
- 4- CHAURASIA, O.P.; SINHA, S.P. Effects of urea mitotic chromosomes of mice and onion. **Cytologia**, v.52, n.4, p.877-82, 1987.
- 5- ELROD, C.C.; AMBURGH, M.; VAN 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, n.3, p.702-6, 1993.
- 6- 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, n.3, p.694-701, 1993.
- 7- FECHHEIMER, N.S. Cytogenetics in animal production. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.5, p.844-53, 1979.
- 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.; GALLIGAN, D.T.; BLANCHARD, T.; REEVES, M. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.12, p.3742-6, 1993.
- 10- GARBERG, P.; AKERBLOM, E.; BOLCSFOLDI, G. Evaluation of a genotoxicity test measuring DNA-strand breaks in mouse lymphoma cells by alkaline unwinding and hydroxyapatite elution. **Mutation Research**, v.203, n.3, p.155-76, 1988.
- 11- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", SP, 1987. 467p.
- 12- HALNAN, C.R.E. (Ed.). **Cytogenetics of animals**. Oxon : C.A.B. Internacional, 1989. 518p.
- 13- HOOK, E.B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90% %, 95% %, and 99% % confidence limits and comments on use. **American Journal of Human Genetics**, v.29, n.1, p.94-7, 1977.
- 14- ISHIDATE JR., M.; ODASHIMA, S. Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens. **Mutation Research**, v.48, n.3-4, p.337-54, 1977.
- 15- JORDAN, E.R.; SWANSON, L.V. Effect of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein, and albumin in the high-producing dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.1, p.58-63, 1979b.
- 16- JORDAN, E.R.; SWANSON, L.V. Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed levels of crude protein. **Journal of Dairy Science**, v.48, n.5, p.1154-8, 1979a.
- 17- KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 3.ed. New York: Academic Press, 1980. 832p.
- 18- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of sheep**. 6.ed. Washington : NRC, 1985. 138p.
- 19- OPPENHEIM, J.J.; FISHBEIN, W. Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds. **Cancer Research**, v.25, n.5, p.980-5, 1965.
- 20- PINHEIRO, L.E.L. **Avaliação dos efeitos da translocação robertsoniana 1/29 sobre a reprodução de bovinos Pitangueiras**. Jaboticabal, 1983. 97p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- 21- ROLLER, M.H.; RIEDEMANN, G.S.; ROMKEMA, G.E.; SWANSON, R.N. Ovine blood chemistry values measured during ammonia toxicosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.6, p.1068-71, 1982.
- 22- SAS INSTITUTE INC. **Sas user's guide: statistics**. 5.ed. Cary : SAS Institute, 1985.
- 23- SMITH, M.L.; LEE, R.; SHEPPARD, S.J.; FARISS, B.L. Reference ovine serum chemistry values. **American Journal Veterinary Research**, v.39, n.2, p.321-2, 1978.
- 24- ZOGNO, M.A.; BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; VISINTIN, J.A. Citogenética animal -algumas modificações na técnica de cultura de linfócitos de sangue periférico. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1., São Paulo, 1995. **Anais**. São Paulo : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. p.87.

Recebido para publicação: 22/03/2000
Aprovado para publicação: 02/02/2001