

VARIACIONES DIARIAS DE PARÁMETROS RUMINALES Y SANGUÍNEOS EN VACAS LECHERAS A PASTOREO DE PRIMAVERA SUPLEMENTADAS CON DOS FUENTES DE NITRÓGENO NO PROTEÍNICAS

Daily Variations in Ruminal and Blood Parameters of Dairy Cows Grazing Spring Pastures and Supplemented With two Non-protein Nitrogen Sources

Mirela Noro^{1*}, Clarissa Strieder-Barboza^{1,2}, Daniela Kuschel Deramond¹, Rubén Guillermo Pulido³ y Fernando Germán Wittwer Menge¹

¹Instituto Ciencias. Clínicas Veterinarias, ²Universidad Cooperativa de Colombia FMVZ, GROPONTRA, ³Instituto. Ciencia Animal. Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. *E-mail: mirelanoro@gmail.com

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo analizar y comparar las fluctuaciones diarias de las concentraciones de amonio y pH ruminal e indicadores sanguíneos del balance energético y proteínico en vacas lecheras a pastoreo suplementadas con 61,5 g d⁻¹ de nitrógeno no proteínico empleando dos fuentes de nitrógeno. Para ello se asignaron cuatro vacas Holstein Friesian con cánulas ruminales a pastoreo primaveral (*Lolium perene*, proteína cruda [PC] 24%; 2,9 Mcal energía metabolizable [EM] kg⁻¹ materia seca [MS]), alternadamente a tres tratamientos: control (GC); 135g urea d⁻¹, 2x día⁻¹ (GU); 150g d⁻¹ de urea protegida, Optigen II[®], 2x d⁻¹ (GUP). El experimento se realizó en tres periodos de 15 d cada uno, con cuatro repeticiones por tratamiento, donde se determinaron el pH y amonio ruminal y las concentraciones plasmáticas de indicadores energéticos-proteínicos en muestras obtenidas en tiempos predeterminados, previos y posteriores a la suplementación en los días 1, 8 y 15 de cada período experimental. La suplementación con urea incrementó la concentración de amonio ruminal (GC= 26,7; GU= 35,2 y GUP= 30,5 mmol/L), sin afectar su valor de pH, mientras que las concentraciones plasmáticas de urea (GC= 5,68; GU=6,49 y GUP= 6,28 mmol/L) y lactato (GC= 0,67; GU=0,81 y GUP= 0,68 mmol/L) aumentaron, efecto que se vio aminorado al suplementar con urea protegida, grupo que presentó las menores concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AGNE) (GC= 99,5; GU=79,9 y GUP= 73,1 μmol/L). Todos los metabolitos, excepto urea y lactato, presentaron variaciones diarias con las mayores fluctuaciones durante la

mañana, aumentando (amonio ruminal y βOH-butirato plasmático) o disminuyendo (pH ruminal, glucosa y AGNE plasmáticos) con valores más estables posterior a las 11 AM. Se concluye que la suplementación de vacas lecheras en condiciones de pastoreo con 61,5 g d⁻¹ de nitrógeno no proteínico (NNP) como urea aumenta la concentración de amonio ruminal sin afectar su valor de pH y junto a ello incrementa las concentraciones de urea y lactato plasmáticos. Además, la suplementación con NNP no modifica las fluctuaciones diarias que presentan los metabolitos ruminales y plasmáticos, excepto las de amonio ruminal y urea plasmática.

Palabras clave: Suplementación nitrogenada, variaciones diarias, metabolitos sanguíneos, pH ruminal, amonio ruminal

ABSTRACT

An experiment was designed to study in grazing dairy cows supplemented with two sources of nitrogen the daily fluctuations of ruminal ammonia concentration and pH, as well as the blood markers for energy and protein metabolism. Four Holstein Friesian cows with ruminal fistulae and grazing on a spring pasture (*Lolium perene*, crude protein [CP] 24%; 2.9 Mcal metabolizable energy [ME] kg⁻¹ dry matter [DM]) were used in an alternated three groups design: control (GC); 135g urea d⁻¹; 2x d⁻¹ (GU); 150g protected urea, Optigen II d⁻¹; 2x d⁻¹ (GUP). The experiment was distributed on three periods of 15 d each. Ruminal pH and ammonium concentration, together with plasma concentrations of energy and protein markers were determined in samples obtained before and until 16.5 hours (h) of the supplementation in days 1, 8 and 15 of each

experimental period. Nitrogen supplementation induced an increase on ruminal ammonia concentration (GC= 26.7, GU=35.2 and GUP= 30.5 mmol/L) remaining the pH unchanged, meanwhile plasma urea (GC= 5.68; GU=6.49 and GUP= 6.28 mmol/L) and lactate (GC= 0.67, GU=0.81 and GUP= 0.68 mmol/L) concentrations increased in the GU and GUP. The effects were less intensive in GUP who also had the lower plasma non esterified fatty acids (NEFA) concentrations (GC= 99.5, GU=79.9 and GUP= 73.1 μ mol/L). All ruminal and plasma metabolites, with the exception of urea and lactate, show significant daily variations mostly during the morning time, some increasing (ruminal ammonia and plasma β OH-butyrate) other decreasing (ruminal pH, plasma glucose and NEFA), being the last variables most stable after 11 AM. It can be established that a supplementation with 61.5 g/d of nitrogen as urea or protected urea in dairy cows at pasture increases ruminal ammonia concentration meanwhile pH values remains unaffected and increases plasma concentrations of urea and lactate. Besides, NNP supplementation did not affect daily fluctuations of the ruminal and plasma metabolites with the exception of rumen ammonia and plasma urea concentrations.

Key words: Urea supplementation, diurnal variations, blood metabolites, ruminal pH, ruminal ammonia.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) de los alimentos que componen la dieta de los rumiantes se presenta en forma de proteínas, aminoácidos y compuestos nitrogenados no-proteínicos (NNP). Entre estos últimos se destacan la urea, sales de amonio, nitratos y ácidos nucleicos de origen vegetal o animal [7, 14]. En el rumen, gran parte de las proteínas degradables (PD) presentes en los alimentos son digeridas a NNP, principalmente a amonio (NH_4) el cual puede ser utilizado para la síntesis de proteína microbiana (PM) [7]. El NH_4 puede ser incorporado a la PM a tasas superiores al 80%, siempre que en el rumen existan cantidades adecuadas de energía [14]. La asincronía entre la liberación de energía y PD 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 NH_4 ruminal. A su vez, el sincronismo entre la liberación del N y de la energía en el rumen mejora la eficiencia del N dietético para la síntesis de PM [7, 13]. Con la finalidad de sincronizar la producción de NH_4 con la de energía en el rumen se han desarrollado compuestos de liberación controlada de N. Optigen II® es un producto constituido de urea peletizada, recubierta por un polímero biodegradable con una alta concentración de N (41%), que al ser incorporado en la dieta de rumiantes incrementa la utilización de los nutrientes por su lenta liberación en el rumen, optimizando la conversión del N en PM [12].

La dieta predominante en los sistemas de producción ganadero de la zona sur de Chile son las praderas mixtas per-

manentes, las cuales reciben cantidades balanceadas de fertilizantes que incrementan el contenido de N en el forraje, principalmente el N soluble. Esas praderas presentan concentraciones de proteína cruda (PC) de hasta 27%, con un potencial de degradabilidad de aproximadamente un 87% en la primera seis horas (h) y de 97% en las primeras 24 h [38]. El contenido máximo de PC se presenta entre los meses de agosto a octubre, con valores que alcanzan a 30% PC [2]. Alrededor del 15 al 25% de la PC corresponde a NNP y el 75 a 85% restante a proteína verdadera, la cual es altamente degradable en el rumen (70 a 80%) y se asocian frecuentemente a una baja eficiencia de la utilización del N dietético y, a una asincronía con las tasas de liberación de energía [1]. Como consecuencia ocurre un incremento en la concentración de NH_4 en el fluido ruminal, de 4,0 mmol/L con una dieta sincrónica a 14,6 mmol/L con una dieta asincrónica [13] y un flujo de PM al duodeno menor que el que puede estimarse a partir de las cantidades de N y materia orgánica degradables en rumen [35]. Datos locales describen una ineficiente utilización de las proteínas alimentarias con concentraciones de amonio ruminal [30] consideradas muy superiores a las adecuadas (>7,6 mmol/L) [6].

El acumulo de NH_4 ejerce efectos nocivos al metabolismo animal, es por eso que los mamíferos presentan un eficiente mecanismo de conversión a productos de excreción no tóxicos [39]. Seguido de su absorción, el NH_4 llega al hígado, vía vena porta, donde es detoxificado a urea, compuesto 40 veces menos tóxico [14]. El NH_4 restante, no metabolizado a urea, es incorporado a glutamina, la cual contiene dos grupos aminos y transporta al NH_4 en una forma no tóxica, y favorece su excreción urinaria [18].

El ciclo de la urea se integra en los hepatocitos periportales con otras vías energéticas como el ciclo de Krebs y vía gluconeogénica [16] por medio de aminoácidos específicos (aspartato, glutamato, alanina) y oxalacetato [31]. El costo energético de la síntesis de 1 mol de urea puede variar entre 1 a 4 moléculas de adenosin trifosfato (ATP). Se supone que una mayor demanda ureagénica puede alterar la eficiencia energética por demanda de intermediarios o por incremento del gasto de energético del animal [25]. Sin embargo, se han descrito efectos negativos [5, 25] y positivos [20, 21] de la suplementación con NNP en el balance energético.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar y comparar las fluctuaciones diarias de las concentraciones de amonio y pH ruminal e indicadores sanguíneos del balance energético y proteínico en vacas (*Bos taurus*) lecheras a pastoreo y suplementadas con dos fuentes de nitrógeno no proteínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en la Estación Experimental "Vista Alegre", de la Universidad Austral de Chile, ubicado en la comuna 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 húme-

do con influencia mediterránea, con una temperatura media anual de 12°C, una precipitación anual de 1.871 mm y precipitación media de 108 mm y 14 h diarias de luz durante el período del ensayo [8].

Animales y diseño experimental. Se utilizaron cuatro vacas Holstein Friesian, entre 1 a 2 meses de lactancia, 31 ± 3 L leche⁻¹ vaca⁻¹ d⁻¹, 581 ± 50 kg peso vivo (PV), $3,0 \pm 0,15$ de condición corporal, con cánulas ruminales permanentes. Las vacas recibieron una dieta base (TABLA I) consistente de pastoreo *ad libitum* de pradera mixta de primavera (oferta 25 kg materia seca [MS] vaca⁻¹ d⁻¹), con predominio de *Lolium perenne*, y suplementadas con grano entero de maíz (*Zea mays*) hojuelado al vapor, 1,5 kg en el ordeño de la mañana (8:00 h) y 1,5 kg en el ordeño de la tarde (16:30 h). Además, recibieron una mezcla mineral (150 g vaca⁻¹ d⁻¹) mezclada con afrechillo de trigo (*Triticum aestivum*) (200 g d⁻¹), entregada mitad en cada ordeño junto con el maíz hojuelado, y se mantuvieron con acceso a agua *ad libitum*.

El estudio se realizó con cuatro unidades experimentales y tres tratamientos: grupo control no suplementado (GC) y dos grupos suplementados con 61,5 g d⁻¹ de nitrógeno no proteínico, NNP, grupo urea (GU) suplementado con urea (135 g d⁻¹) y grupo urea protegida (GUP) suplementado con urea de liberación controlada (Optigen II®, 150 g d⁻¹). El experimento se realizó en tres períodos de 15 d de duración cada uno, de modo que cada vaca fue incluida alternadamente en los tres tratamientos, totalizando 4 repeticiones por tratamiento. Los grupos GU y GUP fueron isoproteínicos entre sí y la suplementación con la fuente correspondiente de nitrógeno se realizó homogeneizada en la mezcla mineral que fue suministrada con el maíz hojuelado de la mañana y de la tarde. Previo al inicio del estudio, las vacas fueron sometidas a un período de adaptación a

la dieta durante 7 d, siendo alimentadas con la dieta basal. Finalizado cada período experimental, los animales pasaron por un período de descanso de 15 d con la dieta base, por lo que el experimento tuvo una duración de 75 d.

Obtención de muestras y métodos analíticos

Muestras de líquido ruminal. Muestras del líquido ruminal del saco ventral del rumen se obtuvieron a través de la cánula ruminal en el 1^{er}, 8 y 15 días de cada período experimental, a las 7:45h, 9:15h, 10:15h, 11:15h, 12:45h, 14:45h, 15:45h, 17:45h, 19:45h, 22:15h y 00:45h. Inmediatamente posterior a la obtención de la muestra de líquido ruminal se determinó su valor de pH mediante un pHmetro portátil (HI98127 HANNA Instruments®, EUA) calibrado con soluciones buffer de pH 4,0 y 7,0.

Una alícuota de la muestra de líquido ruminal filtrada fue acidificada con H₂SO₄ 50% (1:100), inmediatamente centrifugada a 3.000 g durante 15 minutos (min) (Spectrafuge 7M, Labnet Internacional Inc., EUA), y el sobrenadante almacenado en microtubos que fueron congelados a -20°C (Freezer 420, CFC Free, Consul, Brasil). Al término de la etapa experimental, la concentración de NH₄ se determinó en duplicado mediante colorimetría en un fotocolorímetro Hitachi 4020® (Boehringer Mannheim, Japón) utilizando la reacción de indofenol [4].

Muestras de sangre. Se obtuvo muestras de sangre heparinizadas de cada vaca al 1^{er}, 8° y 15° d de cada período experimental y en los mismos horarios de las muestras de líquido ruminal. Las muestras de sangre se centrifugaron por 10 min a 5.600 g (Centra CL3E, Thermo IEC, EUA) siendo el plasma almacenado en micro tubos de 1,5 mL y congelado a -20°C (Freezer 420, CFC Free, Consul, Brasil) hasta su posterior análisis. Finalizada la etapa experimental, las muestras de

TABLA I
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA PRADERA Y DEL MAÍZ HOJUELADO AL VAPOR HOJUELADO USADOS DURANTE EL ENSAYO. LOS VALORES SON EXPRESADOS EN BASE MATERIA SECA (X ± DE).

Componente	Pradera*	Maíz hojuelado**
Materia seca (%)	14,1 ± 2,3	85,4
Cenizas totales (%)	7,6 ± 0,4	0,94
Proteína bruta (%)	24,2 ± 1,1	7,74
Extracto etéreo (%)	—	2,64
Energía metabolizable (Mcal/kg MS)	2,89 ± 0,06	3,46
Fibra detergente neutro (%)	32,4 ± 3,7	10,9
Fibra detergente ácida (%)	22,1 ± 2,7	2,18
Carbohidratos solubles (g/kg)	121 ± 9,6	—
Calcio (%)	0,59 ± 0,07	—
Fósforo (%)	0,33 ± 0,03	—
Magnesio (%)	0,26 ± 0,01	—
Potasio (%)	2,8 ± 0,3	—

*Media (±DE) de 7 muestras de pradera recolectadas durante el período del ensayo; **muestra compuesta.

plasma se descongelaron y se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa (GOD-PAP, Human®), lactato (LOD, Sentinel®), urea (GLDH, Human®), β OH-butilato (Ranbut, Randox®) y ácidos grasos no esterificados (AGNE, NEFA, Wako®) en un analizador automático Metrolab 2300® (Wiener Lab, Argentina).

Análisis estadístico. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y homocedasticidad mediante la prueba de Bartlett [28]. Los datos fueron analizados por un modelo lineal general de AOC/AOCV, considerando como factores el efecto de la suplementación, y sus interacciones entre hora y el día de muestreo: $y_{ijk} = \mu + N_i + NH_{ij} + ND_{ik} + \varepsilon_{ijk}$; donde y_{ijk} = variable dependiente, μ = media general, N_i = efecto de la fuente nitrogenada i-ésimo, NH_{ij} : efecto interacción hora día i-ésimo y fuente nitrogenada i-ésimo; ND_{ik} : efecto interacción día k-ésimo y fuente nitrogenada i-ésimo; ε_{ijk} : error experimental; utilizando como variables de covarianza la unidad experimental y el período del ensayo. Las diferencias fueron contrastadas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey [26]. Se consideró un nivel de significación del 95% [27] utilizando el software Statistix 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN, EUA) [36].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros ruminales. La suplementación con 61,5 g d⁻¹ de NNP incrementó en aproximadamente 2,5% el contenido de PC de la dieta de las vacas, aumento que no modificó el pH ruminal de los grupos GU y GUP comparado al grupo control ($P > 0,05$; TABLA II), sin embargo, todos los grupos presentaron un descenso de sus valores de pH ruminal durante el transcurso del día, siendo más marcado después de la suplementación con el concentrado de la mañana (FIG. 1a). Tampoco se observaron cambios en los valores de pH ruminal en vacas Holstein, con una dieta a base de heno (*Lolium perene*, 8,5% PC MS) y suplementadas con 250 mg kg⁻¹ pv de urea o

urea-cálcica intraruminal [15]. Sin embargo, otros autores describieron incrementos en el pH ruminal en cabras [9] o vaquillas [37] suplementadas con urea. El descenso del pH ruminal, desde la 1 h posterior a la ración de la mañana, observado en los animales suplementados y controles se asociaría a la mayor ingesta durante la mañana, con consecuente incremento de la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) [32]. Otros estudios realizados en sistemas de pastoreo en el sur de Chile demostraron resultados similares, donde los menores valores de pH ruminal se observaron al final de la tarde [33] asociados al mayor consumo en la mañana e inicio de la tarde con una disminución en la rumia [22, 30], y al incremento del contenido de carbohidratos solubles en la pradera durante la tarde [34].

La suplementación con urea como fuente de NNP incrementó las concentraciones de NH₄ ruminal ($P < 0,05$; TABLA II), permaneciendo altas durante todo el transcurso del día. La suplementación con urea protegida, GUP, produjo un aumento similar posterior a ambas suplementaciones de la mañana y de la tarde, incrementándolas hasta alcanzar el pico de las concentraciones de NH₄ a las 9:15h y 19:45h ($P < 0,05$; FIG. 1b) para luego disminuir a valores similares al GC ($P > 0,05$; FIG. 1b). Las mayores y sostenidas concentraciones de NH₄ ruminales en GU en comparación con GUP se asoció a la rápida solubilidad de la urea en el rumen y a su reciclaje en la saliva, a diferencia del GUP que presentó una solubilidad más lenta. Al respecto se señala que, vacas suplementadas con NNP presentaron el pico de las concentraciones de NH₄ ruminal en la primera h posterior a la ingesta del alimento [13]; sin embargo este pico puede ocurrir entre media a tres h, según el tipo de alimento [7].

El pH ruminal se asocia con la concentración de NH₄ ruminal ya que influye en su producción y absorción. Es así que la mayor producción de NH₄ se presenta cuando el pH ruminal se sitúa entre 6,0 y 6,7, asociado al estímulo sobre la actividad de la ureasa bacteriana (EC 3.5.1.5) [19]. Por otra parte, la absorción del amoníaco aumenta con la alcalinidad ruminal

TABLA II

VALORES ($X \pm DE$)[#] DEL pH RUMINAL Y CONCENTRACIONES DE AMONIO RUMINAL Y DE METABOLITOS PLASMÁTICOS EN VACAS LECHERAS A PASTOREO SUPLEMENTADAS CON 61,5 g D⁻¹ DE NNP COMO UREA O UREA PROTEGIDA.

	Control	Urea	Optigen II	EE	P NNP*	P NNP*hora	P NNP*día
pH	6,28	6,32	6,30	0,03	0,6785	<0,0001	<0,0001
Amonio mmol/L	26,9b	35,2a	30,5b	1,37	0,0003	<0,0001	<0,0001
Urea mmol/L	5,68b	6,49a	6,28ab	0,17	0,0022	0,8905	<0,0001
Glucosa mmol/L	4,22a	4,10ab	4,04b	0,04	0,0029	0,0002	0,0078
Lactato mmol/L	0,67b	0,81a	0,68b	0,04	0,0329	0,0561	0,1415
AGNE μ mol/L	99,5a	79,9ab	73,1b	8,06	0,0455	<0,0001	<0,0001
β OH-butilato mmol/L	0,65	0,64	0,66	0,02	0,5464	<0,0001	<0,0001

*NNP: efecto suplemento; h: hora post suplementación; d: día experimental; †AGNE: ácidos grasos no esterificados.

Media referente a 132 muestras.

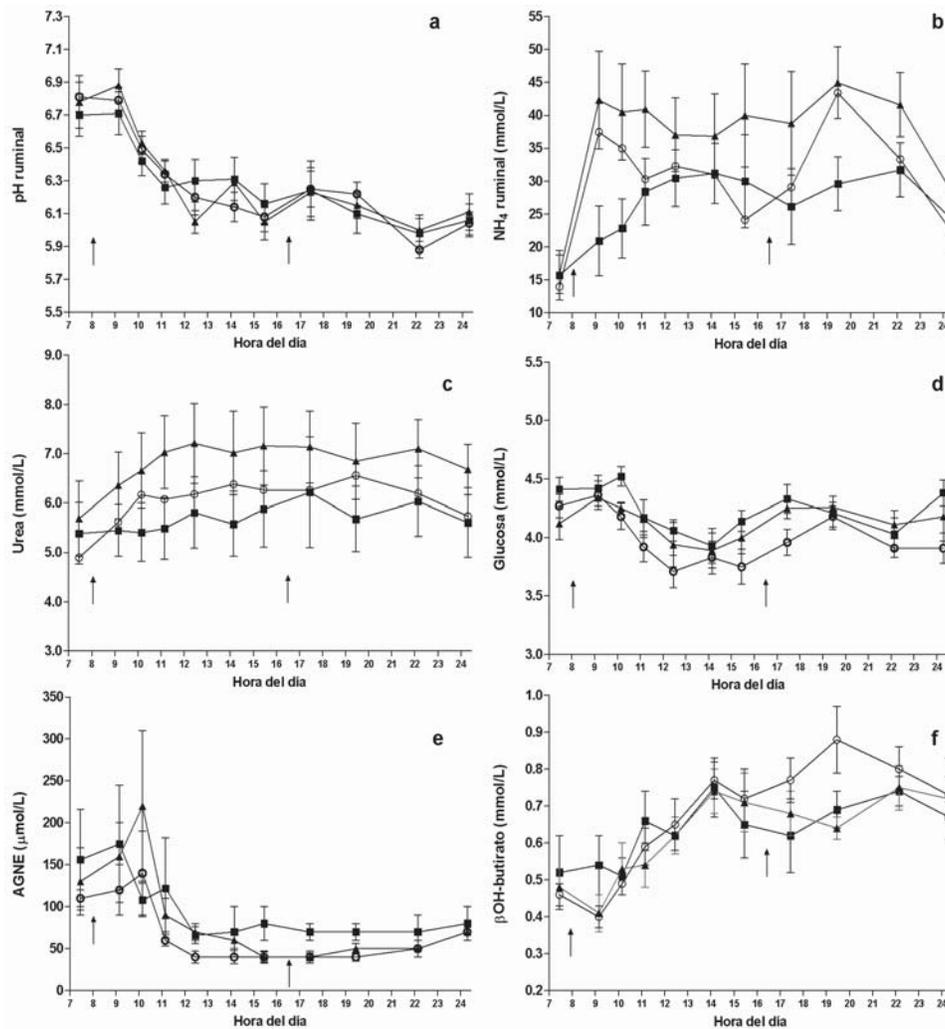


FIGURA 1. VARIACIONES DIARIAS DEL pH RUMINAL^(a), CONCENTRACIÓN RUMINAL DE AMONIO^(b) Y CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE UREA^(c), GLUCOSA^(d), ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (AGNE)^(e) Y BOH BUTIRATO^(f), EN VACAS LECHERAS A PASTOREO PRIMAVERAL (■) SUPLEMENTADAS (†) CON 61,5 g d⁻¹ DE NNP COMO UREA (▲) O UREA PROTEGIDA (○).

[1, 14]. Los valores de pH ruminal observados durante la mañana se encontraron sobre 6,3, por lo cual se esperaría una mayor producción y absorción de NH₄; mientras que en la tarde se encontraron bajo 6,2 indicando una menor producción y absorción. Cabe recalcar que a valores de pH ruminal iguales o inferiores a 6,5, el N amoniacal se absorbe principalmente como NH₄ través de canales de K, donde su flujo interactúa competitivamente con el K luminal [1]. Por ese motivo, la absorción de NH₄ puede estar reducida con valores de pH ruminal <6,4 y con altas concentraciones de K [1], como lo observado en el presente ensayo, aumentando consecuentemente sus concentraciones ruminales.

Por otro lado, al día 8 del ensayo los grupos suplementados con NNP presentaron un descenso del pH e incremento de las concentraciones de NH₄ ruminales en comparación con el día 1 (P<0,05; FIG. 2a y b, respectivamente), siendo, al día 8, las concentraciones de NH₄ ruminales superiores (P<0,05)

en el grupo GU comparada con el grupo GC y GUC, los cuales presentaron valores similares entre sí (P>0,05). A su vez, el grupo control acidificó su pH ruminal al día 15 comparado al 1 (P<0,05; FIG. 1a), presentando valores inferiores a los otros grupo al día 15, y sin cambiar sus concentraciones de NH₄ ruminales (FIG. 2b); situación atribuye al incremento de las tasas fermentativas ruminales asociado a un incremento de la calidad de la pradera [30].

Las concentraciones de NH₄ ruminal consideradas óptimas para proveer la máxima síntesis de PM y tasas de fermentación ruminal variaron en un intervalo de 1,2 a 7,7 mmol/L y 1,8 a 14,7 mmol/L, respectivamente [6]. En el presente estudio se observó un elevado número de muestras (n=25) con concentraciones de NH₄ ruminal superiores a 55 mmol/L, las cuales se relacionarían a intoxicaciones agudas por NH₄ [17]. De ellas, el 52% eran de GU, donde la concentración más elevada alcanzó los 89 mmol/L. Cuando las concentraciones ruminales de amo-

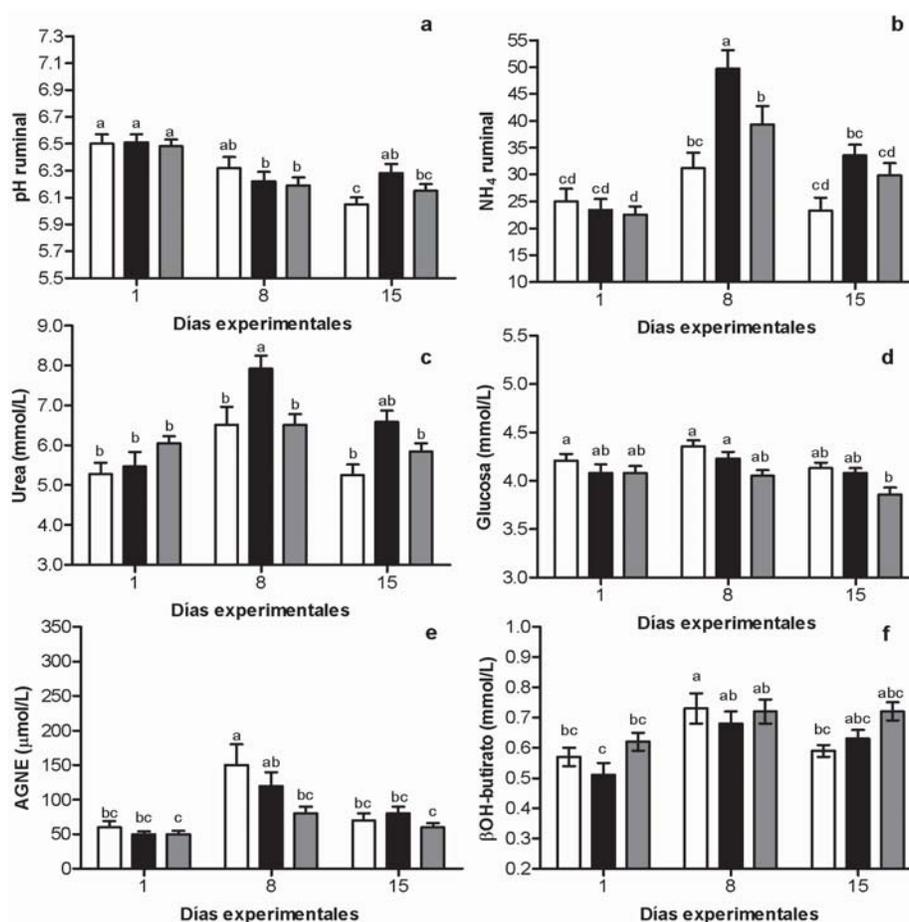


FIGURA 2. VALORES DE pH^(a) Y AMONIO^(b) RUMINALES Y DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE INDICADORES ENERGÉTICOS^(c, d, e, f) EN VACAS LECHERAS A PASTOREO (□) SUPLEMENTADAS DURANTE 15 DÍAS CON 61,5 g d⁻¹ DE NNP COMO UREA (■) O UREA PROTEGIDA (▒).

no exceden a los 30 mmol/L ocurre hiperamonemia sistémica y concentraciones mayores a 60 mmol/L sobrepasan la capacidad de detoxificación hepática del NH₄, generando una intoxicación subclínica por amonio [17].

Parámetros sanguíneos. Las concentraciones de urea plasmática de GU fueron superiores a las de GC (P<0,05; TABLA II). El GUP presentó concentraciones plasmáticas de urea similares a los otros grupos (P>0,05, TABLA II). A su vez, no se observaron variaciones dentro de un mismo grupo en el transcurso del día (P>0,05; TABLA II).

El incremento de la concentración de urea en GU comparado al GC se debió a la mayor producción y absorción de NH₄ ruminal, producto de la mayor ingesta de NNP de rápida solubilidad ruminal con el consecuente asincronismo entre el aporte de N y la disponibilidad de energía en el rumen [7, 35]. A diferencia de ello, el grupo GUP no presentó este incremento respecto al GU, lo que señala que la liberación ruminal del N es más lenta lográndose así una mejor sincronía con la energía ruminal. Se describe que a mayor producción de NH₄ ruminal, mayor es la absorción y entrada de NH₄ al hígado, incrementando con ello la ureagénesis y consecuentemente la concentra-

ción de urea plasmática [3]. Es así que la concentración de urea plasmática observada desde las 12:45 h hasta las 22:15 h en el GU, alcanzó a valores sobre el límite superior de referencia de >7,0 mmol/L [23], señalando que la rápida solubilidad de la urea, produjo pérdidas de nitrógeno y consecuentemente redujo la eficiencia de síntesis, como se observa en dietas asincrónicas [13, 35]. Al respecto, vacas pastoreando praderas de primavera en el sur de Chile [22] o corderos (*Ovis aries*) suplementados con concentrado presentaron las mayores concentraciones de urea plasmática a las 3 o 4 h posterior a la ingesta del alimento [32]. Este aumento es compatible con una mayor absorción de amonio, a la 1 o 2 h [11] y una mayor ureagénesis a las 3 h posterior a la ingesta de la ración [5]. Por otro lado, las concentraciones de urea en el grupo GU se incrementaron al día 8 de ensayo, comparado al día 1, siguiendo la misma tendencia de las concentraciones de NH₄ ruminales; a su vez los otros grupos no cambiaron sus concentraciones de urea durante el transcurso del ensayo (P>0,05; FIG. 2c).

Las concentraciones plasmáticas de glucosa fueron inferiores en GUP que en GC (P<0,05), el grupo GU presentó una glucemia semejante a los otros grupos (P>0,05; TABLA II). Si bien la glucemia presentó un comportamiento similar en los

tres grupos con variaciones diarias levemente menores al medio día, el GC presentó una glucemia superior a los grupos suplementados posterior a la suplementación de la mañana (9:15h) ($P < 0,05$), para luego de 2 h disminuir a valores similares a los otros grupos ($P > 0,05$; FIG. 1d). Mientras que la suplementación con N como urea protegida disminuyó la concentración de glucosa plasmática 1 h post suplementación de la tarde ($P < 0,05$; FIG. 1d) en comparación a los otros grupos. Por otro lado no se observó diferencias entre las glucemias entre días dentro de un mismo grupo, como entre grupos dentro de un mismo día (FIG. 2c).

Si bien no se observó una asociación entre las concentraciones de glucosa y urea plasmáticas se describe que la hiperamonemia induce una hiperglucemia [10, 20, 24, 25] asociado a la glucogenólisis hepática, reducción de la utilización de glucosa y secreción disminuida de insulina [10]. Sin embargo, en el presente estudio, las concentraciones plasmáticas de NH_4 no fueron analizadas, a su vez las altas concentraciones de NH_4 ruminal de un número elevado de muestras, sugiere que podría haber ocurrido una hiperamonemia subclínica.

Las concentraciones plasmáticas de lactato fueron superiores ($P < 0,05$) en GU que en GC y GUP, los cuales fueron similares entre sí ($P > 0,05$; TABLA II), permaneciendo constantes a lo largo del día y entre los días experimentales en los tres grupos ($P > 0,05$; TABLA II). El aumento de las concentraciones plasmáticas de lactato en GU podría asociarse a una baja utilización periférica o a la glucogenólisis [10], y en animales intoxicados por NH_4 se atribuye a la glucólisis anaeróbica [39] y disminución de la utilización hepática del lactato [5], hecho que es concordante con resultados de otros estudios con animales tratados con urea [20]. Por otro lado, cabe señalar que, la infusión ruminal de urea no modifica la fermentación ruminal o la producción de AGVs [24].

La suplementación con urea protegida disminuyó las concentraciones plasmáticas de AGNE ($P < 0,05$; TABLA II) en comparación al GC, indicando una menor movilización de lípidos en el animal. El GU presentó concentraciones de AGNE intermediarias y similares a los otros grupos ($P > 0,05$; TABLA II). Los grupos GC y GUP mantuvieron constantes sus concentraciones de AGNE en el transcurso del día ($P > 0,05$), a su vez la utilización de urea como fuente de NNP produjo un pico en las concentraciones de AGNE aproximadamente 2 h posterior a la suplementación de la mañana (10:15 h) (FIG. 1e), situación que sugiere una mayor movilización lipídica en este período que podría estar relacionado a la mayor demanda energética para la ureagénesis hepática asociada al incremento de NH_4 ruminal, situación descrita en cabras sometidas a una carga de 300 mg de urea kg^{-1} PV [9]. Por otro lado el grupo GC presentó un incremento de las concentraciones de AGNE al día 8

comparado al 1 y 15 del ensayo, ocasión en la cual sus concentraciones fueron superior ($P < 0,05$) al GUP (FIG. 2e).

La suplementación con NNP no modificó la concentración plasmática de βOH -butirato respecto al control ($P > 0,05$; TABLA II). Los tres grupos incrementaron sus concentraciones de βOH -butirato ($P < 0,05$) posterior a la alimentación de la mañana. GUP incrementó sus concentraciones de βOH -butirato desde previo (15:45 h) hasta cerca de 3h (19:45 h) después de la suplementación de la tarde, alcanzando en este período valores superiores ($P < 0,05$) a los otros grupos (FIG. 1f). Resultados similares se observaron a las 3 a 4 h posterior al pico de la ingesta de alimento en vacas a pastoreo en sur de Chile [22] o en corderos [32]. El incremento en todos los grupos de las concentraciones de βOH butirato plasmático posterior a la ración sería el resultado de la producción ruminal de butirato el cual es transformado en parte en la pared ruminal a βOH -butirato o bien a una mayor síntesis hepática de butirato por balance energético negativo [29]. Por otro lado GC y GU incrementaron sus concentraciones de βOH butirato plasmático al día 8 en comparación con el 1 ($P > 0,01$; FIG. 2f), sin presentar diferencias dentro de un mismo día ($P > 0,05$).

En general se puede apreciar que en las vacas lecheras, todos los metabolitos evaluados, con la excepción del lactato y urea plasmáticos presentaron variaciones significativas durante el día, siendo éstas más marcadas durante la mañana, hasta las 11 h, sin un efecto marcado por la suplementación nitrogenada, a excepción de la urea plasmática. Esta situación indica que el horario de muestreo más adecuado para la evaluación metabólica en vacas a pastoreo sería posterior a dicha hora. Por otro lado, el efecto del día post suplementación no demostró ser un factor importante en la respuesta metabólica de las vacas suplementadas con NNP, excepto las concentraciones de urea plasmática en el grupo GU que incrementaron al día 8 asociado al aumento de las concentraciones de NH_4 ruminales, atribuible a la mayor asincronía ruminal por un cambio de flora microbiana [30]; a su vez la mayor ureagénesis en el día 8, no afectó los indicadores de metabolismo energético sanguíneo, indicando que el exceso de NNP en la dieta no sería un factor deletéreo al balance energético de vacas lecheras a pastoreo.

CONCLUSIONES

Se concluye que la suplementación a vacas lecheras a pastoreo con 61,5 g d^{-1} de NNP en la forma de urea aumenta la concentración de NH_4 ruminal sin afectar su valor de pH y junto a ello incrementa las concentraciones plasmáticas de urea y lactato. Además, la suplementación con NNP no modifica las fluctuaciones diarias de los metabolitos ruminales y sanguíneos, excepto las de NH_4 ruminal y urea plasmática.

AGRADECIMIENTO

Al apoyo de los proyectos FONDECYT 11001513 y DID-UACH S-47-2009.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDOUN, K.; STUMPFF, F.; MARTENS, H. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. **Anim. Health Res. Rev.** 7: 43-59. 2006.
- [2] ANRIQUE, R.; FUSCHSLOCHER, R.; IRAIRA, S.; SALDAÑA, R. Tablas de Composición. En: **Composición de alimentos para el ganado bovino**. 4 Ed., Valdivia: Imprenta America. Pp 18-62. 2010.
- [3] ANTONELLI, A.C.; TORRES, G.A.S.; MORI, C.S.; SOARES, P.C.; MARUTA, C.A.; ORTOLANI, E.L. Intoxicação por amônia em bovinos que receberam uréia extrusada ou granulada: alterações em alguns componentes bioquímicos do sangue. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 46: 69-76. 2009.
- [4] BAL, M.A.; SHAVER, R.D.; JIROVEC, A.G.; SHINNERS, K.J.; COORS, J.G. Crop processing and chop length of corn silage: effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **J. Dairy Sci.** 83: 1264-1273. 2000.
- [5] BAREJ, W.; OSTASZEWSKI, P.; PIERZYNOWSKI, G. Urea and glucose formation in ovine liver after ammonia and lactate loading in vivo. **Ann. Rech. Vet.** 18: 29-34. 1987.
- [6] BOUCHER, S.E.; ORDWAY, R.S.; WHITEHOUSE, N.L.; LUNDY, F.P.; KONONOFF, P.J.; SCHWAB, C.G. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. **J. Dairy Sci.** 90: 5619-5633. 2007.
- [7] CHERDTHONG, A.; WANAPAT, M. Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: A review. **Aust. J. Basic Appl. Sci.** 4: 2232-2241. 2010.
- [8] DIRECCIÓN METEOROLÓGICA DE CHILE. Informe de precipitaciones. 2010. En línea: <http://www.meteo-chile.cl/precipitacion.html>. 20 diciembre, 2010.
- [9] FERNÁNDEZ, J.; SAHLU, T.; HART, S.; POTCHOIBA, M.; EL SHAER, H.; JACQUEMET, N.; CARNEIRO, H. Experimentally-induced subclinical hyperammonemia in dairy goats. **Small Rum. Res.** 42: 5-20. 2001.
- [10] FERNÁNDEZ, J.M.; CROOM JR, W.J.; JOHNSON, A.D.; JAQUETTE, R.D.; EDENS, F.W. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentrations. **J. Anim. Sci.** 66: 3259-3266. 1988.
- [11] GUSTAFFSON, A.H.; PALMQUIST, D.L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **J. Anim. Sci.** 76: 475-484. 1993.
- [12] HARRISON, G.A.; KARNEZOS, T.P. Can we improve the efficiency of nitrogen utilization in the lactating dairy cow? Recent Adv. **Anim. Nutr. Aust.** 15: 145-154. 2005.
- [13] HENNING, P.H.; STEYN, D.G.; MEISSNER, H.H. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. **J. Anim. Sci.** 71: 2516-2528. 1993.
- [14] HUNTINGTON, G.B.; ARCHIBEQUE, S.L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.** 1-11, 1999.
- [15] HUNTINGTON, G.B.; HARMONB, D.L.; KRISTENSEN, N.B.; HANSON, K.C.; SPEARS, J.W. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. **Anim. Feed Sci. Tech.** 130: 225-241. 2006.
- [16] KATZ, N.R. Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. **J. Nutr.** 122: 843-849. 1992.
- [17] LEWIS, D.; BUTTERY, P.J. Ammonia toxicity in ruminants. In: **Production disease in farm animals**, J.M.H. Paine, B.F. Sansom (Eds). Baillière Tindall: London. Pp. 201-211. 1977.
- [18] MAZZAFERRO, E.; HACKETT, T.; WINGFIELD, W.; OGILVIE, G.; FETTMAN, M. Role of glutamine in health and disease. **Compend.** 22: 1094-1103. 2000.
- [19] MOORE, D.A.; VARGA, G. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. **Compend.** 18: 712-720. 1996.
- [20] NORO, M. Gluconeogénesis hepática en ovinos (*Ovis aries*) alimentados con una dieta alta en nitrógeno no proteico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile: Valdivia, Chile. Tesis Doctoral. 176pp. 2006.
- [21] NORO, M.; BARBOZA, C.S.; BENITEZ, O.; PULIDO, R.; WITWERT, F. Capacidad gluconeogénica vía propionato en vacas lecheras pastoreando alta o moderada oferta de pradera y suplementadas con dos fuentes de nitrógeno. **XXXV Reunión anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal**. Coyhaique 10/27-29. Chile. Pp 137-138. 2010.
- [22] NORO, M.; BORKERT, J.; HINOSTROZA, G.A.; PULIDO, R.; WITWERT, F. Variaciones diarias de metabolitos sanguíneos y su relación con el comportamiento alimenticio en vacas lecheras a pastoreo primaveral. **Rev. Cient.** XXI(2): 125-130. 2011.
- [23] NORO, M.; WITWERT, F. Utilidad de la determinación de la urea en la leche. **Vetermás.** 2: 2-5. 2003.

- [24] OBARA, Y.; DELLOW, D.W. 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. 1993.
- [25] OVERTON, T.R.; DRACKLEY, J.K.; OTTEMANN-ABBAMONTE, C.J.; BEAUIEU, A.D.; EMMERT, L.S.C., J.H. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. **J. Anim. Sci.** 77: 1940-1951. 1999.
- [26] PETRIE, A.; WATSON, P. Hypothesis test 2- The F-test: Comparing two variance or more than two means. In: **Statistics for Veterinary and Animal Science**. A. Petrie, P. Watson (Eds.). Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 93-106. 2006.
- [27] PETRIE, A.; WATSON, P. An introduction to hypothesis testing. In: **Statistics for Veterinary and Animal Science**. A. Petrie, P. Watson (Eds.). Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 73-82. 2006.
- [28] PETRIE, A.; WATSON, P. Probability and probability distributions. In: **Statistics for Veterinary and Animal Science**. A. Petrie, P. Watson (Eds.). Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 28-44. 2006.
- [29] PIATKOWSKI, B. Digestión y conversión de los carbohidratos. En: **El aprovechamiento de los nutrientes en el rumiante**, B. Piatkowski, (Ed). Hemisferio Sur: Buenos Aires. Pp 215-229. 1982.
- [30] PULIDO, R. Dinámica del nitrógeno amoniacal y pH ruminal en vacas a pastoreo. En: **Rumen: Morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa**. P.A. Contreras, M. Noro (Eds.). América: Valdivia. Pp 61-68. 2010.
- [31] REYNOLDS, C.K. Metabolism of nitrogenous compounds by ruminant liver. **J. Nutr.** 122: 850-854. 1992.
- [32] RICHARDSON, J.M.; WILKINSON, R.G.; SINCLAIR, L.A. 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: 1332-1347. 2003.
- [33] SCANDOLO, D.; NORO, M.; BOHMWALD, H.; CONTRERAS, P.A.; WITTEWER, F. Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. **Arch. Med. Vet.** 39: 141-146. 2007.
- [34] SHEWMAKER, G.E.; MAYLAND, H.F.; ROBERTS, C.A.; HARRISON, P.A.; CHATTERTON, N.J.; SLEPER, D.A. Daily carbohydrate accumulation in eight tall fescue cultivars. **Grass Forage Sci.** 61: 413-421. 2006.
- [35] SINCLAIR, L.; GARNSWORTHY, P.; NEWBOLD, J.; BUTTERY, P. Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep. **J. Agric. Sci.** 120: 251-263. 1993.
- [36] STATISTIX. Statistix 8.0: User's manual. Tallahassee, FL, USA. Pp 225-277. 2003.
- [37] TAYLOR-EDWARDS, C.C.; ELAM, N.A.; KITTS, S.E.; MCLEOD, K.R.; AXE, D.E.; VANZANT, E.S.; KRISTENSEN, N.B.; HARMON, D.L. Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. **J. Anim. Sci.** 87: 209-221. 2009.
- [38] VALDERRAMA, X.P. Dinámica de degradación ruminal de alimentos para rumiantes. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile: Valdivia. Tesis de Grado. Pp 135. 1993.
- [39] VISEK, W.J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutr. Rev.** 37: 273-282. 1979.