

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



TESIS

Medición de amoniaco en suero en vacas Holstein alimentadas con urea y urea de lenta liberación y el efecto de la adición de amoniaco en los medios para fecundación *in vitro* en el trópico seco

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

Luis Roberto Camacho González

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Horacio Dávila Ramos

CO-DIRECTOR:

Dr. Miguel Alberto Luque Agúndes

Culiacán, Sinaloa a 25 de Diciembre de 2015

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR EL M.V.Z. LUIS ROBERTO CAMACHO GONZÁLEZ, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA; Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Horacio Dávila Ramos

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Miguel Alberto Luque Agúndes

ASESOR

Dra. Beatriz Isabel Castro Pérez

ASESOR

Dr. Javier Alonso Romo Rubio

ASESOR

Dr. Omar Salvador Acuña Meléndez

Culiacán, Sinaloa a diciembre de 2015

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1 La urea como ingrediente de la dieta para rumiantes.....	12
2.2 Producción de amoníaco en el rumen.....	13
2.3 Concentración de amoníaco en el rumen.....	14
2.4 Absorción de Nitrógeno en rumen y el metabolismo hepático de amoníaco.....	14
2.5 Efectos de la suplementación proteica sobre la respuesta reproductiva.....	16
2.6 El uso de NNP de lenta liberación en bovinos.....	18
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVO.....	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23

Experimento 1: Amoniacó en suero de vacas Holstein alimentadas con urea y urea de lenta liberación en el trópico seco.....	23
5.1 Localización del sitio experimental.....	23
5.2 Animales.....	23
5.3 Tratamientos experimentales.....	23
5.4 Medición de amoniacó en suero.....	24
5.5 Análisis estadístico.....	24
Experimento 2: Efecto de la adición de amoniacó a los medios de cultivo para la producción de embriones <i>in vitro</i>	25
5.6 Localización del sitio experimental.....	25
5.7 Tratamientos experimentales.....	25
5.8 Variables evaluadas.....	25
5.9 Material para producción de embriones <i>in vitro</i>	26
5.10 Análisis estadístico.....	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
VII. CONCLUSIONES.....	33
VIII. LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición nutrimental de la dieta experimental.....	24
2	Efecto de la fuente de nitrógeno de la dieta y tiempo en las concentraciones séricas de NH ₃ en vacas lechera.....	29
3	Efecto del nivel de adición de NH ₃ al medio de cultivo de fecundación <i>in vitro</i> en el desarrollo de embriones bovinos.....	31
4	Efecto del amoniaco en el desarrollo de mórula a blastocito...	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto de la fuente de nitrógeno en la dieta sobre la concentración sérica de NH_3 en vacas lecheras.....	28

RESUMEN

MEDICIÓN NIVELES DE AMONIACO EN SUERO EN VACAS HOLSTEIN ALIMENTADAS CON UREA Y UREA DE LENTA LIBERACIÓN Y EL EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMONIACO EN LOS MEDIOS PARA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN EL TRÓPICO SECO

Luis Roberto Camacho González

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inclusión de dos fuentes de urea en la dieta en el nivel de amoniaco en suero de bovinos, así como observar el efecto de la adición de NH_3 en medios de fecundación *in vitro* se realizaron dos experimentos. Experimento 1; se utilizaron 12 vacas Holstein en un diseño completamente al azar, a las que se les asignó uno de tres tratamientos: 1) Dieta sin urea (T; n= 4); 2) Dieta con 70 g de urea/día (U; n= 4) y 3) Dieta con 120 g de urea de lenta liberación/día (ULL; n= 4). Se obtuvieron muestras de sangre durante 3 días y el suero se congeló a -15°C para su posterior análisis. Experimento 2; se utilizaron ovarios obtenidos de rastro y en el laboratorio se añadió NH_3 en diferentes niveles (0, 40, 140 y 240 $\mu\text{mol/L}$) para los medios de FIV en un diseño completamente al azar. Los datos de NH_3 en suero fueron analizados con ANDEVA multivariante y para las variables de FIV se utilizó ji-cuadrada. El tratamiento no modificó ($P < 0.05$) el nivel de NH_3 en el suero, observándose niveles de 140, 139 y 144 para los tratamientos T, U y ULL, respectivamente. Los resultados de FIV presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$), siendo los tratamientos 140 y 240 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 los de menor tasa de división, la proporción de mórulas se disminuyó en los tratamientos con amoniaco ($P < 0.05$), y la proporción de blastocitos fue mayor en los tratamientos 0 y 40 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 ($P < 0.05$). Se concluye que niveles de urea (U 70 g/d y ULL 120 g/d) podrían utilizarse en las dietas ya que no presentaron diferencia en NH_3 en

suero con la dieta testigo, sin embargo, los resultados de FIV indican que niveles mayores de 40 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 reduce el desarrollo embrionario.

Palabras Clave: Niveles de amoniaco, Urea, Blastocito

ABSTRACT

AMMONIA SERUM IN HOLSTEIN COWS FED WITH UREA AND SLOW RELEASE UREA AND ITS EFFECT OF THE ADDITION OF AMMONIA IN THE *In Vitro* FERTILIZATION MEDIA IN THE DRY TROPICS

Luis Roberto Camacho González

With the objective to evaluate the effect of including two sources of dietary urea in ammonia levels in bovine serum and observe the effect of the addition of NH_3 in IVF media two experiments were performed. Experiment 1; 12 Holstein cows were used in a completely randomized design, which were assigned to one of three treatments: 1) Diet without urea (T; n = 4); 2) Diet with 70 g of urea/day (U; n = 4) and 3) Diet with 120 g of slow release urea/day (ULL; n = 4). Blood samples were obtained for 3 days and serum was frozen at -15°C for later analysis. Experiment 2; ovaries obtained from an abattoir were used and in the laboratory added NH_3 at different levels (0, 40, 140 and 240 $\mu\text{mol/L}$) for IVF media in a completely randomized design. NH_3 levels were analyzed with multivariate ANOVA and IVF variables used chi-square. The treatment did not change ($P < 0.05$) NH_3 levels in the serum, observed levels of 140, 139 and 144 for T, U and ULL respectively treatments. IVF results showed significant differences ($P < 0.05$), with treatments 140 and 240 $\mu\text{mol/L}$ of NH_3 the lower cleavage rate, the proportion of morula were decreased by ammonia treatment ($P < 0.05$), and blastocyst proportion was higher in treatments 0 and 40 $\mu\text{mol/L}$ of NH_3 ($P < 0.05$). It is concluded that levels of urea (U 70 g/d and ULL 120 g/d) could be used in diets as it showed no difference in NH_3 serum with the control diet, however, IVF results indicate that higher levels of 40 $\mu\text{mol/L}$ NH_3 reduces embryonic development.

Keywords: ammonia levels, urea, blastocyst

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos no son iguales en su capacidad de apoyo a las funciones de mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia (Van Soest, 1994). Energía y proteína son a menudo los factores más limitantes para rumiantes y han recibido la mayor atención en los sistemas de evaluación (Mapato *et al.*, 2010). El nivel y tipo de proteína en la ración afecta directamente la fermentación y el aprovechamiento de fibra (Fradan, 1995). Las Proteínas, además de proporcionar aminoácidos, también es una fuente de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana (Nocek y Russell, 1988). El uso de urea como fuente de nitrógeno no proteico (NNP) para elevar el contenido potencial de proteína cruda en la dieta de los rumiantes **ha sido ampliamente utilizada**, debido a su bajo costo en comparación con otra proteína tales como la pasta de soya, con una alta degradabilidad ruminal (Xin *et al.*, 2010). Como alternativa para suplir la proteína de la dieta se usa compuestos nitrogenados como la urea, la cual, es degradada en el rumen para liberar amoníaco (NH_3), este a su vez, es usado por los microorganismos del rumen para producir aminoácidos. Cuando la urea libera NH_3 más rápido de lo que puede ser convertido en proteína microbiana, el exceso de NH_3 es absorbido a través de las paredes del rumen, y esta pueda llegar a causar una intoxicación (Vélez, 2002). Los efectos de la ingesta de proteínas en la reproducción de ganado se han investigado desde la década de 1970 (Sonderegger y Schurch, 1977; Jordan y Swanson, 1979) y las mediciones en sangre de urea se siguen utilizando como variable parcial para evaluar la relación entre el estado de los procesos metabólicos y reproductivos de la especie bovina (Beltman *et al.*, 2010; Kaufmann *et al.*, 2010). La alta ingesta de proteína o formas más degradables de proteína en la dieta resulta en concentraciones elevadas de urea en sangre, y se han asociado a alteraciones en la fertilidad en el ganado no superovulado (Butler, 1998). Del mismo modo, vacas lactantes superovuladas alimentadas con excesiva proteína degradable en rumen o con altas concentraciones séricas de urea, mostraron una reducción en el porcentaje de

ovocitos fecundados y embriones transferibles (Blanchard *et al.*, 1990; Leroy *et al.*, 2005; Rhoads *et al.*, 2006). Las concentraciones excesivas de amoníaco y urea en la fecundación *in vitro* (FIV) se han asociado con la interrupción del desarrollo embrionario (Ocon y Hansen, 2003; Sinclair *et al.*, 2000). Lo cual sugiere que el aumento de la concentración de amoníaco y urea influye en la viabilidad de los embriones, alterando el tracto reproductivo y los entornos foliculares y oviductales (Sinclair *et al.*, 2000). El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la inclusión de dos diferentes fuentes de nitrógeno no proteico en la dieta, urea convencional y urea de lenta liberación, en los niveles séricos de amoníaco en bovinos y evaluar el efecto de la adición de NH_3 en el desarrollo embrionario *in vitro*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La urea como ingrediente de la dieta para rumiantes

A finales de los años 30 y principios de los 40 del pasado siglo, resultados de investigaciones con fuentes de nitrógeno no proteicos (NNP) en la nutrición de rumiantes sugirieron su inclusión en la dieta. En este sentido, Hart *et al.* (1939) establecieron que las fuentes de NNP podían satisfacer las necesidades proteicas gracias a su conversión en proteína por los microorganismos del rumen. Más tarde se descubrió que la proteína microbiana sintetizada tenía un valor biológico similar al de la proteína vegetal (Loosli *et al.*, 1949). Posteriormente, Bergen *et al.* (1967) demostraron que la masa microbiana presentaba el perfil de aminoácidos esenciales, independientemente de la composición de aminoácidos de la dieta (proteína verdadera o NNP); sin embargo, la principal limitante para la inclusión de urea en las dietas, era la elevada velocidad de degradación ruminal y la consiguiente liberación brusca de amoníaco. Más adelante se observó que la inclusión de urea a la dieta en cantidades superiores a 2.5-3% reducía su palatabilidad y provocaba problemas intoxicación por la alta concentración sérica de amoníaco (Helmer y Bartley, 1971). Con base en estos resultados, a partir de la década de 1940, la utilización de la urea en la alimentación de los rumiantes se extendió debido a la escasez de materias primas proteicas como consecuencia de la II Guerra Mundial (Fonnesbeck *et al.*, 1975).

Para entonces la sustitución de la proteína vegetal por NNP se había propuesto como una manera de reducir la competencia entre los seres humanos y animales por los alimentos de origen proteico. A partir de la década de los 70's algunos investigadores (Bartley, 1976; Huber, 1976; Conrad, 1977), empezaron a trabajar con otro tipo de urea modificada como: Starea, Dehy-100 y Pro-Sil, respectivamente, con los que se intentaba mejorar la eficiencia de utilización del NNP mediante diferentes procesados, posteriormente con Biuret, Starea, estudiaron el fosfato de urea, urea con formaldehído, revestimientos a base de aceite, y urea tratada recubierta de polímero (Taylor-Edwards *et al.*, 2009). En la

actualidad se dispone de fuentes de NNP de liberación lenta; ésto se ha logrado mediante el uso de cloruro de calcio y sulfato de calcio que funcionan como delimitadores para controlar la velocidad de liberación de NH_3 a partir de urea, posteriormente se utilizó un producto de mezcla de sulfato de calcio-urea, el cual reduce las concentraciones ruminales de NH_3 , así como mejorar la población microbiana en comparación con urea convencional (Cherdthong *et al.*, 2010).

2.2. Producción de amoníaco en el rumen

El amoníaco es generado dentro de la célula microbiana por desaminación de aminoácidos o como resultado de hidrólisis de la urea; la saliva es un intermediario en la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Huber y Kung, 1981). La conversión de proteínas de la dieta a amoníaco se lleva a cabo por varios microorganismos proteolíticos. Mientras que algunas especies de bacterias tienen la capacidad de incorporar aminoácidos y péptidos directamente en proteína microbiana, alrededor de 40 a 70% del N bacteriano es obtenido a través de amoníaco ruminal (Firkins *et al.*, 2007). Las bacterias anaerobias facultativas de la pared del rumen parecen ser los más importantes productores de ureasa *in vivo*, la descamación de las células epiteliales en los contenidos del rumen y la pared bacteriana, parecen ser suficientes para conferir la actividad de fluido urealítico (Wallace *et al.*, 1979). Sin embargo, las poblaciones de bacterias estrictamente anaerobias presentes en mayor número en la población del rumen que las anaerobias facultativas de la pared, pero con menor actividad de producción de ureasa, pueden también jugar un papel importante en la conversión ruminal de la urea en amoníaco. Se ha especulado que los microorganismos de la pared harían lo más importante en la hidrólisis de la urea del rumen que fluye en la sangre, mientras microorganismos estrictamente anaerobios actuarían principalmente en la urea de alimentos y origen salivar. (Hobson y Wallace, 1982).

2.3. Concentración de amoníaco en el rumen

La concentración de amoníaco en el rumen depende del catabolismo de las proteínas, péptidos, aminoácidos y NNP de origen endógeno; además del anabolismo microbiano para la síntesis de proteínas y aminoácidos a partir de amoníaco, el cual es muy variable. La concentración óptima en el rumen se define como la más baja concentración requerida para no deprimir la síntesis de proteína microbiana y degradabilidad ruminal de la materia orgánica, sobre todo los carbohidratos (Martínez, 2009). Satter y Slyter (1974); demostraron *in vitro* que si la concentración de amoníaco está por encima de 5 mg/dl ningún suplemento adicional que genere aumento de NNP debe suministrarse, ya que se daría una acumulación de amoníaco intraruminal sin aumentar el crecimiento microbiano. Satter y Roffler (1975), sugirieron la inclusión de NNP sólo en dietas con contenido de proteínas inferior al 13%, que contengan una alta disponibilidad de energía fermentable en el rumen.

2.4. Absorción de nitrógeno en rumen y el metabolismo hepático de amoníaco

El amoníaco producido en el rumen y no incorporado en la proteína microbiana es absorbido a través de la pared ruminal; la forma no protonada de **NH₃** es lipófilo, y se absorbe por difusión simple de manera lineal cuando el pH ruminal está por encima de siete; en un pH ruminal de 6.5 o menos. El amoníaco se absorbe predominantemente en su forma protonada (NH₄⁺), probablemente a través de los canales de potasio (Abdoun *et al.*, 2006).

Gustafsson y Palmquist (1993), observaron que la concentración máxima de urea y nitrógeno ureico plasmático (NUP), en vacas lecheras alimentadas una vez al día con una dieta conteniendo entre 17 y 18% de proteína, se dio entre 1.5 y 2 horas después del pico de amoníaco en el rumen, alrededor de 3 a 4 horas después de la alimentación. Se ha sugerido que la tasa máxima de síntesis microbiana se produce a concentraciones de N amoniacal entre 5 y 8 mg/dl (Satter y Slyter 1974). Sin embargo, Leng y Nolan (1984) propusieron que el valor de NH₃

puede ser entre 15-20 mg/dl, dependiendo de la dieta. La alta concentración de NH_3 es necesaria para el crecimiento celular máximo, por lo cual se sugiere que los microorganismos del rumen probablemente utilicen mecanismos para la incorporación de NH_3 de igual manera que los microbios del suelo, las cuales asimilan NH_3 por la enzima glutamato deshidrogenasa. Sin embargo, las bacterias cultivadas bajo concentraciones bajas de NH_3 , fijan éste en un proceso de dos etapas que implica la glutamina sintetasa y glutamato sintasa. Estas reacciones implican la conversión de glutamato en glutamina y luego una transferencia reductora de la amida-N de glutamina a 2-oxoglutarato y este paso requiere ATP (Nelson y Cox, 2011).

El hígado tiene un papel muy importante en la eliminación de NH_3 potencialmente tóxico de la sangre de rumiantes, así como en otros mamíferos. Las enzimas del ciclo de la ornitina y enzimas que catalizan reacciones de transaminación se orientan estructuralmente en la mitocondria y citosol de las células hepáticas periportal y perivenosas, para formar la urea que se absorbe en el intestino y para utilizar la síntesis de glutamina como otra vía para eliminar esencialmente todo el NH_3 a partir de sangre portal hepática. Las células periportales eliminan NH_3 por la vena porta hepática y utilizan su maquinaria enzimática para sintetizar urea. La especialidad de las células perivenosas es la producción de glutamina a través de la glutamina sintetasa, proporcionando así otra oportunidad de eliminar NH_3 de la circulación antes de que la sangre entre en las venas hepáticas y posteriormente la circulación general. Este sistema de eliminación de NH_3 en dos etapas se integra con otros sistemas, incluyendo la gluconeogénesis, la regulación del equilibrio ácido-base, y un servicio de transporte inter-órganos para obtener el mejor control metabólico de sustrato y producto (Leng y Nolan, 1984).

El ciclo de la urea se inicia en la mitocondria de las células hepáticas en dos reacciones. En la primera la enzima carbamoil fosfato sintetasa (CPS-1) condensa el dióxido de carbono con amoníaco para formar carbamoil fosfato gastando 2 moles de ATP. Posteriormente, la carbamoil fosfato se une a la acción de la ornitina transcarbamilasa (OTC) formando citrulina. En el citosol de la célula la

citruilina, el aspartato y 1 mol de ATP por acción de la enzima arginosuccinatosintetasa (ASS) forman arginosuccinato. El arginosuccinato se rompe por argininosuccinato liasa (ASL) en arginina y fumarato. La hidratación de urea y ornitina forma arginina por la acción de la arginasa (ARG-1). El fumarato se utiliza en el ciclo de Krebs, para la generación de dos moles de ATP, lo que resulta en déficit de energía de 1 mol de ATP. El ciclo de la urea se puede cambiar mediante ajustes de enzimas en el hígado, (regulación lenta) cuando se somete a altas concentraciones de amoníaco. La activación alostérica de CPS-1 por el N-acetil glutamato (NAG) es crucial para la regulación rápida de ciclo de la urea, su síntesis en el hígado depende de la concentración de acetil-CoA reductasa y N-acetilglutamato sintetasa mediada por glutamato que se activa por la acumulación de arginina (Nelson y Cox, 2011).

En la intoxicación por amoníaco se produce desorden en el metabolismo de los tejidos, y la concentración de amoníaco intracelular puede ser de 10 a 50 % mayor que la concentración de plasma. La capacidad del hígado para sintetizar urea a partir de amoníaco se supera cuando el contenido de amoníaco en el rumen excede 80 mg/dl y los signos de toxicidad del amoníaco en el sistema nervioso central (SNC) ocurren debido al agotamiento de α -cetoglutarato interrumpiendo el metabolismo energético y la síntesis de ATP (Visek, 1984).

2.5. Efectos de la suplementación proteica sobre la respuesta reproductiva

Los efectos de la ingesta de proteínas en la reproducción de ganado se han investigado desde la década de 1970 (Sonderregger y Schurch, 1977; Jordan y Swanson, 1979) y las mediciones en sangre de urea se siguen utilizando como variable parcial para evaluar la relación entre el estado de los procesos metabólicos y reproductivos de la especie bovina (Beltman *et al.*, 2010; Kaufmann *et al.*, 2010). Estudios previos, indican una reducción en la tasa de fertilización de ovocitos provenientes de vacas superovuladas alimentadas con dietas con excesiva proteína altamente degradable en el rumen (Blanchard *et al.*, 1990), y reducción de los embriones transferibles de vacas con altas concentraciones séricas de urea (Leroy *et al.*, 2005). Por su parte, Dawuda *et al.* (2002), sugirieron

que el número de embriones viables es afectado negativamente en vacas suplementadas con 250 g por día de nitrógeno rápidamente degradable (NRD), cuando el suplemento se administra desde el momento de la inseminación hasta la recolección de embriones y no cuando se realiza 10 días antes de la inseminación, postulando que las vacas superovuladas pueden ajustarse a los efectos tóxicos de NRD.

Las concentraciones excesivas de amoníaco y urea *in vitro* se han asociado con fallas en el desarrollo embrionario (Ocon y Hansen, 2003; Sinclair *et al.*, 2000). Aunque no está claro si las alteraciones observadas *in vitro* reflejan las respuestas de ovocitos y embriones *in vivo*. Se ha sugerido que el aumento de la concentración sérica de amoníaco y urea tiene influencia en la viabilidad de los embriones, alterando el tracto reproductivo y los entornos foliculares y oviductales (Sinclair *et al.*, 2000).

Uno de los efectos persistentes de las dietas con proteína excesiva es la reducción del pH en lumen uterino durante la primera fase lútea (Butler, 1998), que se asoció con una reducción de la tasa de concepción. De manera similar, la **infusión** de urea vía intravenosa redujo el pH luminal uterino en vacas lecheras (Rhoads *et al.*, 2004). Algunos autores mencionan que la secreción alterada de las células endometriales expuestas a altas concentraciones de urea y amoníaco puede reducir el pH del útero, lo que puede afectar el desarrollo del embrión y la fertilidad (Ocon y Hansen, 2003; Butler, 1998).

Ocon y Hansen (2003), observaron que la maduración *in vitro* de los ovocitos en presencia de concentraciones crecientes de urea (0, 14, 21, y 28 mg/dl) no afectó a la eclosión posterior de los cigotos, pero parecía tener un efecto negativo sobre la proporción de blastocistos, mientras que la incubación de cigotos con las mismas concentraciones de urea no tuvo efecto sobre el desarrollo del embrión. Sin embargo, la reducción del pH del medio de cultivo similar al observado en los úteros de vacas alimentadas con exceso de proteína, disminuyó el desarrollo del embrión a la etapa de blastocito.

Los resultados de los estudios en producción de embriones *in vivo* en las vacas lecheras no han sido consistentes con los estudios realizados *in vitro*.

Cuando se súper estimularon vacas y recibieron dietas con concentraciones de proteína y proteína degradable en rumen, mucho más altas que las recomendadas para las vacas lecheras altas productoras en producción, no se observaron efectos negativos sobre la calidad de los embriones y la viabilidad (García-Bojalil *et al.*, 1994). Del mismo modo, el exceso de proteínas (alimentado en forma de urea) no afectó a la calidad embrionaria en vacas lactantes superovuladas cuando se alimentaron con dietas que difieren en la degradabilidad de la proteína, la ración con mayor contenido de proteína degradable en rumen tendía a reducir la proporción de embriones transferibles, a pesar de que el número de embriones transferibles no se vio afectada (Rhoads *et al.*, 2006).

Las dietas altas en proteína producen concentraciones elevadas de nitrógeno ureico en plasma y en las secreciones uterinas (Elrod y Butler, 1993) y la alimentación con dietas con grandes cantidades de urea y amoníaco incrementan el crecimiento del folículo dominante de la segunda ola, pero baja la capacidad de división de los folículos chicos y medianos cuando son fecundados en cultivo *in vitro*, y además baja la capacidad de división de embriones formados de ovocitos provenientes de folículos de tamaño mediano (4 a 8 mm) en el desarrollo posterior en cultivo hasta la etapa de blastocito (Sinclair *et al.*, 2000).

2.6 El uso de NNP de lenta liberación en bovinos

Una solución alternativa podría ser modificar la urea para controlar su tasa de liberación de modo que la liberación de NH_3 sea más cercano a la digestión de carbohidratos (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2010). Compuestos de urea de lenta liberación, que se han usado en la alimentación de los rumiantes, incluyen: biuret, starea, fosfato de urea, revestimientos a base de aceite, urea tratada con formaldehído y urea recubierta con polímero (Taylor -Edwards *et al.*, 2009). Estos compuestos no han sido tan ventajosos como la urea, porque una parte sustancial del NNP contenido en ellos puede dejar el rumen sin ser convertido en NH_3 , y como consecuencia disminuir su tasa de incorporación a la proteína microbiana (Galo *et al.*, 2003; Firkins *et al.*, 2007). Las propiedades de liberación lenta se han logrado mediante el uso de la urea con un delimitador para sustratos como cloruro

de calcio, para controlar la velocidad de liberación de NH₃ (Huntington *et al.*, 2006; Golombeski *et al.*, 2006); También el sulfato de calcio-urea se ha utilizado en estudios *in vitro* para reducir las concentraciones de NH₃ ruminal, así como mejorar la población microbiana en comparación con urea convencional de grado alimenticio (Cherdthong *et al.*, 2010).

A partir de 2005 laboratorios Alltech (Alltech Inc, Nicholasville, EE.UU.) lanzó al mercado un producto con urea de lenta liberación y baja degradabilidad ruminal, Optigen®. En éste, la protección de la urea se produce por una barrera física de un polímero inerte en el tracto gastrointestinal. La liberación de urea soluble en agua se produce a través de poros en la capa de polímero que recubre a la urea, que es de espesor variable entre los gránulos (Siciliano-Jones y Downer, 2005). Se ha observado que la degradabilidad *in situ* de nitrógeno en Optigen® es similar a la degradabilidad N de la pasta de soya (Akay *et al.*, 2004); el estudio sugiere que en las primeras tres horas de incubación ruminal el NNP de lenta liberación tenía menor degradación que el N que la pasta de soya, pero la tasa de desaparición fue inferior entre tres y dieciséis horas. La urea convencional mostró una rápida degradación en el rumen, siendo totalmente degradada con una hora de incubación. Akay *et al.* (2004), al adicionar 0.66% de Optigen® a la dieta, en un estudio en el que se utilizaron fermentadores continuos, se observó que la inclusión de la urea de lenta liberación aumentó en 16.6 % la digestibilidad de la FDA, 6.8 % la FDN y 8 % la digestibilidad de la materia orgánica, lo que se relacionó con un aumento del 6 % de la síntesis microbiana.

Galo *et al.* (2003); evaluaron la sustitución de pasta de soya y urea por maíz y Optigen® desde 0 hasta 0.77 % de inclusión de esta fuente de NNP, en dos dietas con contenido de proteína de 16 y 18 %, la dieta testigo con pasta de soya y urea contenía 18 % de proteína cruda. No se encontraron efectos del tratamiento sobre el consumo, la grasa y proteína en la leche. La producción de leche fue mayor en los tratamientos con 18 % de PC. La producción de leche por unidad de proteína consumida fue de 0.5 kg mayor en el tratamiento con 16% de PC. La excreción de derivados de purina en la orina y el balance de N no difirió entre tratamientos.

Siciliano-Jones y Downer (2005), en un estudio para evaluar la seguridad del uso de Optigen® simulando una sobredosis de NNP, observaron que el consumo de 675 y 788 g/d, disminuyó en 25% el consumo de materia seca, y se presentaron signos de intoxicación por amoníaco, como tetania, dificultad respiratoria, hinchazón, salivación excesiva, anorexia o letargo.

Cherdthong et al. (2010) reportaron un incremento en la leche total y un 3.5% de grasa en vacas lecheras alimentadas con urea de lenta liberación (6.7 % del concentrado) en base de urea-calcio en comparación con urea convencional. Xin et al. (2010) informaron que, aunque la urea de lenta liberación (0.60 % de la dieta integral) no aumentó la producción de leche, condujo a un aumento en el porcentaje de proteína de la leche y una reducción de la urea en leche en comparación con la urea. Introza et al. (2010) evaluaron 16 hatos lecheros en los cuales utilizaron dietas con Optigen® (114 g/d en promedio) en comparación con una dieta testigo, encontrando una mejora en la producción en las vacas que consumieron la dieta con Optigen®.

III. HIPÓTESIS

La inclusión de urea de lenta liberación a la dieta como sustitución parcial de proteína vegetal no modifica el nivel sérico de amoníaco en vacas lecheras.

La adición de 140 $\mu\text{mol/L}$ de amoníaco a medio de cultivo para fecundación *in vitro* no modifica el desarrollo embrionario.

IV. OBJETIVO

Objetivo general:

Determinar el efecto de la inclusión de nitrógeno no proteico de lenta liberación como sustituto parcial de proteína vegetal en la dieta de vacas lecheras en el nivel sérico de amoniaco, así como la adición de amoniaco a medios de cultivo de fecundación *in vitro* sobre el desarrollo embrionario.

Objetivos específicos

Determinar el efecto de la inclusión de nitrógeno no proteico en la dieta a partir de urea convencional y urea de lenta liberación en la concentración sérica de amoniaco en vacas lecheras.

Determinar el efecto de la adición de diferentes niveles de concentración de amoniaco a medios de cultivo de fecundación *in vitro* sobre tasa de división embrionaria.

Determinar el efecto de la adición de diferentes niveles de concentración de amoniaco a medios de cultivo de fecundación *in vitro* sobre el número de mórulas.

Determinar el efecto de la adición de diferentes niveles de concentración de amoniaco a medios de cultivo de fecundación *in vitro* sobre el número de blastocitos.

Solo medio de fecundación???

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1: Efecto de la inclusión de nitrógeno no proteico de lenta liberación como sustituto parcial de proteína vegetal en la dieta de vacas lecheras en el nivel sérico de amoníaco.

5.1. Localización del sitio experimental

El experimento se realizó en el establo lechero “Rancho Peñascos” ubicado en El Salado, municipio de Culiacán, Sinaloa, México, el cual se encuentra 24° 30' latitud norte y 107° 09' longitud oeste con una elevación de 90 m.s.n.m. Con temperatura máxima de 45°C y mínima de 12°C y una precipitación pluvial promedio anual de 614 mm (INEGI, 2014).

5.2. Animales

Se utilizaron 12 vacas de la raza Holstein con un peso promedio de 400 ± 50 kg, y una condición corporal de 2.5 en la escala de 1 – 5 (Lowman *et al.*, 1976) con más de 45 días postparto, en un diseño experimental completamente al azar, a las que se les asignó uno de tres tratamientos. Las vacas tuvieron un periodo de adaptación a la dieta de 20 días, durante el cual la urea se adicionó gradualmente hasta llegar a la inclusión deseada. Recibieron alimento tres veces al día, en una proporción 60-40% de forraje (ensilado de Sudán [29.8 % MS, 10.8 % PC]) y alimento concentrado (cuadro 1), respectivamente.

5.3. Tratamientos experimentales

Tratamiento 1: Testigo; dieta a base de ensilado de Sudán y concentrado (T; n = 4); Tratamiento 2: Dieta similar al testigo más la adición de 70 g/d de urea convencional al alimento concentrado (U; n = 4); Tratamiento 3: Dieta similar al testigo más la adición de 120 g/d de urea de lenta liberación a partir de Optigen II® al alimento concentrado (ULL; n = 4).

5.4. Medición de amoniaco en suero

Las mediciones se hicieron a partir de muestras de sangre colectadas en tubos vacutainer sin anticoagulante, dos h después de consumido el alimento, durante tres días, las que fueron transportadas al laboratorio para ser centrifugadas a 6000 rpm por 20 min, para después colocar el suero en tubos eppendorf y congelarse a -15°C. La determinación de la concentración sérica de amoniaco se realizó mediante la técnica de química seca para la detección de NH₃, utilizando el equipo Vet test 8008.

Cuadro1. Composición de concentrados de las dietas

Ingredientes (kg/t)	Tratamientos		
	T	U	ULL
Maíz molido	580	550	570
Pasta de soya	120	65	24
DDGs	160	138	95
Salvado de trigo	80	160	200
Urea ¹	0	7	0
Optigen II ^{®2}	0	0	12
Melaza	60	80	99
	Aporte nutrimental		
MS %	87.5	87.6	87.3
PC %	18	18	17
ENI ³ Mcal/kg MS	2.4	2.3	2.2

1 Urea (46 % N)

2 Optigen (41 % N)

3 ENI= Energía neta de lactación.

5.5. Análisis estadístico

A los datos de concentración sérica de amoniaco se les aplicó un ANDEVA multivariante ($p < 0.05$) para un diseño completamente al azar y además se aplicó el análisis como medidas repetidas, en donde la co-variable fue el tiempo de

muestreo. La comparación de medias de los valores de NH₃ se realizó con la prueba de Tukey. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS® 9.2, 2003.

El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general de la característica estudiada

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error experimental o aleatorio

Experimento 2: Efecto de la adición de amoníaco a medios de cultivo de fecundación *in vitro* sobre el desarrollo embrionario.

5.6. Localización del sitio experimental

El segundo experimento se llevó a cabo en el establecimiento Rastros y Frigoríficos de Culiacán (TIF 426), la planta está ubicada en el municipio de Culiacán, Sinaloa (107°27'46" LO y 24°43'14" LN; INEGI, 2011) y en el Laboratorio Embrio Tecnología, también ubicado en la ciudad del Culiacán

5.7. Tratamientos experimentales

Tratamiento1: Testigo; medios para fecundación *in vitro* sin NH₃; Tratamiento 2: tratamiento testigo más la adición 40 µmol/L de NH₃; Tratamiento 3: tratamiento testigo más la adición 140 µmol/L de NH₃ y tratamiento 4: tratamiento testigo más la adición 240 µmol/L de NH₃.

5.8. Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron: tasa de división embrionaria a las 72 h después de la fecundación, número de mórulas al día 5 y de blastocitos al día 7.

5.9. Material para producción de embriones *in vitro*

La fecundación de embriones *in vitro* se realizó como describe Ocon y Hansen (2003) y el protocolo en línea del departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Florida con el Ph.D. Peter J. Hansen utilizando ovocitos recuperados de ovarios obtenidos en rastro. (http://animal.ifas.ufl.edu/hansen/ivf_protocol.shtml).

Los ovocitos recolectados fueron lavados en un medio de recolección de ovocitos (TCM 199 con sales de Hank sin rojo fenol, suplementado con 2% suero bovino [con 2 U/ml de heparina], 1 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina-G, y 0,1 mg/ml de estreptomicina). Los complejos cumulus-ovocito (COC) fueron madurados por el cultivo en microgotas de 50 μ l de medio de maduración de ovocito (TCM 199 con sales de Earle suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 mg/ml de gentamicina, 20 g/ml de FSH, 2 g/ml de 17 β -estradiol, 22 mg/ml de piruvato de sodio, y 1 mM de glutamina), durante 21 a 24 h a 38.5 °C y 5% de CO₂ en aire humidificado. Después de la maduración, los COC se lavaron y se colocaron en cuatro placas de pocillos de 600 μ l de FIV-TALP (Parrish *et al.*, 1986), suplementado con 25 μ l de una mezcla de penicilamina 0.5 mM, hipotaurina 0.25 mM, y 25 M epinefrina en 0.9% (peso/volumen) de NaCl.

Los ovocitos fueron fecundados con $\sim 1 \times 10^6$ espermatozoides por pocillo, seleccionados mediante la técnica de Percoll (Parrish *et al.*, 1986). Después de la incubación durante 8 a 10 horas a 38.5 °C y 5% de CO₂, los cigotos putativos fueron desprovistas de las células del cumulus mediante agitación con vórtex y mediante incubación en 300 g/mL de hialuronidasa en Hepes-TALP. Los embriones se cultivaron en fluido oviductal sintético modificado (SOF modificado). Modificado por la adición de 3 mg de albúmina/ml de suero fetal bovino (libre de ácidos grasos), 50 μ g/ml de gentamicina, solución de AA esencial y de AA no esencial. Para el cultivo de embriones, los cigotos putativos se colocaron en gotas de SOF modificado a 38.5°C, 5 % CO₂ y 5 % de O₂ en aire humidificado, el cultivo fue desarrollado en gotas de 23 μ l y cada una contenía de 10-20 embriones por gota. Cuando se le añade el NH₃

5.10. Análisis estadístico

Los datos de tasa de división embrionaria, proporción de mórulas y proporción de blastocitos fueron analizado por Ji-cuadrada ($p < 0.05$; Steel y Torrie, 1981), en un modelo completamente al azar utilizando el programa estadístico SAS® 9.2, 2003.

El modelo matemático utilizado fue es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general de la característica estudiada

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error experimental o aleatorio

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Los resultados del análisis de la concentración sérica de NH_3 se muestran en el Cuadro 2.1 y Figura 1.

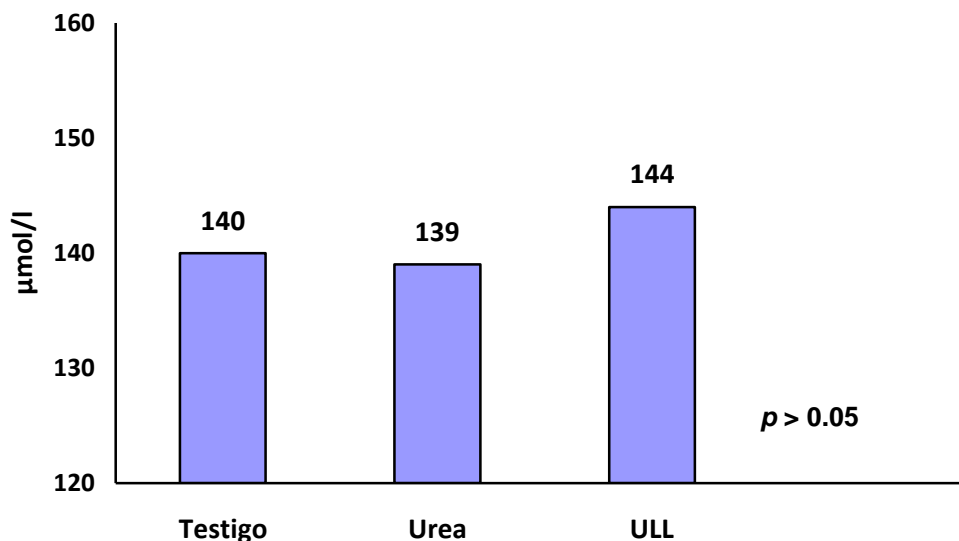


Figura 1. Efecto de la fuente de nitrógeno en la dieta sobre la concentración sérica de NH_3 en vacas lecheras.

La concentración sérica de NH_3 se incrementó ($P < 0.05$), en el día uno en las vacas que consumieron 120 g/d de ULL el día, en las que se observó un nivel plasmático de 143 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 , superior a los niveles de 133 y 131 $\mu\text{mol/L}$ obtenido en las dietas con urea convencional y tratamiento testigo, respectivamente; sin embargo, en el día 2 y 3 la concentración sérica de NH_3 no fue modificada ($p > 0.05$) por el tratamiento. Los niveles plasmáticos de NH_3 no fueron diferentes entre los tratamientos, al analizar la respuesta promedio en los tres días de muestreo.

Cuadro 2. Efecto de la fuente de nitrógeno de la dieta y tiempo en las concentraciones séricas de NH₃ en vacas lecheras.

Tratamiento	Días		
	1	2	3
Testigo	131 ^b	145 ^a	144 ^a
Urea	133 ^b	140 ^a	142 ^a
ULL	143 ^a	150 ^a	140 ^a

Valores de NH₃ están en µmol/L

Valores con literales diferentes entre columnas indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan a lo observado por Sinclair *et al.* (2011) quienes al comparar una dieta testigo con dietas con remplazo parcial de proteína vegetal a partir de urea convencional y ULL, no encontraron diferencia en la concentración sérica de NH₃. Sinclair *et al.* (2000) mencionan que la concentración de NH₃ en los fluidos reproductivos tiene alta relación con la concentración en suero. De acuerdo a varios autores (Sinclair *et al.*, 2000; Lane y Gardner, 2003; Hammon *et al.*, 2005; Rhoads *et al.*, 2006), los resultados encontrados en el presente estudio (140 µmol/L) son niveles moderados de NH₃ en suero; lo que dio pie para la realización de un segundo experimento, con el objetivo de determinar si los niveles de NH₃ observados en plasma afectaban el desarrollo embrionario en medios de cultivo de fecundación *in vitro*.

Los resultados del experimento 2 se muestran en el Cuadro 3. Los niveles de adición de NH₃ al medio de cultivo para fecundación *in vitro* modificó ($p < 0.05$) la respuesta del embrión en cada una de las etapas de desarrollo. Los niveles de adición de 140 y 240 µmol/L de NH₃ al medio de cultivo tuvieron las más baja ($p < 0.05$) proporción, 63.7 y 54.1 %, respectivamente, de embriones con división celular, en relación con las tasas de 76 y 76.4 observadas para los niveles de adición de 0 y 40 µmol/L de NH₃; sin embargo, la proporción de ovocitos que

llegaron a etapa de mórulas fue disminuida ($p < 0.05$) por la adición de NH_3 y la proporción de ovocitos que llegaron a la etapa de blastocitos fue mayor en el medio de cultivo que no se le agregó NH_3 (40 vs. 33.3, 27.4 y 12 %), observándose una disminución en esta variable en la medida que se incrementó el nivel de adición de NH_3 al medio de cultivo. Al analizar la cantidad de mórulas que llegaron al estado de blastocito, se observó una mejor respuesta en esta variable en los medios de cultivo adicionados con 40 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 , con una proporción de 76%, en tanto que niveles de adición de 0 y 140 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 tuvieron un efecto similar (59 y 56 %, respectivamente) y la menor ($p < 0.05$) tasa (27 %) se observó con niveles de 240 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 .

Hammon *et al.* (2000) usando fecundación *in vitro*, observó que la exposición de embriones a concentraciones de 88 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 resulta en un bajo desarrollo durante la etapa de blastocito, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde concentraciones por arriba de 40 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 en el medio de cultivo de fecundación *in vitro* afectaron el desarrollo del embrión de la etapa de mórula a la etapa de blastocito. Por otra parte, Lane y Gardner (2003), encontraron que el NH_3 a concentraciones de 75 $\mu\text{mol/L}$, redujo el número de blastocitos por fecundación *in vitro* en embriones de ratón. Sin embargo, Hammon *et al.* (2000) para la etapa de mórula, los mejores resultados se observaron en los medios que contenían 88-132 $\mu\text{mol/L}$ de NH_3 , lo cual en los resultados obtenidos en el presente estudio no sucedió, ya que los mejores resultados se encontraron en el testigo para el caso de la producción final de embriones; sin embargo, en el presente estudio se observa un cambio, donde la proporción de mórulas que llegaron a blastocito fue mayor en el tratamiento con 40 $\mu\text{mol/L}$, seguido del testigo el cuál fue igual que el tratamiento de 140 $\mu\text{mol/L}$ y por último y más bajo el tratamiento con 240 $\mu\text{mol/L}$, fenómeno que no se había reportado en los estudios antes citados.

Cuadro 3. Efecto del nivel de adición de NH₃ al medio de cultivo de fecundación *in vitro* en el desarrollo de embriones bovinos.

Tratamiento, μmol/L	Ovocitos, n	Tasa de División n (%)	Mórulas, n (%)	Blastocitos, n (%)
0	100	76 (76) ^a	68 (68) ^a	40 (40) ^a
40	144	110 (76.4) ^a	63 (43.8) ^b	48 (33.3) ^{ab}
140	135	86 (63.7) ^b	66 (48.89) ^b	37 (27.4) ^b
240	133	72 (54.1) ^b	54 (40.6) ^b	16 (12) ^c

Medición después de la fecundación; tasa de división a las 72 h, Mórulas día 5, blastocitos día 7.

Valores con literales diferentes entre columnas indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

Cuadro 4. Efecto del amoniaco en el desarrollo de mórula a blastocito

Tratamiento μmol/L	Mórulas n	Blastocitos n (%)
0	68	40 (59) ^b
40	63	48 (76) ^a
140	66	37 (56) ^b
240	54	16 (27) ^c

Medición después de la fecundación; Mórulas día 5, blastocitos día 7.

Valores con literales diferentes entre columnas indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

Antes de la ovulación, el complejo cumulus-ovocito depende de los fluidos del folículo para su nutrición, por lo tanto, las alteraciones en la composición del fluido folicular pueden afectar a la competencia del ovocito y el desarrollo embrionario posterior. Por otra parte, los cambios en la absorción de nutrientes por las células de la teca y la transferencia a las células de la granulosa podrían influir en la nutrición de los ovocitos. Para ovocitos y embriones hasta la etapa de mórula, la fosforilación oxidativa es la vía principal para generar compuestos ricos en energía para el metabolismo celular (Thompson, 2006). Gardner y Lane (1993) sugirieron que el NH_3 puede afectar adversamente el embrión en desarrollo, por la disminución de la concentración de α -cetoglutarato mediante la conversión a glutamato, lo que reduce el flujo de α -cetoglutarato a través del ciclo de Krebs y como consecuencia podría agotar el ATP en la célula. Elevado NH_3 en el entorno uterino en el día 7 (etapa de blastocito) puede reducir la disponibilidad de ATP para las células embrionarias, y durante esta etapa de desarrollo la demanda de energía por el embrión es alta, esto se ha observado en otros estudios antes mencionados como Hammond et al. (2000) y Ocon y Hansen (2003). Rhoads et al. (2006) menciona que el periodo donde el nitrógeno ureico en sangre afecta el desarrollo del ovocito y al embrión es dentro de los primeros 7 días de preñez. Aunque una alta concentración de urea y amoníaco parece poner en peligro el desarrollo *in vitro* de embriones y, en algunos casos, inhibe el crecimiento y el metabolismo de las células de la granulosa de ovocitos, en los embriones producidos *in vivo* de ganado lechero alimentado exceso de proteína a menudo no tiene afecto (Rooke et al., 2004). Sin embargo, en otro estudio *in vivo* embriones de similar grado de calidad resultaron en una menor tasa de preñez después de la transferencia cuando se originó a partir de las vacas que consumen un exceso de proteína en la dieta (Rhoads et al., 2006), por lo cual sigue habiendo una parcialidad en la medida del efecto que tiene la urea o el amoniaco en sangre en la fertilidad del ganado.

VII. CONCLUSIONES

La sustitución parcial de la proteína vegetal por NNP, con 70 g de Urea o 120 g de ULL pueden ser utilizados en la dieta para el remplazo parcial de la proteína ya que en este estudio presentó los mismos niveles de NH_3 en suero que el tratamiento Testigo. No obstante, el tratamiento ULL contiene 50 g más que el tratamiento Urea, lo cual disminuye aún más la utilización de proteína vegetal sin afectar el NH_3 en suero, lo que podría resultar en una mejor opción para abaratar el costo de la dieta o disminuir la demanda de proteína vegetal según sea el caso.

Niveles de adición de NH_3 , al medio de cultivo de fecundación *in vitro*, superiores a los 40 $\mu\text{mol/L}$ reduce la proporción de embriones que inician división celular y llegan a la etapa de mórula y blastocito; lo que sugiere que si estos niveles se presentan en el medio donde el embrión se fecunda y se desarrolla durante la etapa embrionaria, afectaría negativamente la fertilidad en los bovinos.

Algunos reportes proveen evidencias de el uso de dietas con alta proteína en la dieta o con un alto nivel de urea o amoniaco en sangre y como éste se relaciona con una disminución en la fertilidad del ganado, sin embargo se desconoce el momento y el mecanismo exacto por el cual ocurre este fenómeno, el presente estudio demuestra que de manera *in vitro* hay una alteración en la producción de embriones con forme aumentan los niveles de NH_3 , por lo que en necesario seguir investigando para tener un conocimiento más preciso del efecto del NH_3 ya sea de manera *in vitro* o *in vivo* sobre la reproducción del bovino, además de conocer las fluctuaciones y la dinámica de liberación de nitrógeno exacta de las diferentes fuentes de NNP.

VIII LITERATURA CITADA

Abdoun, K., F. Stumpff, and H. Martens. 2006. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: A review. *Animal Health Research Reviews*. 7:43–59.

Adams, R. S. 1961. The truth about urea. *Penn. Farmer*. Abril 22.

Akay, V., Tikofsky, J., Holtz, C. and Dawson, K.A. 2004. Optigen®1200: Controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. *Proceedings of the 20th Alltech Symposium*, pp. 179–185.

Bartley, E. E. 1976. Methods of evaluating nonprotein nitrogen utilization by the ruminant. p. E1 in *Proc. Kansas Formula Feed Conf.*

Bergen, W.G., Purser, D.B., Cline, J.H. 1967. Enzymatic determination of the protein quality of individual rumen bacteria. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v.92, n.3, p.357-364.

Blanchard, T., Ferguson, J., Love, L., Takeda, T., Henderson, B., Hasler, J., Chalupa, W., 1990. Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Animal Journal Veterinary. Res.* 51, 905–908.

Brito A.F. y Broderick G.A. 2007. Effects of different protein supplements on milk production and nutrient utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 1816–1827.

Butler W.R. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*; 81:2533-2539

Beltman, M.E.; Forde, N.; Furney, P.; Carter, F.; Roche, J.F.; Lonergan, P.; Crowe, M.A. 2010. Characterisation of endometrial gene expression and metabolic parameters in beef heifers yielding viable or non-viable embryos on Day 7 after insemination. *Reproduction. Fertility Development.*, 22, 987–999.

Carareto, R. 2007. El uso de urea de liberación lenta para las vacas alimentadas con ensilado de maíz o pastos de hierba elefante gestionados con intervalos fijos o variables de defoliación. 113P. Tesis (Maestría en Ciencia Animal) - Escuela de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidad de São Paulo, Piracicaba.

Chalupa, W., 2007. Precision feeding of nitrogen to lactating dairy cows: A role for Optigen II. In *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food*

Industries.Proc. Alltech's 23rd Symposium. T. P. Lyons, K. A. Jacques, and J. M. Hower, ed. Alltech Inc., Lexington, KY, USA. pp: 221

Cherdthong, A., M. Wanapat, C. Wachirapakorn and M. E. Van Amburgh, 2010. Evaluation of ureacalcium mixtures (UCM) as slow-release: I. Fermentation characteristics using in vitro gas technique. In: Proceedings of the Agriculture Conference 11th. January 25-26, pp: 138-141.

Conrad, H. R. 1977. Nonprotein nitrogen in rations for lactating dairy cows. p. 16 in Alternate Nitrogen Sources for Ruminants, Atlanta, G.A.

Dawuda P.M., Scaramuzzi R.J., Leese H.J., Hall C.J., Peters AR, Drew SB, Wathes D.C. 2002. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. Theriogenology., 58: 1443-1455.

Devendra, C., 2007. Perspectives on animal production systems in Asia Livestock Science., 106: 1–18.

Elrod, C.C., Butler, W.R., 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. Journal of Animal Science. 71, 694–701.

Fradan, R. 1995. HOARD'S DAIRYMAN en español. Como aumentar la grasa en la leche. 1074-1077 p.

Firkins, J.L., Z. Yuand M. Morrison, 2007. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for Integration of microbiology and nutrition for dairy. Journal of Dairy Science, 90 (E. Suppl.): E1–E16.

Fonnesbeck, P.V., Kearl, L.C., Harris, L.E. 1975. Feed grade biuret as a protein replacement for ruminants. A review. Journal of Animal Science. vol. 40, p. 1150-1184

Galo E., Emanuele S.M., Sniffen C.J., White J.H. y Knapp JR 2003. Effects of a polymer coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science 86, 2154–2162.

Garcia-Bojalil, C.M., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Drost, M., 1994. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 77, 2537–2548.

Gardner, D.K., Lane, M., 1993. Amino acids and ammonia regulate mouse embryo development in culture. Biology Reproduction. 48, 377–385.

- Golombeski G.L., Kalscheur K.F., Hippen A.R. y Schingoethe D.J. 2006. Slowrelease urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 4395–4403.
- Gustafsson AH, Palmquist DL. 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *Journal of Dairy Science.*, 76: 475-484.
- Hammond, D.S., Wang, S., Holyoak, G.R., 2000. Effects of ammonia on development and viability of preimplantation bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 59 (1–2), 23–30.
- Hammond, D.S., Holyoak, G.R., Dhiman, T.R., 2005. Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 86, 195–204.
- Hart, E.B., G. Bohstedt, H.J. Deobald and M.I. Wegner, 1939. The utilization of sample nitrogenous compounds such as urea and ammonium bicarbonate by growing calves. *Journal of Dairy Science.*, 22: 785–798
- Helmer, L.G., Bartley, E.E. 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants.A review. *Journal of Dairy Science.*, vol. 54, p. 25-51.
- Hobson P.N., y Wallace R.J.. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part I and II. *CRC Critical Review In microbiology*.
- Huntington G.B., y Archibeque S.L. 2000. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Journal of Animal Science.*; 78: 742:749.
- Huntington, G.B., Harmon, D.L., Kristensen, N.B., Hanson, K.C., Spears,J.W. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Animal Feed Science Technoogyl*. vol. 130, p. 225-241.
- Huber, J. T. 1976. Use of non-protein nitrogen by lactating cows.*Feedstuffs* 48(Dic. 6):13.
- Huber, J.T.; Kung Jr, L. 1981. Protein and nonprotein nitrogen utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.64, p.1170-1195.
- INEGI, 2014. <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/recnat/clima/> consultado en línea el 1/10/2015

- Jordan, E. R., y L. V. Swanson. 1979. Effect of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein and albumin in the high-producing dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 62:58–63
- Kaufmann, T. B., M. Drillich, B. A. Tenhagen, D. Forderung, and W. Heuwieser. 2010. The correlation between periparturient serum concentration of non-esterified fatty acids, betahydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical bovine endometritis. *BMC Veterinary Research* 6 (10): 47
- Lane M, Gardner DK. 2003. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biology Reproduction*; 69:1109–17.
- Leng, R. A., and J. V. Nolan. 1984. Symposium: Protein nutrition of the lactating dairy cow. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 67: 1072-1089.
- Leroy, J.L.M.R., Opsomer, G., De Vliegher, S., Vanholder, T., Goossens, L., Geldhof, A., Bols, P.E.J., de Kruif, A., Van Soom, A., 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 64, 2022–2036.
- Loosli, J. K., H. H. Williams, W. E. Thomas, F. H. Ferris, and L. A. Maynard. 1949. Synthesis of Amino Acids in the Rumen. *Science* 110: 144-145.
- Lowman, B.G., Scott N.A. y Somerville S.H. 1976. Condition scoring of cattle. *East of Scotland College of Agriculture Bulletin No. 6, East of Scotland College of Agriculture*.
- Mahadevan S., Sauer, F., y Erfle, J.D. 1976. Studies on bovine rumen bacterial urease. *Journal of Animal Science, Champaign*, v.42, p.745-753.
- Mapato, C., M. Wanapat and A. Cherdthong, 2010. Effects of urea treatment of straw and dietary level of vegetable oil on lactating dairy cows. *Tropical Animal Health Production*. 42(8):1635-42
- Martínez, A. 2009. Urea de lenta degradación ruminal como sustituto de proteína vegetal en dietas para rumiantes. *REDVET*. 10: 1695-7504
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2011 *Principios de Bioquímica de Lehninger*. 5.ed. Porto Alegre, Artmed,. 1304p.

Nocek, J.E. and J.B. Russell, 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science* i., 71: 2070-2107

Ocon O.M. y Hansen P.J. 2003. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *Journal of Dairy Science.*, 86:1194-1200.

Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. LeibfriedRutledge, E. S. Crister, W. H. Eyestone and N. L. First, 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.

Pinos-Rodríguez, J.M., Peña, L.Y., González-Muñoz, S.S., Bárcena, R., y Salem, A. 2010. Effects of a slow-release coated urea product on growth performance and ruminal fermentation in beef steers. *Italian Journal of Animal Science.* 9,16-19.

Rhoads M.L., Rhoads R.P., Gilbert R.O., Toole R., Butler W.R. 2006. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*; 91:1–10.

Rhoads, M.L., Gilbert R.O., Lucy M.C., Butler W.R. 2004. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 87:2896–901.

Rooke, J.A., Ewen M., Mackie K., Staines M.E., McEvoy T.G., Sinclair K.D. 2004. 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. *Animal Reproduction Science*;84:53–71.

Satter, L.D., Roffler, R.E., 1975. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 58:1219-1237.

Satter, L. and Slyter, L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 32, 199-206.

Sinclair, L. A., Blake, C. W., Griffin, P., Jones, G. H. 2011. The partial replacement of soybean meal and rapeseed meal with feed grade urea or a slow-release urea and its effect on the performance, metabolism and digestibility in dairy cows. *The Animal Consortium* 6:920-927.

Sinclair K.D., Kuran M., Gebbie F.E., Webb R., McEvoy T.G. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle. II. Development of oocytes recovered from

- heifers offered diets differing in the rate of nitrogen release in the rumen. *Journal of Animal Science*; 78:2670–80.
- Siciliano-Jones, J., y Downer, J. 2005. Utility and safety of slowrelease nitrogen product; Optigen 1200. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries (21st., 2005, Nottingham, U.K.) Proceedings*. Nottingham, U.K., University Press. pp. 241-248
- Sonderegger, H., y A. Schurch. 1977. A study of the influence of the energy and protein supply on the fertility of dairy cows *Livestock Production Science*. 4:327–333
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. 1981. *Bioestadística. Principios y Ptoedimientos*. Editorial McGrawhil Mexico
- Taylor-Edwards, C.C., N.A. Elam, S.E. Kitts, K.R. McLeod, D.E. Axe, E.S. Vanzant, N.B. Kristensen and D.L. Harmon, 2009. Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. *Journal of Animal Science*, 87: 209-221
- Thompson J. 2006. The impact of nutrition on the cumulus oocytes complex and embryo on subsequent development in ruminants. *Journal of Reproduction and Development*. 52:169–75.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Cornell University Press. Ithaca, NY, USA, pp: 476
- Vélez, M; J.J. Hincapié; I. Matamoros; R. Santillán. 2002. *Producción de ganado lechero en el trópico*. Cuarta edición. Zamorano Academic Press. Zamorano, Honduras. 385p.
- Visek, W.J. 1984. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.67, n.3, p.481-498,
- Wallace, R. J., K.J. Cheng, D. Dinsdale, and E. R. Ørskov. 1979. An independent microflora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. *Nature* 279:424–426
- Xin, H.S., D.M. Schaefer, Q.P. Liu, D.E. Axe. Q.X. Meng. 2010. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy

cows fed a steam-flaked corn-based diet. Asian-Aust. Journal Animal Science., 23: 491-500.