

## Respuesta metabólica en ovinos suplementados con alto contenido de nitrógeno no proteínico en la dieta

Mirela Noro<sup>1,2\*</sup>, Daniel Scandolo Lucini<sup>3</sup>, Fernando Wittwer Menge<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Austral de Chile, Ins. Cs. Clín.Vet., Casilla 567, Valdivia, Chile.

<sup>2</sup>Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo-RS, Brasil. \*Correo electrónico: mirelanoro@gmail.com

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina.

### RESUMEN

La suplementación con nitrógeno no proteínico (NNP) afecta la fermentación ruminal así como el metabolismo del animal. Con el objeto de determinar los efectos de la suplementación con alto contenido de NNP sobre parámetros de fermentación ruminal y de los metabolismos de energía y proteínas, se utilizaron 18 borregas fistuladas con cánula ruminal (1,5 cm Ø), congregadas en 3 grupos de 6 animales cada uno: control (C, dieta base), moderado nitrógeno (MN, 182 mg N/kg<sup>0.75</sup>, tres veces al día) y elevado nitrógeno (EN, 425 mg N/kg<sup>0.75</sup>, tres veces al día). La dieta basada en heno de alfalfa (EM: 7,80 MJ/kg MS; PC: 16,8%MS) aportando 460 kJ/kg<sup>0.75</sup>/día, se distribuyó en 3 raciones cada 8 horas. El NNP se incorporó al heno de alfalfa como urea en solución, durante 17 días. En los días 1, 8 y 15 del experimento se obtuvieron muestras de líquido ruminal y sangre cada 1,5 hora desde el momento previo hasta 6,0 horas posterior al suministro de la ración de la mañana. La suplementación con NNP alcalinizó el pH ruminal, a su vez, la excreción de derivados de purinas fue similar entre los tres grupos (P>0,05). Las concentraciones plasmáticas de urea fueron superiores (P<0,05) en EN; intermediarias en MN e inferiores en C (P<0,05). La suplementación con NNP incrementó (P<0,05) las concentraciones plasmáticas de glucosa y de colesterol, y redujo las de βOH-butirato comparado con C (P<0,05). Se indica que la suplementación con NNP no modificó la síntesis de proteína bacteriana, incrementó la ureagénesis, favoreciendo el metabolismo energético, efecto dependiente de la cantidad suministrada de NNP.

*Palabras clave:* ovinos, urea, metabolismo energético, proteico.

### Metabolic response in sheep supplemented in the diet with high content of non protein nitrogen

### ABSTRACT

Supplementation with non-protein nitrogen (NPN) affects ruminal fermentation and animal metabolism. Eighteen ruminal fistulized (1.5 cm Ø), sheep one year old, kept in individual cages were used to determine the variations on the ruminal pH, urinary excretion of purines, and fluctuations in the blood concentrations of urea, creatinine, glucose, lactate, βOH-butyrate, cholesterol and triacylglycerol. Sheep were allotted in three groups of six animals each according to body weight; control (C, base diet), moderate NPN (MN, 182 mg N/kg<sup>0.75</sup> 3 times a day) and high NPN (HN, 425 mg N/kg<sup>0.75</sup> 3 times a day). The daily diet was based on lucerne hay pellets (ME: 7.80MJ/kg DM; CP: 16.8% DM), considering 460 kJ/kg<sup>0.75</sup>, distributed every 8 hours. The NPN was incorporated to the base diet as urea solution during 17 days. Ruminal fluid and blood samples were obtained the days 1, 8 and 15 at 0, 1.5, 3.0 and 4.5 hours after morning feeding. The treatment with NPN increased ruminal pH (P<0.05) however did not modified the urinary excretion of purines (P>0.05). The treatment also increased the plasma concentrations of urea, being higher in HN, medium in MN and lower in the control group (P<0.05). On the other side the treatment increased (P<0.05) plasma concentrations of glucose and cholesterol, and reduced plasma concentration of βOH-

butyrate ( $P < 0.05$ ). Results suggest that supplementation with NPN in doses of 182 or 425 mg N/ kg<sup>0.75</sup>, three times a day did not modified bacterial protein synthesis but increases the ureagenesis and energy metabolism according to the amount of NPN in the diet.

*Key words:* Sheep, urea, energy and protein metabolism.

## INTRODUCCIÓN

La proteína bruta (PB) de la dieta de los rumiantes está constituida por proteína verdadera, aminoácidos y compuestos nitrogenados no-proteínicos (NNP). En el rumen gran parte de las proteínas degradables (RDP) presentes en los alimentos son digeridas a NNP, principalmente a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) el cual puede ser utilizado para la síntesis de proteína microbiana, PM (Cherdthong y Wanapat, 2010). El  $\text{NH}_4^+$  puede ser incorporado a la PM a tasas superiores al 80%, siempre que el rumen disponga de cantidades adecuadas de energía (Huntington y Archibeque, 1999). La asincronía entre la liberación de energía y RDP en el rumen, así como una extensiva desaminación de las proteínas dietéticas, o una gran actividad ureolítica de las bacterias ruminales, incrementan la producción y concentración de  $\text{NH}_4^+$  ruminal (Noro y Wittwer, 2012).

El acumulo de  $\text{NH}_4^+$  ejerce efectos nocivos sobre el metabolismo animal, es por eso que los mamíferos presentan un eficiente mecanismo de conversión a productos de excreción no tóxicos (Haliburton y Morgan, 1989; Noro y Wittwer, 2012; Visek, 1984). Seguido de su absorción el  $\text{NH}_4^+$  llega al hígado, vía vena porta, donde es detoxificado a urea, compuesto que es 40 veces menos tóxico (Huntington y Archibeque, 1999).

El ciclo de la urea se integra en los hepatocitos periportales con otras vías energéticas como el ciclo de Krebs y vía gluconeogénica (Katz, 1992; Noro *et al.*, 2013), por medio de aminoácidos específicos (aspartato, glutamato, alanina) y oxalacetato (Noro y Wittwer, 2012; Reynolds, 1992). El costo energético de la síntesis de 1 mol de urea puede variar entre 1 a 4 moléculas de ATP (Noro y Wittwer, 2012). Es así que una mayor demanda ureagénica puede alterar la eficiencia energética por demanda de intermediarios o por incremento del gasto energético del animal (Overton *et al.*, 1999). Sin embargo, se han descrito efectos negativos (Barej *et al.*, 1987; Overton *et*

*al.*, 1999) y positivos (Noro *et al.*, 2012a) de la suplementación con NNP en el balance energético.

El presente estudio tuvo como objetivo comparar el efecto de la suplementación con NNP sobre las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y pH ruminal y la respuesta metabólica de ovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en las instalaciones del Instituto de Ciencias Clínicas de la Universidad Austral de Chile, ubicada en la ciudad de Valdivia, Región de Los Ríos, Chile (39°48' LS y 73°13' LO), a una altura de 12 m.s.n.m, clima templado húmedo con influencia mediterránea, con una temperatura media anual de 12°C.

### Animales y manejo

Se utilizaron 18 borregas mestizas ½ Sulffolk y ½ Texel, con  $35 \pm 1,7$  kg PV, de 7 meses de edad, fistuladas con cánulas permanentes en el rumen (1,5 cm de Ø). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales de 1,40 x 0,60 m, ubicadas en un galpón techado con 3 horas de oscuridad (21:00 a 24:00 horas) durante las 24 horas del día, donde fueron adaptadas a la dieta experimental desde 3 semanas previas a iniciar el estudio.

### Dieta

La dieta se basó en heno de alfalfa en cubos (85% MS, 16,8% PB MS, 9,1 MJ/kg MS, FDN 42,4% MS) aportando el requerimiento de manutención de 460 kJ EM/kg<sup>0.75</sup>/día, suministrado en 3 raciones iguales cada 8 horas (08:00; 15:00; 24:00 horas). Además, se ofreció agua y mezcla mineral *ad libitum*.

### Diseño experimental

Las borregas se agruparon homogéneamente por peso asignándose a 3 grupos de 6 animales cada uno: Control (C), no suplementado; MN: moderado NNP suplementado con 182 mg N/kg<sup>0.75</sup>, 3 veces al día, durante 15 días; EN: elevado NNP, suplementado con

425 mg N/kg<sup>0,75</sup>, 3 veces al día. La suplementación con NNP se realizó mediante la inclusión de urea en el heno de alfalfa como una solución diluida en agua.

### Muestras y análisis sanguíneos

Los días 1, 8 y 15 del experimento se obtuvieron muestras de sangre con heparina sódica y fluoruro de sodio previo a la ración de la mañana (0 hora), y luego cada 1,5 hora en cuatro oportunidades (1,5; 3,0; 4,5 y 6,0 horas posterior a la ración de la mañana). Para obtener las muestras se instaló a los animales, previo al muestreo, un catéter en la vena yugular. Las muestras se centrifugaron inmediatamente de obtenidas a 4°C a 3.000 g (Centra CL 3 R Termo IEC), por 15 minutos. Las muestras de plasma se alicuotaron en micro tubos y congelaron a -20°C (Freezer 420, CFC Free, Consul) hasta ser analizadas posteriormente de finalizada la etapa experimental con los animales. En las muestras de plasma con fluoruro de sodio se analizaron las concentraciones de glucosa (GOD-PAP, Human®, n°10260) y lactato (LOD, Sentinel, n° 17285). Mientras, que en las muestras de plasma con heparina sódica se determinaron las concentraciones de urea (GD, Human®, n° 10521), creatinina (Jaffé, Human®, n° 10051),  $\beta$ OH-butirato (FAO-AIEA, 1993), colesterol (CHOD-PAP, Human®, n° 10028) y triacilgliceroles (GPO-PAP, Human®, n° 10720P) en un autoanalizador para bioquímica clínica, Cobas Mira Plus® de Roche, Alemania, excepto  $\beta$ OH-butirato que se empleó un fotocolorímetro Hitachi 4020, Japón.

### Muestras y análisis de líquido ruminal

Se obtuvieron aproximadamente 10 mL de líquido ruminal a través de las cánulas ruminales instaladas en las borregas, en los mismos horarios de la obtención de las muestras sanguíneas, determinándose inmediatamente el valor del pH con un pHmetro, Schott® CG 825, electrodo Schott® n° 6180-Ch 0004, calibrado con soluciones de pH 4,0, 7,0 y 10,0.

### Muestras y análisis de orina

Las muestras de orina se obtuvieron tres veces al día durante los días experimentales 5 al 8 y 12 al 15. Las muestras se acidificaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 9% (1:9). De cada animal se formó una muestra de orina compuesta mezclando, proporcionalmente, las muestras obtenidas los días 5 al 8 y 12 al 15, las cuales se congelaron a -20°C. En las muestras

compuestas de orina de cada animal se determinaron las concentraciones de creatinina, alantoína, ácido úrico, xantina, hipoxantina y ácido orótico (Chen *et al.*, 1990). Para estimar el valor excretado de las purinas y ácido orótico en orina, se calculó el índice de excreción urinaria (IEU):  $IEU = (\text{Metabolito en mmol/L} / \text{creatinina en mmol/L}) * kg^{0,75}$ .

### Análisis estadístico

El área total bajo la curva del pH ruminal y de las concentraciones de los indicadores sanguíneos a las 6 horas pos-suplementación (ABC) se calculó mediante el método trapezoidal corregido por la concentración basal. Los datos obtenidos se procesaron en el programa Statistix 8.0 *NH Analytical Software, Roseville, MN; USA*, (Statistix, 2003). Se comprobó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad por la prueba de Bartlett. Los valores de los parámetros ruminales y sanguíneos previos a iniciar la suplementación (hora cero del primer día del experimento) se consideró como valor basal, siendo comparados los grupos mediante un modelo lineal general de ANDEVA considerando como factores el efecto de la suplementación, y sus interacciones entre hora y el día de muestreo:  $y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + D_k + TH_{ij} + TD_{ik} + \epsilon_{ijk}$ ; donde  $y_{ijk}$  = variable dependiente,  $\mu$  = media general,  $T_i$  = efecto del tratamiento i-ésimo,  $H_j$  = efecto de la hora pós suplementación j-ésimo;  $D_k$  = efecto del día del experimento k-ésimo;  $TH_{ij}$ : efecto interacción tratamiento i-ésimo y hora día i-ésimo;  $TD_{ik}$ : efecto interacción tratamiento i-ésimo y día k-ésimo;  $\epsilon_{ijk}$ : error experimental. Las diferencias fueron contrastadas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos heterocedásticos se analizaron por Kruskal Wallis. Para el estudio de asociación entre dos variables se utilizó un análisis de regresión y se determinó el coeficiente de correlación de Pearson, la significancia obtenida en la regresión lineal se evaluó a través de la prueba F. Se consideró un nivel de significación del 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Dieta y aporte de NNP en la dieta

El consumo equivalente de proteína cruda fue de 16,8% en las controles, 22,9% en las MN y 30,7% en las EN. Representado un consumo de urea de 2,27% y de 5,14% de la MS total en MN y en EN,

respectivamente, lo que corresponde en EN a un aporte del 48,2% del nitrógeno total de la dieta, como urea, cifra superior al máximo indicado de 35% (Helmer y Bartley, 1971). En cabras se produce una intoxicación subclínica por  $\text{NH}_4^+$  cuando se suministra 10% del N dietético como NNP ( $\cong 5$  g urea/día), o con una carga de urea administrada *per os* de 300 o 400 mg urea/kg PV (Fernández *et al.*, 2001). Se observan signos clínicos no letales de toxicidad por  $\text{NH}_4^+$  administrando una dosis de urea de 500 mg/kg PV (Emmanuel *et al.*, 1982) y letalidad con 700 mg/kg PV (Edjehadi *et al.*, 1978). En base a esos datos el consumo de N en la dieta de los grupos MN (1,89 g N/kg<sup>0,75</sup>/d) y EN (2,61 g N/kg<sup>0,75</sup>/d), sería suficiente para producir una intoxicación subclínica por  $\text{NH}_4^+$  (Fernández *et al.*, 2001). Situación que no pudo ser corroborada por dificultades analíticas en las determinaciones de las concentraciones ruminales y plasmáticas de  $\text{NH}_4^+$ .

#### Parámetros ruminales

Los valores basales de pH ruminal se encontraron sobre el intervalo de referencia (5,6-7,0), observándose en el Cuadro 1, compatible con la rumia nocturna (Noro *et al.*, 2011). A su vez en el grupo C sus valores bajaron ( $P < 0,05$ ) 1,5 horas posterior a la ingesta de la ración; más tarde se observó una leve disminución

en el pH ruminal en el grupo MN. Al contrario el grupo EN presentó un leve aumento en el pH ruminal a la 1,5 hora de la ración (Cuadro 1; Figura 1a), similar al descrito posterior a una infusión de urea en el rumen (Fernández *et al.*, 2001). El incremento de la fermentación y de la producción de los AGVs acidifica el pH ruminal, a su vez, dietas ricas en proteínas pueden incrementar levemente el pH ruminal (Richardson *et al.*, 2003). Vacas a pastoreo suplementadas con urea (Noro *et al.*, 2012b), así como cabras suplementadas con 10% del N dietético como NNP no modificaron su pH ruminal en relación a sus controles, pero sí lo hicieron cuando fueron sometidas a una carga de urea de 300 mg/kg PV, pH 6,99, (Fernández *et al.*, 2001). Por otro lado, durante el transcurso del experimento se observó descenso de los valores de pH ruminal, más marcado en el grupo MN que en el EN, indicando una adaptación del ambiente ruminal a la suplementación con NNP (Figura 1b).

#### Parámetros urinarios

Los índices de excreción urinaria (IEU) de alantoína, xantina, hipoxantina, ácido úrico y de purinas totales fueron similares en los tres grupos ( $P > 0,05$ ), indicando que la síntesis de proteína microbiana ruminal así como la absorción de ácidos

Cuadro 1. Valores medios de pH ruminal e índices de excreción urinaria (IEU)\* de purinas y ácido orótico en ovinos controles (C) y suplementados 3 veces al día con moderado (MN: 182 mg N/kg<sup>0,75</sup>) y elevado NNP (EN: 425 mg N/kg<sup>0,75</sup>) en la ración.

Parámetro	C	MN	EN	EE*	P Grupo	P Grupo*hora	P Grupo*día
pH ruminal basal	7,12	7,30	7,37	0,08	0,1165	—	—
pH ruminal	6,74 <sup>c</sup>	7,08 <sup>b</sup>	7,26 <sup>a</sup>	0,05	0,0000	0,0118	0,0001
ABC pH ruminal	-1,70	-1,32	-0,34	0,64	0,4229	—	0,3525
IEU purinas total	31,5	27,5	27,4	3,88	0,7060	—	0,3929
IEU alantoína	19,3	17,6	16,7	3,05	0,8337	—	0,6087
IEU hipoxantina	5,78	5,41	6,22	0,53	0,5699	—	0,2146
IEU xantina	4,29	3,22	3,23	0,91	0,6484	—	0,2157
IEU ácido úrico	2,15	1,22	1,28	0,37	0,1791	—	0,6101
IEU ácido orótico	20,5	17,9	20,9	2,97	0,7465	—	0,8567

\*EE= error estándar

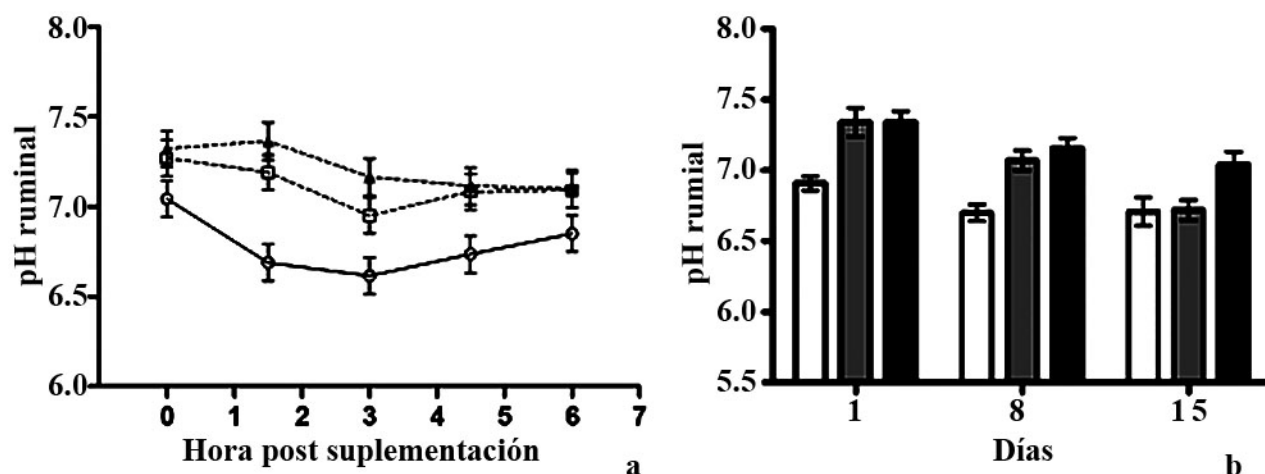


Figura 1. Valores de pH ruminal en ovinos controles (C, a=○, b=□) y suplementados 3 veces al día con moderado (MN: 182 mg N/kg<sup>0,75</sup>, a=□, b=■) y elevado NNP (EN: 425 mg N/kg<sup>0,75</sup>, a=▲, b=■) en la ración.

nucleicos y aminoácidos bacterianos en el intestino fueron similares (Sandoval y Herrera, 1999). Al respecto, ovinos alimentados con un elevado contenido de proteína y energía en la dieta presentaron mayor producción de biomasa microbiana ruminal y un incremento de cinco veces comparado con animales deficitarios en proteína y energía (Puchala y Kusalek, 1992).

El mayor porcentaje de las purinas excretadas fue de alantoína, la cual presentó una asociación con la de xantina ( $r=0,45$ ). La excreción de ácido orótico fue alta y similar entre los tres grupos y se asoció con el IEU de purinas totales ( $r=0,58$ ), principalmente con el de xantina ( $r=0,59$ ) y en menor medida con los de alantoína ( $r=0,47$ ), e hipoxantina ( $r=0,40$ ). La producción y excreción urinaria del ácido orótico aumentó en rumiantes con hiperamonemia experimental, produciendo acidúria orótica cuando se sobrepasa la capacidad hepática para metabolizar  $\text{NH}_4^+$  a urea, como en los casos de excesivo suministro de PB (Motyl *et al.*, 1987). La síntesis de ácido orótico se incrementó en hepatocitos incubados con concentraciones superiores a 0,7 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , sin embargo, la tasa de ureagénesis permaneció constante. Vacas lecheras en inicio de lactación aumentaron la ureagénesis, así como la excreción urinaria de ácido orótico con el aumento del suministro de PB (Motyl *et al.*, 1986).

Los IEU de purinas, asociado a la mantención del peso vivo (PV) de los animales, indicó que la

suplementación con NNP no incrementó la síntesis de proteína microbiana ruminal y consecuentemente la absorción intestinal de aminoácidos que pudiesen afectar los resultados metabólicos.

#### Parámetros metabólicos

Las concentraciones de urea plasmática se incrementaron con la suplementación de NNP, siendo superiores en el grupo EN, intermediarias en el MN e inferiores en el control ( $P<0,05$ ; Cuadro 2). Los grupos tratados presentaron concentraciones de urea sobre el límite superior de referencia para la especie de 10,0 mmol/L (Wittwer, 2012). Las concentraciones de urea plasmática posterior a la ración se mantuvieron constantes en el grupo control ( $P>0,05$ ); a diferencia de los grupos tratados con NNP que aumentaron hasta las 3 horas posterior a la ración, descendiendo a las 6 horas a valores similares al inicial en el grupo MN, manteniéndose elevado en el EN ( $P>0,05$ ; Figura 2a). Al respecto, los corderos suplementados con concentrado presentan las mayores concentraciones de urea plasmática a las 3 o 4 horas posterior a la ingesta del alimento (Richardson *et al.*, 2003), compatible con una mayor absorción de  $\text{NH}_4^+$ , 1 o 2 horas posterior a la ingesta de la ración y a una mayor ureagénesis a las 3 horas (Mackle *et al.*, 1996).

La capacidad ureagénica se maximizó con el transcurso del experimento en los animales tratados con NNP; siendo sus concentraciones de urea superiores en los días 8 y 15 del experimento ( $P<0,05$ )

Cuadro 2. Valores de concentraciones medias y del área bajo la curva a las 6 horas de suministrada la ración (ABC) de indicadores sanguíneos en ovinos controles (C) y suplementados 3 veces al día con moderado (MN: 182 mg N/kg<sup>0,75</sup>) y elevado NNP (EN: 425 mg N/kg<sup>0,75</sup>) en la ración.

Variable	Control	MN	EN	EE*	P Grupo	P Grupo*hora	P Grupo*día
Urea basal (mmol/L)	6,55	6,55	6,64	0,41	0,9830	-	-
Urea (mmol/L)	6,52 <sup>c</sup>	8,27 <sup>b</sup>	11,06 <sup>a</sup>	0,15	0,0000	0,0002	0,0000
ABC urea (mmol/L)	1,25 <sup>c</sup>	5,02 <sup>b</sup>	11,40 <sup>a</sup>	0,95	0,0000	-	0,0528
Creatinina basal (μmol/L)	75,7	83,2	76,7	4,8	0,5056	-	-
Creatinina (μmol/L)	74,8	80,1	77,0	1,6	0,1000	0,9958	0,1364
ABC creatinina (μmol/L*hora)	75,7	83,2	76,7	4,8	0,5056	-	-
Glucosa basal (mmol/L)	3,51	4,11	4,17	0,27	0,2007	-	-
Glucosa (mmol/L)	3,63 <sup>b</sup>	3,81 <sup>ab</sup>	4,05 <sup>b</sup>	0,07	0,0045	0,9561	0,0000
ABC glucosa (mmol/L*hora)	1,27 <sup>a</sup>	0,41 <sup>a</sup>	-1,62 <sup>b</sup>	0,55	0,0114	-	0,0357
Lactato basal (μmol/L)	1,95	1,95	2,23	0,42	0,8630	-	-
Lactato (μmol/L)	1,41	1,14	1,18	0,10	0,2386	0,0030	0,8404
ABC lactato (μmol/L*hora)	0,06	-0,94	-1,68	1,01	0,6026	-	0,6656
βOH-butirato basal (μmol/L)	257	312	238	41,9	0,4594	-	-
βOH-butirato (μmol/L)	286 <sup>a</sup>	257 <sup>a</sup>	190 <sup>b</sup>	10,3	0,0000	0,1998	0,2267
ABC βOH-butirato (μmol/L*hora)	257	248	-65	122	0,2285	-	0,3212
Triacilgliceroles basal (μmol/L)	177	155	175	12	0,3811	-	-
Triacilgliceroles (μmol/L)	183 <sup>a</sup>	145 <sup>c</sup>	162 <sup>b</sup>	4,7	0,0000	0,1918	0,6400
ABC triacilgliceroles (μmol/L*hora)	80,2	42,5	128	47,6	0,5252	-	0,7855
Colesterol basal (mmol/L)	1,06	1,10	1,16	0,11	0,7871	-	-
Colesterol (mmol/L)	1,09	1,04	1,13	0,03	0,1096	0,9587	0,0000
ABC colesterol (mmol/L*hora)	1,06	1,10	1,16	0,04	0,7871	-	-

\*EE= error estándar.

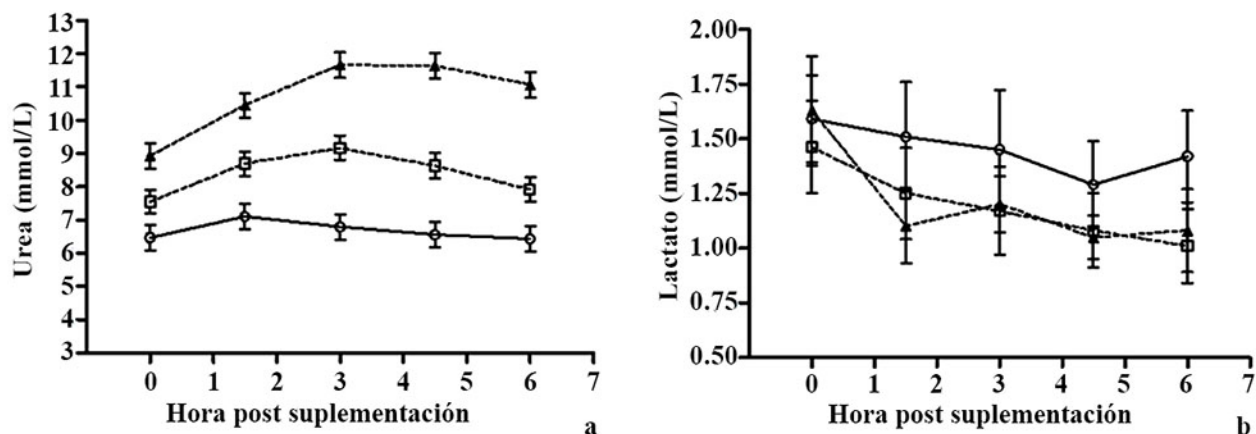


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de urea (a) y lactato (b) posterior a la ración de la mañana en ovinos controles (C, ○) y suplementados 3 veces al día con moderado (MN: 182 mg N/kg<sup>0,75</sup>, □) y elevado NNP (EN: 425 mg N/kg<sup>0,75</sup>, ▲).

comparado con el día 1 ( $P>0,05$ ), y superiores en EN respecto a MN. El grupo C mantuvo constantes sus concentraciones plasmáticas de urea entre los distintos días del ensayo ( $P>0,05$ ; Figura 3a), situación que se explica por el hecho que el organismo requiere de una semana para ajustar sus concentraciones de urea plasmática cuando se incrementa el consumo de compuestos nitrogenados (Brito, 1999). Si bien, ocurre un aumento en la actividad enzimática ureagénica dentro de 24 horas frente al mayor requerimiento en la detoxificación del  $\text{NH}_4^+$  (Chalupa *et al.*, 1970), otros estudios en ratas indicaron que el aumento en la actividad de las enzimas ureagénicas se completa a los 4 a 8 días después de un súbito incremento en la proteína dietética (Schimke, 1962); reafirmando que al primer día de suplementación con NNP los animales del grupo EN cursaron con una hiperamonemia subclínica, habiéndose sobrepasado su capacidad ureagénica.

Cabras infundidas con cargas crecientes de urea incrementaron sus concentraciones de urea plasmática (Fernández *et al.*, 2001), alcanzando valores inferiores a los obtenidos en los grupos tratados con NNP del presente experimento. La concentración observada en el grupo MN fue similar al reportado con una ingesta de 20% de PB en cabras (Harmeyer y Martens, 1980) y las del grupo EN fueron similares a las encontradas en ovinos infundidos por vía ruminal durante 7 días con 13,7 g urea por día (Obara y Dellow, 1993).

La creatininemia fue similar entre los tres grupos, manteniéndose constante posterior a la ingesta de la ración y entre los días de muestreos ( $P>0,05$ ; Cuadro 2).

La glucemia aumentó con el suministro de nitrógeno en la dieta, alcanzando valores sobre el límite superior de referencia para la especie en el grupo EN 2,50 a 4,10 mmol/L (Wittwer, 2012). Cabras sometidas a una creciente carga de urea intrarruminal, similarmente, aumentaron su glucemia (Fernández *et al.*, 2001), lo que estaría relacionado al efecto hiperglucemiante del  $\text{NH}_4^+$  (Barej *et al.*, 1982; Fernández *et al.*, 2001), asociado a la liberación de adrenalina e insulina (Barej *et al.*, 1987; Overton *et al.*, 1999; Visek, 1984). Por el contrario, el  $\text{NH}_4^+$  inhibe la gluconeogénesis en hepatocitos aislados de cabras (Aiello y Armentano, 1987) y de ovinos (Mutsvangwa *et al.*, 1997; Overton *et al.*, 1999).

Ovinos en ayuno infundidos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no cambiaron sus concentraciones de glucagón (Barej *et al.*, 1987). La hiperamonemia periférica estimula la liberación de adrenalina en la medula adrenal (Barej *et al.*, 1987) y disminuye la liberación de insulina pancreática y consecuentemente su concentración plasmática (Fernández *et al.*, 1990) induciendo así la glucogenólisis (Barej *et al.*, 1987). Otra probable causa de la hiperglucemia en casos de hiperamonemia estaría relacionada a una baja utilización de la glucosa por los tejidos extrahepáticos insulino sensitivos, más que por el aumento de la gluconeogénesis. Al respecto, ovinos en ayuno e infundidos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , presentaron concentraciones de insulina inferiores a los infundidos con lactato pero no a los controles (Barej *et al.*, 1987).

Las concentraciones de glucosa plasmática de los días 1 y 8 fueron superiores en los grupos tratados con NNP comparadas con las del grupo C ( $P<0,05$ ; Figura 3 b). A su vez, el día 15 sólo el grupo EN presentó una glucemia superior al control ( $P<0,05$ ). Por otro lado,

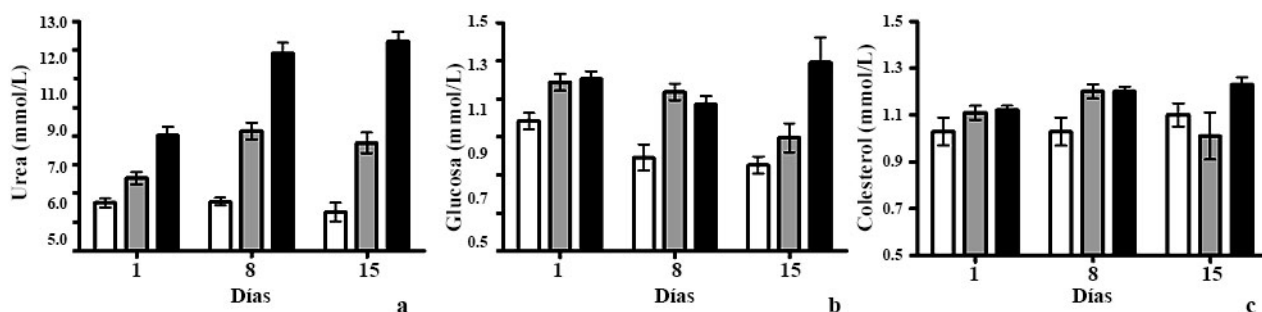


Figura 3. Concentraciones plasmáticas de urea (a), glucosa (b) y colesterol (c) los días 1, 8 y 15 del experimento en ovinos s (C, □) y suplementados 3 veces al día con moderado (MN: 182 mg N/kg<sup>0,75</sup>, ▒) y elevado NNP (EN: 425 mg N/kg<sup>0,75</sup>, ■) en la ración.

la glucemia del día 15 fue inferior a las previas en los tres grupos (Figura 3b), no observándose variaciones entre e intra grupos posterior a la ingesta ( $P>0,05$ ). A su vez, el ABC de la glucosa fue negativo en EN y positivo en MN y control (Cuadro 2). Al respecto, la infusión con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , disminuye la liberación de la glucosa por el hígado (Orzechowski *et al.*, 1988). En vacas se ha observado una disminución de la glucemia en la 3° o 4° hora posterior a la ingesta de la ración, elevándose posteriormente hasta presentar su pico antes de la próxima ración (Andersson, 1988).

La suplementación con NNP no afectó la lactacidemia ( $P>0,05$ ), si bien se observó una disminución posterior a la administración de la ración en los tres grupos ( $P>0,05$ ; Figura 2b). A su vez, la suplementación con compuestos nitrogenados incrementó las concentraciones de lactato plasmático al disminuir la utilización hepática de lactato (Barej *et al.*, 1987). En animales intoxicados con  $\text{NH}_4^+$  dicho aumento se debe a la glucólisis anaeróbica (Visek, 1979). Cabras infundidas con distintas concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0 a 14  $\mu\text{M}/\text{kg}$  PV/min) durante 240 minutos incrementaron sus concentraciones de lactato plasmático, las cuales se mantuvieron elevadas hasta 60 minutos posteriores a la cesación de la infusión, retornando al basal a los 390 minutos (Fernández *et al.*, 2001). Un incremento en el consumo de proteína en la dieta disminuye la actividad de la lactato deshidrogenasa (Schimke, 1962), disminuyendo la síntesis de piruvato vía lactato, incrementando así las concentraciones de lactato en sangre.

El aumento de la glucemia en el presente experimento podría asociarse a una mayor utilización del lactato para la gluconeogénesis. En una experiencia en la que se infundió  $\text{NH}_4^+$  en la vena mesentérica el incremento en la liberación de glucosa hepática no se asoció a la entrada o consumo de lactato por hígado (Barej *et al.*, 1987). Sin embargo, el lactato podría estimular ambos, ureagénesis y gluconeogénesis, al incrementar la síntesis de glutamina en hepatocitos, sirviendo como fuente de aspartato y oxoglutarato (Barej *et al.*, 1987).

La concentración de  $\beta\text{OH}$  butirato plasmático en el grupo EN fue inferior a los otros grupos ( $P<0,05$ ; Cuadro 2), los cuales fueron similares entre sí ( $P>0,05$ ), indicando que la incorporación de un alto contenido de nitrógeno a la dieta favorecería

el metabolismo energético, disminuyendo la movilización de las reservas lipídicas del organismo. No se observaron variaciones en las concentraciones de  $\beta\text{OH}$  butirato plasmático posterior a la ingesta de la ración o entre días en ningún grupo ( $P>0,05$ ). Se ha descrito que un incremento en las concentraciones de  $\beta\text{OH}$  butirato plasmático posterior a la ración es resultado de la producción ruminal de butirato el cual es transformado en parte en la pared ruminal a  $\beta\text{OH}$ -butirato, con concentraciones máximas a las primeras 3 (Noro *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2003) a 6 horas (Andersson, 1988) posterior al pico de consumo de la ración.

La suplementación con NNP disminuyó las concentraciones medias de triacilgliceroles plasmáticos ( $P<0,05$ ; Cuadro 2), sin observarse cambios posterior a la ingesta de la ración, situación que se ha observado en vacas lecheras (Noro *et al.*, 2011). Cabras sometidas a una carga de 300 mg de urea/kg de PV incrementaron sus concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados, indicando la movilización de lípidos con el aporte de NNP (Fernández *et al.*, 2001).

Las colesterolemias medias de los tres grupos se encontraron bajo el intervalo de referencia para la especie, 1,50 a 3,90 mmol/L, (Wittwer, 2012), asociable con la baja ingesta de fibra en la dieta y la consecuente menor producción de acetato ruminal (Demigné *et al.*, 1995). Sus valores fueron similares entre ellos ( $P>0,05$ ; Cuadro 2), manteniéndose constante posterior a la ingesta. Un resultado similar se describe en vacas lecheras a pastoreo que no presentaron variaciones en sus colesterolemias en relación al comportamiento alimenticio (Noro *et al.*, 2011).

Las concentraciones de colesterol plasmático del día 1 del experimento fueron similares entre los tres grupos ( $P>0,05$ ); en el día 8 los grupos tratados con NNP presentaron concentraciones superiores al grupo C ( $P<0,05$ ) y similares entre sí ( $P>0,05$ ) y el día 15 fue superior en el grupo EN comparado con la del grupo MN ( $P<0,05$ ), mientras que la del grupo C fue similar a ambos ( $P>0,05$ ; Figura 3d).

El aporte de nitrógeno en la dieta resultó en una producción de proteína microbiana similar, estimada por la excreción de los derivados de purinas en orina (Sandoval y Herrera, 1999). Sin embargo, el pH ruminal se incrementó en los grupos tratados



con NNP, asociado con una mayor producción de  $\text{NH}_4^+$  ruminal, probablemente por un incremento en la actividad de la ureasa bacteriana (Moore y Varga, 1996). El  $\text{NH}_4^+$  absorbido se metabolizaría a urea, como se deduce por el incremento de las concentraciones plasmáticas de urea a las 3 horas posterior a la ingesta de la ración, con resultados similares a otros estudios efectuados en rumiantes (Noro *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2003). Sin embargo, como las máximas concentraciones de urea en EN fueron alcanzadas el día 8 del experimento, hace suponer que la capacidad ureagénica estuvo sobrepasada en los primeros días de la suplementación con NNP, siendo maximizada a medida que avanzó la suplementación, hecho vinculado a la adaptación de las enzimas ureagénicas (Schimke, 1962).

Durante ese período el  $\text{NH}_4^+$  no metabolizado a urea, sería metabolizado a glutamato y glutamina, o pasaría a circular en la sangre periférica (Newsholme *et al.*, 2003). Por otro lado, el incremento en el aporte de NNP, mejoró el metabolismo energético, observado por el incremento en las concentraciones plasmáticas de glucosa y colesterol, además una coincidente disminución de las concentraciones de  $\beta\text{OH}$ -butirato y triacilglicérols plasmáticos. Otros experimentos relacionaron el incremento de la glucosa *in vivo* a la hiperamonemia, justificado por el efecto del  $\text{NH}_4^+$  sobre la glucogenólisis (Chapa *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2001). A su vez, la mayoría de esos experimentos indican un efecto negativo de la suplementación con NNP sobre el metabolismo energético, asociado a que el exceso de  $\text{NH}_4^+$  en el ambiente celular bloquearía el ciclo de Krebs (Visek, 1979), reduciendo la concentración plasmática de insulina, la utilización periférica de glucosa e incrementando la movilización lipídica (Fernández *et al.*, 2001).

### CONCLUSIONES

Los resultados indican que la suplementación con NNP en la dieta de ovinos en dosis de 182 o 425 mg N/ kg<sup>0.75</sup>, 3 veces al día indujo una alcalinización del pH ruminal sin modificar la excreción de purinas urinarias e incrementó las concentraciones plasmáticas de urea, glucosa y colesterol, reduciendo la de  $\beta\text{OH}$ -butirato. Estos resultados sugieren que el aporte de NNP no modifica la producción de proteína bacteriana, pero incrementa la ureagénesis,

favoreciendo el metabolismo energético, efecto dependiente de la cantidad de NNP suministrado.

### AGRADECIMIENTOS

Al DID-UACH, Proyecto DID-UACH- 2004-11, Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Veterinarias por el financiamiento del ensayo y a Francisco Haro, Constanza González, Marcela Lara, Alvaro Sandoval, Luis Aguirre, Alejandra Silva, por la colaboración en los muestreos.

### LITERATURA CITADA

- Aiello, R. J. and L. E. Armentano. 1987. Gluconeogenesis in goat hepatocytes is affected by calcium, ammonia and other key metabolites but not primarily through cytosolic redox state. *Comp Biochem Physiol B*, 88: 193-201.
- Andersson, L. 1988. Subclinical ketosis in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 4: 233-251.
- Barej, W., J. Harmeyer, H. Drost and H. Libau. 1982. The effect of hyperammonaemia on plasma glucose, insulin, glucagon, and adrenaline levels in sheep. *Zentralbl Veterinarmed A*, 29: 197-206.
- Barej, W., P. Ostaszewski and G. Pierzynowski. 1987. Urea and glucose formation in ovine liver after ammonia and lactate loading *in vivo*. *Ann Rech Vet*, 18: 29-34.
- Brito, A. L. 1999. Avaliação do uso intensivo de cama de frango na alimentação de bovinos: Alguns aspectos toxicológicos e do metabolismo do nitrogênio. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo-SP- Brasil. 235 p.
- Chalupa, W., J. Clark, P. Opliger and R. Lavker. 1970. Detoxication of ammonia in sheep fed soy protein or urea. *J Nutr*, 100: 170-176.
- Chapa, A. M., J. M. Fernandez, T. W. White, L. D. Bunting, L. R. Gentry, T. L. Ward and S. A. Blum. 1998. Influence of intravenous L-carnitine administration in sheep preceding an oral urea drench. *J Anim Sci*, 76: 2937.
- Chen, X. B., E. R. Orskov and F. D. Hovell. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants:

- endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br J Nutr*, 63: 121-129.
- Cherdthong, A. and M. Wanapat. 2010. Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: A review. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 4: 2232-2241.
- Demigné, C., C. Morand, M. Levrat, C. Besson, C. Moundras and C. Révész. 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr*, 74: 209-219.
- Edjtehadi, M., M. Szabuniewicz and B. Emmanuel. 1978. Acute urea toxicity in sheep. *Can J Comp Med*, 42: 68.
- Emmanuel, B., J. R. Thompson, R. J. Christopherson, L. P. Mulligan and R. Berzins. 1982. Interrelationships between urea, ammonia, glucose, insulin and adrenaline during ammonia-urea toxicosis in sheep (*Ovis aries*). *Comp Biochem Physiol A*, 72: 697-702.
- FAO-AIEA, Food and Agriculture Organization -Internacional Atomic energy Association. 1993. Nutricional Metabolite kit protocols. ed. Joint FAO/IAED Division, animal production and Health section.
- Fernández, J., T. Sahlu, S. Hart, M. Potchoiba, H. El Shaer, N. Jacquemet and H. Carneiro. 2001. Experimentally-induced subclinical hyperammonemia in dairy goats. *Small Rum Res*, 42: 5-20.
- Fernández, J. M., W. J. J. Croom, L. P. Tate and A. D. Johnson. 1990. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on hepatic and portal-drained visceral flux of metabolites and regulatory hormones. *J Anim Sci*, 68: 1726-1742.
- Haliburton, J. C. and S. E. Morgan. 1989. Nonprotein nitrogen-induced ammonia toxicosis and ammoniated feed toxicity syndrome. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract*, 5: 237-249.
- Harmeyer, J. and H. Martens. 1980. Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat. *J Dairy Sci*, 63: 1707-1728.
- Helmer, L. G. and E. E. Bartley. 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. *J Dairy Sci*, 54: 25-51.
- Huntington, G. B. and S. L. Archibeque. 1999. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Proc Am Soc Anim Sci*, pp. 1-11.
- Katz, N. R. 1992. Metabolic Heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr*, 122: 843-849.
- Mackle, T. R., C. R. Parr and A. M. Bryant. 1996. Nitrogen fertilizer effects on milk yield and composition, pasture intake, nitrogen and energy partitioning, and rumen fermentation parameters of dairy cows in early lactation. *New Zel J Agric Res*, 39: 341-356.
- Moore, D. A. and G. Varga. 1996. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. *Compendium*, 18: 712-720.
- Motyl, T., W. Barej and H. Leontowicz. 1986. The orotic acid concentration in the blood, milk, and urine of dairy cows fed with urea supplemented diet. *Arch Anim Nutri*, 36: 551-556.
- Motyl, T., A. Orzechowski and S. Pierzynowski. 1987. Urinary orotic acid excretion in hyperammonaemic sheep. I. Effect of portal and peripheral hyperammonaemia. *Zentralbl Veterinarmed A*, 34: 522-528.
- Mutsvangwa, T., J. G. Buchanan-Smith and B.W. McBride. 1997. Effects of ruminally degradable nitrogen intake and in vitro addition of ammonia and propionate on the metabolic fate of L-[1-14C Alanine and L-[15N Alanine in isolated sheep hepatocytes. *J Anim Sci*, 75: 1149-1159.
- Newsholme, P., M. M. Lima, J. Procopio, T. C. Pithon-Curi, S.Q. Doi, R. B. Bazotte and R. Curi. 2003. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res*, 36: 153-163.
- Noro, M., R. Bertinat, A. Yañez, J. C. Slebe and F. Wittwer. 2012a. Non protein nitrogen supplementation increases gluconeogenic capacity in sheep. *Liv Sci*, 149: 243-248.
- Noro, M., R. Bertinat, A. Yañez, J. C. Slebe and F. Wittwer. 2013. Fructose 1,6-bisphosphatase

- and aldolase B location in organs of sheep supplemented with nonprotein nitrogen. *Comp Clin Path* DOI 10.1007/s00580-013-1744-2.
- Noro, M., J. Borkert, G. A. Hinojosa, R. Pulido and F. Wittwer. 2011. Variaciones diarias de metabolitos sanguíneos y su relación con el comportamiento alimenticio en vacas lecheras a pastoreo primaveral. *Rev Cient*, 21: 125-130.
- Noro, M., C. Strieder-Barboza, D. Kuschel, R. G. Pulido and F. G. Wittwer. 2012b. Variaciones diarias de parámetros ruminales y sanguíneos en vacas lecheras a pastoreo de primavera suplementadas con dos fuentes de nitrógeno no proteínico. *Rev Cient*, 21: 154-162.
- Noro, M. and F. Wittwer. 2012. Relationships between ureagenesis and gluconeogenesis in ruminants fed a high content of nitrogen. *Vet Méx*, 42: 143-154.
- Obara, Y. and D. W. Dellow. 1993. Effects of intraruminal infusion of urea, sucrose or urea plus sucrose on plasma urea and glucose kinetics in sheep fed chopped lucerne hay. *J Agric Sci*, 121: 125-130.
- Orzechowski, A., S. Pierzynowski, T. Motyl and W. Barej. 1988. Net hepatic metabolism of ammonia, propionate and lactate in sheep in relation to gluconeogenesis and ureagenesis. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 59: 113-122.
- Overton, T. R., J. K. Drackley, C. J. Ottemann-Abbamonte, A. D. Beauieu, L. S. Emmert and J. H. Clark. 1999. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J Anim Sci*, 77: 1940-1951.
- Puchala, R. and G. W. Kusalek. 1992. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Can J Anim Sci*, 72: 821-830.
- Reynolds, C. K. 1992. Metabolism of nitrogenous compounds by ruminant liver. *J Nutr*, 122: 850-854.
- Richardson, J. M., R. G. Wilkinson and L. A. Sinclair. 2003. Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth and metabolism of lambs. *J Anim Sci*, 81: 1332-47.
- Sandoval, C. C. A. y G. F. Herrera. 1999. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. *Rev Biomed* 10: 241-251.
- Schimke, R. T. 1962. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J Biol Chem*, 237: 459-468.
- Statistix. 2003. Statistix 8.0: User's manual. Analytical software, Tallahassee, FL, USA.
- Visek, W. J. 1979. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. *Nutr Rev*, 37: 273-282.
- Visek, W. J. 1984. Ammonia: Its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J Dairy Sci*, 67: 481-498.
- Wittwer, F., Ed. 2012. *Patología Clínica Veterinaria*. Valdivia, Imprenta América.