

# EFECTOS DE LOS ALTOS NIVELES DE UREA EN EL FLUIDO UTERINO SOBRE EL TEJIDO ENDOMETRIAL EN VACAS VACÍAS

Rabaglino, M. B.<sup>1</sup>; Magariños, M. J.<sup>1</sup> y Orias, F.<sup>2</sup>. 2007. Taurus, 9(35):8-15.

1) Cátedra de Reproducción Animal.

2) Cátedra de Producción Lechera.

Fac. de Agronomía y Veterinaria, Univ. Nac. de Río Cuarto,  
Río Cuarto, Córdoba, Argentina. brabaglino@ayv.unrc.edu.ar

Trabajo realizado para cumplir con los requisitos de graduación de la Especialidad en Reproducción Bovina de la Universidad Nacional de Córdoba y el Instituto de Reproducción Animal de Córdoba.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Enfermedades y problemas de la reproducción](#)

## RESUMEN

Los animales en pastoreo ingieren excesos de proteína degradable en rumen (PDR), provocando un incremento en la concentración de nitrógeno ureico en sangre (NUS) que está asociado a una disminución en la fertilidad cuando los niveles exceden los 19 mg/dl. El objetivo de este trabajo fue determinar si altas concentraciones de NUS pueden alterar el tejido endometrial. Se utilizaron 2 grupos de vacas vacías (n=4), uno alimentado con bajos niveles de PDR y altos niveles de carbohidratos no estructurales (CNE) y otro con altos niveles de PDR y bajos niveles de CNE. Se les realizó citología endometrial desde el día 0 hasta las 2 semanas posteriores al día 14, donde la concentración de NUS superó los 20 mg/dl; e histopatología endometrial al inicio y al final del experimento (día 28). Los datos se analizaron estadísticamente por Regresión Lineal. Se encontró que a medida que se acrecienta la concentración de NUS se produce un aumento en el porcentaje de células endometriales descamadas hacia la luz uterina ( $R^2=0,82$ ,  $p<0,0001$ ). Histológicamente se hallaron signos inflamatorios (alta infiltración de células mononucleares) en las biopsias tomadas al final de la muestra. Se concluyó que excesos de PDR producen una alteración del ambiente uterino, reflejado por la alta descamación de las células epiteliales endometriales, pudiendo esto alterar la fertilidad.

Palabras clave: proteína degradable en rumen; endometrio bovino; citología e histología endometrial.

## INTRODUCCIÓN

Para estimular la alta producción de leche durante la lactancia temprana en vacas de tambo deben incluirse altos niveles de proteína en su alimentación (13, 19, 24). El National Research Council (NRC) (21) recomienda que las dietas contengan un 18 al 19 % de proteína cruda, por lo que los animales en pastoreo ingieren excesos de proteína degradable en rumen (PDR) (12). Los microorganismos ruminales degradan las proteínas dietarias hasta ácidos orgánicos,  $CO_2$  y amoníaco ( $NH_3$ ), y utilizan este último para la síntesis de nuevas proteínas. Si la dieta contiene proteínas de alta degradabilidad, puede generarse un exceso de amoníaco en el rumen que pasará a través de las paredes ruminales y vía vena porta llegará al hígado, donde será convertido en urea, provocando un incremento en la concentración de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y en leche (NUL) (15,17,25). A su vez, el aumento de NUS y NUL está asociado también con altas concentraciones de  $NH_3$  y urea en el fluido uterino durante la fase luteal del ciclo estral en la lactancia temprana (14).

Numerosos autores han reportado que los altos niveles de nitrógeno están asociados con una disminución en la fertilidad (1,4,5,8,11,22), alterando algunos parámetros reproductivos; como por ejemplo la tasa de concepción, que disminuyó un 20 % cuando los niveles de NUS o NUL excedieron los 19 mg/dl (14) o los 20 mg/dl (9,10,11).

Las causas de la baja eficiencia reproductiva todavía no están del todo claras. En algunos casos las vacas afectadas poseían intervalos interestruales normales, lo que sugiere que los bajos porcentajes de preñez pueden deberse a fallas en la fertilización o muerte embrionaria temprana; es decir, antes del reconocimiento materno, el cual se produce alrededor de los 13 días posfecundación (20). Como la placentación todavía no ha ocurrido, el embrión depende de las secreciones uterinas para su supervivencia. La misma se verá afectada si se produce algún cambio en el ambiente uterino durante este período.

Como consecuencia, ante una infusión de urea se produce un aumento de  $NH_3$  en los tejidos reproductivos, lo que lleva a un flujo de  $H^+$  hacia la luz uterina para la formación de amonio ( $NH_4$ ) el cual no puede atravesar las membranas celulares, resultando en la disminución del pH del fluido uterino (7,8,23). Sin embargo, a pesar de que en estos estudios se observó este efecto cuando las concentraciones de NUS son elevadas, ninguno determinó claramente cómo puede influir el bajo pH uterino sobre la capa endometrial, pudiendo esto afectar directamente la supervivencia embrionaria.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los altos niveles de NUS, provocado por dietas ricas en PDR y proteína soluble (PS), que conduce a elevadas concentraciones de urea y  $\text{NH}_3$  en el fluido uterino, pueden afectar el tejido endometrial y alterar el ambiente uterino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 vacas cruzas británicas, divididas al azar en dos grupos:

**Grupo Baja Proteína Degradable:** este grupo recibió una dieta con bajos niveles de PDR y altos niveles de carbohidratos no estructurales (CNE), de manera que el valor de NUS no superara los 20 mg/dl. La composición de la dieta y características nutricionales se presentan en la Tabla 1.

**Grupo Alta Proteína Degradable:** estos animales recibieron una dieta rica en PDR y moderada en CNE, de manera de provocar un incremento en el valor de NUS, y por ende en el tejido uterino. La composición de la dieta y características nutricionales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición y características nutricionales de las dietas suministradas a los Grupos de Baja Proteína Degradable (BPD) y Alta Proteína Degradable (APD).

Ingrediente (kg MS)	Dieta	
	BPD	APD
Heno de moha	4,5	--
Heno de alfalfa	--	5,0
Maíz, molido	2,5	0,5
Gluten feed maíz, seco	2,5	--
Afrechillo de trigo	--	3,0
Harina de soja	--	1,0
Urea	--	0,040
Composición*		
Materia seca (%)	88	90
TDN (% MS)	80	72
Fibra detergente neutra (% MS)	46	41
CNE (% MS)	36	28
Proteína Bruta (% MS)	13	21
Proteína Degradable (% PB)	60	74
Proteína Soluble (% PB)	35	36
Proteína metabólica (g/d)	968	997
PM origen microbiano (g/d)	635	632
PM origen alimentario (g/d)	333	365
PUN predicho (mg/dl)	8	21
*Valores estimados según CNCPS versión 4.0.25 BPD: baja proteína degradable; APD: alta proteína degradable		

### Muestras obtenidas y procesamiento:

**-Sangrado para determinación de NUS:** se recolectó sangre de la vena yugular en un tubo sin anticoagulante, se dejó exudar el suero a temperatura ambiente y luego se lo separó por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos.

La determinación de NUS se realizó por métodos enzimáticos (Urea UV cinética, laboratorios Wiener). La lectura se hizo a través de espectrofotometría (Metrolab 1600 plus). El valor de urea sanguínea obtenida se lo multiplicó por el factor 0,48 para determinar la concentración de NUS.

Las muestras de sangre se extrajeron una vez por semana desde el comienzo del trabajo (día 0) hasta las 2 semanas posteriores a que la concentración de NUS superó los 19 mg/dl en el grupo APD.

Todas las vacas del grupo APD mostraron un valor de NUS por encima de 19 mg/dl a partir de la segunda semana del experimento (día 14) por lo que el estudio tuvo una duración total de 28 días.

**-Citología uterina:** las muestras se recolectaron mediante un hisopo acoplado a la camisa de una pistola metálica universal cubierto con una vaina de inseminación a la cual se le cortó la punta. Esto se introdujo por vagina y el hisopo se exteriorizó una vez que se atravesó el cervix. La muestra se tomó de la pared dorsal del cuerpo del útero, volviendo a introducir luego el hisopo en la vaina para que no se contaminara al extraer la muestra.

Posteriormente, se hizo rodar el hisopo sobre un portaobjeto dejando secar la muestra al aire. Una vez en el laboratorio se las coloreó con la tinción de metanol-giemsá.

La toma de las muestras se efectuó una vez por semana junto con la recolección de sangre. La cuantificación citológica se realizó a través de microscopio óptico, determinando el número de células endometriales promedio por campo a 400X, contando por lo menos 10 campos.

**-Biopsia uterina:** se empleó un catéter para la obtención de biopsias del endometrio bovino (3). La muestra de tejido se extrajo de la región dorsal del cuerpo del útero y luego se lo colocó en una solución de formol al 10% hasta que fuera procesada en el laboratorio de histopatología de la FAV, UNRC.

Se tomaron 2 muestras de cada animal, una al inicio (día 0) y la otra al final del período experimental (día 28). Las muestras fueron evaluadas según el criterio histológico para la interpretación de biopsias endometriales descrito por Bonnett y col. (2), cuantificando el número de células inflamatorias (mononucleares o segmentadas) por campo a 400X, tanto en el estrato compacto como esponjoso, considerando inflamación cuando el número es superior a 300 células por campo.

El objetivo fue obtener datos comparativos entre la histología inicial y final de cada animal.

## Análisis de Resultados

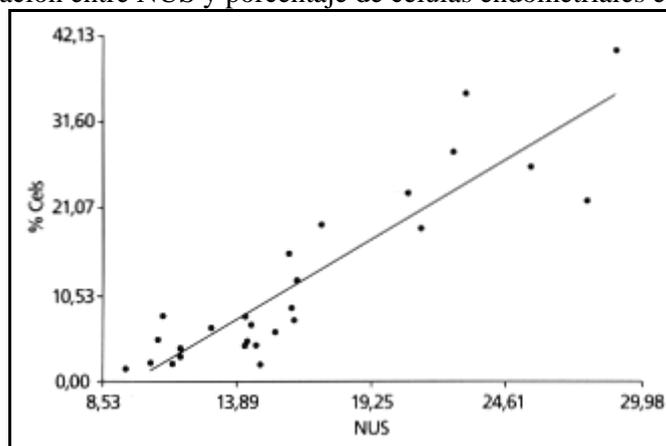
Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Regresión Lineal (InfóStat, Versión 2.0, 2002), tomando como variable independiente o regresora al valor de NUS y como variable dependiente o respuesta al porcentaje de células epiteliales endometriales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**-Citología:** durante las 4 semanas que se efectuó el ensayo se recolectaron un total de 27 muestras citológicas (controles y tratamientos).

Los resultados obtenidos por Regresión Lineal muestran un valor  $R_z$  de 0,82, lo que explica que el 82 % de variación en la cantidad de células se debe a los altos niveles de NUS ( $p < 0,0001$ ). Se puede inferir por ende, que a medida que se acrecienta la concentración de NUS se produce un aumento en el porcentaje de células endometriales descamadas hacia la luz uterina (Figura 1).

Figura 1. Relación entre NUS y porcentaje de células endometriales en vacas cruzas.



**-Biopsias:** a pesar de que no se pudo recolectar un alto número de muestras legibles, ( $n=5$ ) la principal alteración encontrada entre las histologías iniciales ( $n=2$ ) y las finales ( $n=3$ ) fue que en estas últimas se hallaron signos de inflamación a nivel del estrato compacto, reflejado por una alta infiltración de células mononucleares (más de 300 células promedio por campo).

Cuando el animal ingiere dietas con elevados porcentajes de PDR genera altos niveles de  $\text{NH}_3$  que difunde a través de las paredes ruminales para ser convertido en urea por el hígado. Estudios previos han demostrado que la concentración de  $\text{NH}_3$  en el fluido uterino es relativamente mayor a la concentración en el plasma (26). También existen evidencias que el pH uterino guarda una relación inversa a la concentración de NUS, y que la alteración que puede producir el bajo pH sobre el útero es única (7,8). El  $\text{NH}_3$  es una molécula muy tóxica que se une al glutamato para su detoxificación, transformándose en glutamina por acción de la enzima glutamina sintetasa. Este compuesto sirve como un mecanismo de transporte no tóxico que lleva el  $\text{NH}_3$  al hígado para la síntesis de urea. La glutamina puede ser utilizada como fuente de energía por diferentes células, entre ellas la de los tejidos reproductivos, resultando en la liberación de grandes cantidades de  $\text{NH}_3$  (6,18). Esto puede crear un flujo de  $\text{H}^+$  hacia la luz uterina para la formación de amonio ( $\text{NH}_4$ ), el cual no puede atravesar las membranas celulares, resultando en la disminución del pH del fluido uterino (8). El  $\text{NH}_3$  puede afectar la supervivencia celular debido a que

produce una disminución del  $\alpha$ -cetoglutarato al convertirlo en glutamato, y por lo tanto, interfiere con uno de los intermediarios del ciclo de Krebs produciendo una disminución en la formación de ATP por la célula.

Estudios previos han demostrado que los altos niveles de NUS que pueden generarse por la ingestión de PDR en exceso y que llevan a una elevada concentración de  $\text{NH}_3$  en el fluido uterino pueden afectar el desarrollo de los embriones bovinos, especialmente en el estadio de blastocito expandido a eclosionado (14).

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos por la citología e histopatología evidencian que un factor que estaría produciendo una disminución de la eficiencia reproductiva sería la alteración del ambiente uterino, reflejado principalmente por la alta descamación de las células epiteliales endometriales, lo cual podría dificultar el reconocimiento materno de la preñez y la nutrición del embrión en los primeros estadios de desarrollo. Mayores estudios serán necesarios en un futuro para apoyar esta conclusión.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Oscar Forchetti, Cátedra de Análisis Clínico, FAV UNRC.; M.V. Guillermo Bagnis, Tec. Schleef Nelcy, Cátedra de Patología Animal, FAV UNRC; M.V. Ricardo Ludueña, Cátedra de Producción Equina, FAV UNRC; M.V. Susana Blanch, Cátedra de Reproducción Animal, FAV UNRC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Blanchard, T, Ferguson J.D., Love L., Takeda T., Henderson B., Hasler J., and Chalupa W 1990. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51:905-908.
2. Bonnett B.N, Miller R.B., Etherington W.G., Martin S. W and Johnson W H. 1991. Endometrial Biopsy in Holstein-Friesian Dairy Cows I. Technique, Histological Criteria and Results. *Can J Vet Res*; 55: 155-161.
3. Bosch, R.A. 1992. Diseño de un catéter para la obtención de biopsias del endometrio bovino. *Vet Arg.* IX, N°90.
4. Butler, W, Calaman J.J., and Beam S.W 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74:858-865.
5. Canfield, R.W, Sniffen C.J., and Butler W.R. 1990. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73:2342-2349.
6. Dimski D.S. 1994. Ammonia metabolism and the urea cycle: function and clinical implications, *J. Vet. Int. Med.* 8, pp. 73-78.
7. Elrod, C.C. and Butler W R. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71:694-701.
8. Elrod, C.C., Van Amburgh W, and Butler W.R.. 1993. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J. Anim. Sci.* 71:702-706.
9. Ferguson, J. D., Blanchard T, Galligan D.T, Hoshall D.C., and Chalupa W. 1988. Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen. *JAVMA* 192: 659-662.
10. Ferguson, J. D., Galligan D.T, Blanchard T, and Reeves M. 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *J. Dairy Sci.* 76:3742-3746.
11. Ferguson, J.D., and Chalupa W 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:746-766.
12. Fulkerson W J., Jonsson N.N., Pepper P.M. McGowan M.R. 1999. Effect of genetic merit and concentrate feeding on reproduction of grazing dairy cows in a subtropical environment. *J. Dairy Sci.* 82(12):2756-65
13. Grings, E.E., Roffler R.E, and Deitelhoff D.P 1991. Response of dairy cows in early lactation to additions of cottonseed meal in alfalfa-based diets. *J. Dairy Sci.* 74:2580-2587
14. Hammon D.S., Wang S, Holyoak G.R. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. *Anim Reprod Sci* 2000; 58:1.
15. Hof G, Vervoorn M.D., Lenaers E.J., Tamminga S. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80(12):3333-40
16. InfoStat. 2002. Infostat/Estudiantil, versión 2.0. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
17. Jonker J.S., Kohn R. A., Erdman R.A. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81(10):2681-92.
18. Kirsher R.L. and Bavister B.D. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment, *Theriogenology* 49, pp. 103-114
19. Kung Jr., L., and Huber J.T 1983. Performance of high producing cows in early lactation fed protein of varying amounts, sources and degradability. *J. Dairy Sci.* 66:227-234.
20. Larson S.E, Butler W.R. and Currie W.B.' 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 80, pp. 1288-1295.
21. National Research Council. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th rev. ed. Washington, DC. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
22. Orias, Fernando. Relaciones entre energía y proteínas sobre la fertilidad en vacas lecheras. Resúmenes Jornadas de Reproducción Animal. UNRC. 2002

23. Rhoads, R.O. Gilbert, M.C. Lucy and Butler W.R. 2004 Effects of Urea Infusion on the Uterine Luminal Environment of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87:2896-2901.
24. Roffler, R.E., and Thacker D.L. 1983. Influence of reducing dietary crude protein from 17 to 13.5% on early lactation. *J.Dairy Sci.* 66:51-58.
25. Schepers A.J., Meijer R.G. 1998. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *J.Dairy Sci.* 81(2):579-84.
26. Sinclair K.D., Kuran M.,Gebbie EE.,Webb R. and McEvoy TG. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen., *J. Anim. Sci.* 78, pp. 2670-2680

Volver a: [Enfermedades y problemas de la reproducción](#)