

**Interrelaciones entre ureagénesis
y gluconeogénesis hepática en rumiantes alimentados
con elevado contenido de nitrógeno**



**Relationships between liver ureagenesis
and gluconeogenesis in ruminants fed
with a high nitrogen diet**

Mirela Noro* Fernando Wittwer*

Abstract

Liver ureagenesis and gluconeogenesis are essential metabolic functions in ruminants. These metabolic processes are more intensive in ruminants than other mammals, especially on grazing ruminants or those supplemented with nitrogen because they absorb large amount of the ammonia produced in the rumen and only small amounts of the intestinal glucose. Diets based on the use of forages with a high content of crude protein, rapidly degradable in the rumen, or the supplementation with non-protein nitrogen, increases the ruminal production of ammonia. The excess of ammonia is absorbed and metabolized to urea by the liver. The production of large amounts of ammonia in the rumen and its subsequent absorption can exceed the liver capacity to metabolize urea causing an overcharge in the urea cycle, demanding a large amount of α -ketoglutarate and oxalacetate to produce glutamate and aspartate. Under this condition the gluconeogenic capacity of the organism is altered because these metabolites are also required in the Krebs cycle and gluconeogenesis. The relationships between liver ureagenesis and gluconeogenesis in ruminants fed a high content of nitrogen are reviewed.

Key words: UREAGENESIS, GLUCONEOGENESIS, NON PROTEIN NITROGEN, RUMINANTS.

Resumen

Los rumiantes alimentados con forrajes de elevado contenido de proteína rápidamente degradable en el rumen o suplementados con nitrógeno no proteínico, absorben cantidades sustanciales de amonio en el rumen y muy poca glucosa en el intestino, en circunstancias que requieren mantener una adecuada capacidad ureagénica y gluconeogénesis para sostener su eficiencia productiva. En esta condición se eleva la producción de amonio ruminal, el cual se absorbe y posteriormente se metaboliza por el hígado en urea. Las elevadas concentraciones de amonio en el rumen pueden sobrepasar la capacidad hepática de sintetizar urea, lo que provoca una sobrecarga en el ciclo de la urea y demanda una excesiva cantidad de α -cetoglutarato y oxalacetato para la formación de glutamato y aspartato, metabolitos que también son requeridos en el ciclo de Krebs y en la vía gluconeogénica, alterando con ello la capacidad gluconeogénica del organismo. El trabajo recopila y analiza las interrelaciones entre la ureagénesis y gluconeogénesis hepática en rumiantes en condiciones de pastoreo con forrajes de elevado contenido de proteínas.

Palabras clave: UREAGÉNESIS, GLUCONEOGÉNESIS, NITRÓGENO NO PROTEÍNIC, RUMIANTES.

Recibido el 28 de febrero de 2011 y aceptado el 20 de octubre de 2011.

*Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile (UACH), Casilla 567.

Responsable de correspondencia: Mirela Noro, tel.fax: 5663 221457, correo electrónico: mirelanoro@gmail.com

Introduction

Ruminant fed diets with a high content of crude protein, rapidly degradable in the rumen, increase the production of ruminal ammonia, which is absorbed and then metabolized to urea by the liver. Ureagenesis is linked to the Krebs cycle and to hepatic gluconeogenesis through metabolites such as: aspartate, oxaloacetate, ketoglutarate and glutamate. The high concentrations of ammonium in the rumen produce an overcharge on ureagenesis due to the excessive demand of intermediaries of the urea cycle that come from precursors shared with the Krebs cycle and the gluconeogenic path. Therefore, the increase in the production of ruminal ammonium compromises the ureagenic capacity of the liver, interfering on the hepatic gluconeogenesis and the energy balance of the animal.

Protein degradability in ruminants

The dietary nitrogen (N) of the ruminant is present in the food as proteins, amino acids and non-protein nitrogen compounds (NNP). Among these, urea, ammonia salts, nitrates and nucleic acids of vegetal or animal origin stand out.^{1,2} In the rumen, most of the rapidly degradable proteins (RDP) contained in the food are transformed by ammonization to NNP, mainly to ammonium (NH_4^+), a product of the bacterial fermentation process, and it serves as the main N source in the microbial protein synthesis.³

When there is an unbalance between the energy intake and RDP, caused by a limited provision of energy or high RDP diets, the concentration of ruminal NH_4^+ increases since the capacity of the ruminal microbiota for using it is exceeded; its accumulation turns alkaline the ruminal pH (NH_3 , $[\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}]$).^{4,5} On the other hand, the ruminal pH interferes on the absorption of NH_3 produced in the rumen; the more alkaline the ruminal pH (higher than 7.5) the higher the speed of absorption, due to the highest conversion of NH_4^+ into NH_3 , which is liposoluble and easily absorbed by the ruminal wall.^{1,6} pH values under 6.7, as observed in cows fed diets with a moderate to high content of non-structural carbohydrates, increases the formation of NH_4^+ , which is hydro soluble and, consequently, presents a slow ruminal absorption.^{1,7} Therefore, under conditions of ruminal alkalization, such as fasting, diets with high fiber content or low soluble carbohydrate content, or NNP intake, there is a predisposition to increase the NH_3 absorption.⁸

Introducción

Las dietas de los rumiantes con elevado contenido de proteína cruda rápidamente degradable en el rumen eleva la producción de amonio ruminal, el cual se absorbe y posteriormente metabolizado por el hígado en urea. La ureagénesis está conectada al ciclo de Krebs y a la gluconeogénesis hepática por medio de metabolitos como aspartato, oxalacetato, cetoglutarato y glutamato. Las elevadas concentraciones de amonio en el rumen generan una sobrecarga en la ureagénesis por la excesiva demanda de intermediarios del ciclo de la urea, los cuales provienen de precursores que son compartidos con el ciclo de Krebs y vía gluconeogénica. Así, el aumento en la producción de amonio ruminal compromete la capacidad hepática ureagénica, interfiriendo negativamente sobre la gluconeogénesis hepática y balance energético del animal.

Degradabilidad proteínica en rumiantes

El nitrógeno (N) presente en 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 destacan la urea, sales de amonio, nitratos y ácidos nucleicos de origen vegetal o animal.^{1,2} En el rumen, gran parte de las proteínas rápidamente degradables (PRD) presentes en los alimentos son transformadas por amonificación a NNP, principalmente amonio (NH_4^+), resultante del proceso fermentativo bacteriano, sirviendo como principal fuente de N en la síntesis de proteína microbiana. El NH_4^+ es el principal producto de origen nitrogenado resultante del proceso fermentativo bacteriano y utilizado como la principal fuente de N para la síntesis de proteína microbiana.³

Cuando existe un desequilibrio entre la ingesta de energía y PRD, producto de un aporte limitado en energía o elevado de PRD, la concentración de NH_4^+ ruminal se incrementa ya que se excede la capacidad de la microbiota ruminal para utilizarlo; su acumulación alcaliniza el pH ruminal e incrementa la formación del amoníaco (NH_3 , $[\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}]$).^{4,5} Por otro lado, el pH ruminal interfiere en la absorción del NH_3 producido en el rumen; cuanto más alcalino el pH ruminal (superior a 7.5) mayor es la velocidad de absorción, debido a la mayor conversión de NH_4^+ en NH_3 , que es liposoluble y fácilmente absorbido por la pared ruminal.^{1,6} Valores de pH inferiores a 6.7, como sucede en animales alimentados con dietas de moderado a alto contenido de carbohidratos no estructurales, incrementan la formación de NH_4^+ , el cual es hidrosoluble y, consecuentemente, presenta una lenta absorción ruminal.^{1,7} Es así que, en condiciones

Ammonium metabolism

The plasma concentration of NH_4^+ increases rapidly after food intake, reaching a peak 2 or 3 hours after feeding, this time varies according to the type of food.^{9,10} Ruminants supplemented with NNP, such as urea, show a peak in the production of ruminal NH_4^+ during the first hour after feeding.¹¹ The toxic effect of NH_4^+ in mammals is controlled by the liver converting NH_4^+ in a non-toxic metabolite and its excretion.^{6,7,12} After absorption, the NH_4^+ reaches the liver via the portal vein, where it is transformed to urea, a compound 40 times less toxic.¹ The remaining NH_4^+ , non-metabolized to urea, is incorporated to glutamine which has two amino groups that make it a non-toxic carrier for NH_4^+ , favoring its excretion through urine.¹³

The liver presents certain peculiarities regarding the NH_4^+ metabolism due to its heterogeneity in morphology and biochemical characteristics. Periportal hepatocytes primarily receiving blood from the afferent portal vein contain the five ureagenic enzymes and the mitochondrial glutaminase (glutamine $\Rightarrow$ glutamate); also, they are responsible for the gluconeogenesis. The perivenous hepatocytes are distributed around the hepatic efferent vein and do not present ureagenic enzymes or mitochondrial glutaminase. However, they have the cytosolic glutamine synthetase enzyme (GS) that converts glutamate to glutamine, and the X_{ag} carrier so that glutamate and aspartate can enter the cell.¹⁴⁻¹⁶

This sequential organization allows an effective metabolization and removal of the flowing NH_4^+ , since the NH_4^+ that was not metabolized in the periportal hepatocytes arrives to the perivenous hepatocytes, where it is incorporated to glutamine. In functional terms, ureagenesis and syntheses of glutamine present differences; ureagenesis is a system of low affinity and high detoxification capacity for NH_4^+ , while the glutamine synthesis shows high affinity, but low capacity to detoxify NH_4^+ . In physiological concentrations of NH_4^+ (200-300 $\mu\text{M}/\text{l}$), near 2/3 of NH_4^+ is converted to urea and 1/3 in glutamine.¹⁶ Studies with the addition of NH_4^+ in ovine hepatocytes show a similar liberation of N via urea or glutamine.¹⁵

In ruminants, the efficacy of removal of NH_4^+ as urea or glutamine ensures that approximately 98% of NH_4^+ contained in the portal vein is removed when it passes through the liver. Therefore, these systems are considered vital in order to keep a low ammonemia in the peripheral blood.¹⁵

Ureagenesis

Ureagenesis is particularly important in grazing ruminants, since more than 60% of the plasma urea

que favorezcan la alcalinización ruminal como ayuno, dietas con elevado contenido de fibra, o con bajo contenido de carbohidratos solubles, o la ingesta de NNP, predisponen al incremento de la absorción del NH_3 .⁸

Metabolismo del amonio

La concentración de NH_4^+ en el plasma se eleva rápidamente después de la ingestión del alimento, alcanzando un máximo a las 2 o 3 horas después de la alimentación, tiempo que varía según el tipo de alimento.^{9,10} Los rumiantes suplementados con NNP, como urea, presentan un pico en la producción de NH_4^+ ruminal en la primera hora posterior a la ración.¹¹ El efecto tóxico del NH_4^+ en los mamíferos es controlado mediante un mecanismo de conversión por el hígado, a productos no tóxicos y de excreción.^{6,7,12} Después de la absorción, el NH_4^+ llega al hígado vía vena porta, donde gran parte se convierte en urea, compuesto 40 veces menos tóxico.¹ El NH_4^+ restante, no metabolizado a urea, es incorporado a glutamina, que por contener dos grupos aminos sirve como transportador no tóxico del NH_4^+ , favoreciendo su excreción en la orina.¹³

El hígado, por su heterogeneidad en morfología y características bioquímicas, presenta algunas particularidades en relación con el metabolismo del NH_4^+ . Los hepatocitos periportales, que primeramente reciben la sangre de la vena porta aferente, contienen las cinco enzimas ureagénicas, y la glutaminasa mitocondrial (glutamina $\Rightarrow$ glutamato); además, son los responsables de la gluconeogénesis. Los hepatocitos perivenosos, que se distribuyen en torno a la vena eferente hepática, no presentan las enzimas ureagénicas ni la glutaminasa mitocondrial. Sin embargo, ellos poseen la enzima glutamina sintetasa citosólica (GS), que convierte glutamato en glutamina, y el transportador X_{ag} para el ingreso a la célula del glutamato y aspartato.¹⁴⁻¹⁶

Esta organización secuencial permite una eficiente metabolización y remoción del NH_4^+ circulante, ya que el NH_4^+ no metabolizado en los hepatocitos periportales llega a los hepatocitos perivenosos, donde es incorporado a glutamina. En términos funcionales, la ureagénesis y la síntesis de glutamina presentan diferencias; la ureagénesis es un sistema de baja afinidad y con alta capacidad desintoxicante para NH_4^+ , mientras que la síntesis de glutamina presenta alta afinidad, pero baja capacidad para desintoxicar el NH_4^+ . En concentraciones fisiológicas de NH_4^+ (200-300 $\mu\text{M}/\text{l}$), cerca de 2/3 del NH_4^+ es convertido en urea y 1/3 en glutamina.¹⁶ Estudios con la adición de NH_4^+ en hepatocitos ovinos demuestran una liberación semejante de N vía urea o glutamina.¹⁵

En rumiantes, la efectividad de la remoción del NH_4^+ como urea o como glutamina, asegura que

can be originated from the ruminal NH_4^+ and up to 98% of the diet N can be transformed to NH_4^+ in the rumen.^{17,18}

The synthesis of urea involves a sequence of biochemical reactions that are controlled by ureagenic enzymes. In mammals, the liver is the only organ that has all the necessary enzymes for ureagenesis, using different N sources for synthesis of urea through condensation, deamination and transamination.^{12,17,19}

The synthesis of 1 mol of urea requires 1 mol of NH_4^+ and 1 N α -amino from aspartate; its energy cost varies depending on the origin of N, the ATP balance and the nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) produced during the regeneration of oxaloacetate from cytosolic malate generated by the fumarate liberated in the urea cycle.^{2,20,21}

The synthesis of urea is a cyclic process where ornithine is consumed in the 2nd reaction and it is regenerated in the 5th, avoiding the occurrence of a net loss or gain of citrulline, argininosuccinate or arginine. In the meanwhile, NH_4^+ , CO_2 and aspartate are consumed (Figure 1).^{12,19}

The first step towards the synthesis of urea is the condensation of CO_2 , NH_4^+ and ATP to form carbamoyl phosphate (CbP), where ATP serves as a source of energy. This reaction is catalyzed by the CPS-I. The coordinate action of the auxiliary enzyme of the ureagenesis, glutamate dehydrogenase (GD; EC: 1.4.1.2) together with the CPS-I, transfer the N to form intermediary product CbP, with high transfer potential of NH_4^+ for the urea cycle.^{12,19} When the N source (first N) for the ureagenesis comes from the ruminal NH_4^+ the energy cost is 1 ATP, in turn when it comes from the glutamate the balance is positive, of 2 ATP.

The next step of the cycle is the CbP catalysis, which adds to ornithine, through the enzyme L-ornithine transcarbamoylase (OTC; EC: 2.1.3.3), to form citrulline. This reaction takes place in the mitochondrial matrix, where citrulline migrates to cytosol. The citrulline joins aspartate, via the amino group, to form argininosuccinate, a reaction catalyzed by argininosuccinate synthetase (AAS; EC: 6.3.4.5). In this reaction, the aspartate donates a second N for the synthesis of urea, a reaction that requires an ATP.^{12,19} On the other hand, the cost to form aspartate is 3 ATP when it comes from alanine ($2 \text{ alanine} + \text{CO}_2 + 3\text{ATP} \rightarrow 2 \text{ pyruvate} + \text{urea} + 2 \text{ADP} + 2\text{Pi} + \text{AMP} + \text{PPi}$) or glutamine ($\text{glutamine} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + 3 \text{ATP} \rightarrow \text{oxoglutarate} + \text{urea} + \text{NAD} + 2 \text{ADP} + 2\text{Pi} + \text{AMP} + \text{PPi}$).²⁰

The next reaction is a reversible break catalyzed by arginine succinase which retains the N from argininosuccinate and liberates the skeleton of the aspartate forming fumarate and arginine. The final reaction of the urea cycle is the hydrolytic division of the arginine catalyzed by the hepatic arginase (EC: 3.5.3.1), and the

aproximadamente 98% del NH_4^+ presente en la vena porta sea removido durante su paso por el hígado. De modo que esos sistemas son considerados vitales para la manutención de una baja amonemia en la sangre periférica.¹⁵

Ureagénesis

En los rumiantes de pastoreo, la ureagénesis es de particular importancia, ya que más del 60% de la urea plasmática puede ser originada del NH_4^+ ruminal, y hasta 98% del N dietético puede ser transformado en NH_4^+ en el rumen.^{17,18}

La síntesis de la urea involucra una secuencia de reacciones bioquímicas, controladas por las enzimas ureagénicas. En mamíferos, el hígado es el único órgano que posee todas las enzimas necesarias para la ureagénesis, utilizando distintas fuentes de N para la formación de la urea por medio de condensación, deaminación y transaminación.^{12,17,19}

La síntesis de 1 mol de urea requiere 1 mol de NH_4^+ y 1 N α -amino proveniente del aspartato; su costo energético varía dependiendo del origen del N, del balance de ATP y de nicotinamina adenina dinucleótido (NADH) producido durante la regeneración de oxalacetato a partir del malato citosólico generado del fumarato liberado por el ciclo de la urea.^{2,20,21}

La síntesis de urea es un proceso cíclico donde la ornitina es consumida en la 2^a reacción y regenerada en la 5^a, propiciando que no ocurra pérdida neta o ganancia de citrulina, argininosuccinato o arginina. Entretanto, el NH_4^+ , CO_2 y aspartato son consumidos (Figura 1).^{12,19}

El primer paso para la síntesis de urea es la condensación de CO_2 , NH_4^+ y ATP para formar carbamoyl fosfato (CbP), en la que un ATP sirve como fuente de energía. Esa reacción es catalizada por la CPS-I. La acción coordinada de la enzima auxiliar de la ureagénesis, glutamato deshidrogenasa (GD; EC: 1.4.1.2) junto con la CPS-I, transfiere el N para formar CbP producto intermediario, con elevado potencial de transferencia del NH_4^+ para el ciclo de la urea.^{12,19} Cuando la fuente del N (primer N) para la ureagénesis proviene del NH_4^+ ruminal sin formación de glutamato el costo energético es de 1 ATP, a su vez cuando proviene del glutamato el balance es positivo, de 2 ATP.

El próximo paso del ciclo es la catálisis del CbP, el cual se adiciona a la ornitina, por la enzima L-ornitina transcarbamoylase (OTC; EC: 2.1.3.3), para formar citrulina. Esa reacción ocurre en la matriz mitocondrial, de donde emigra la citrulina al citosol. La citrulina se une al aspartato, vía el grupo amino, para formar argininosuccinato, reacción catalizada por la argininosuccinato sintetasa (AAS; EC: 6.3.4.5). En esa reacción, el

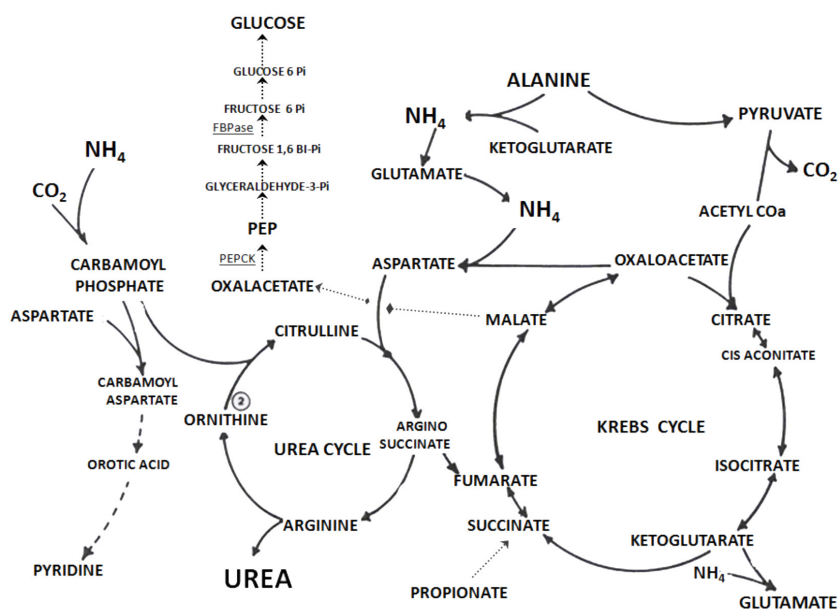


FIGURA 1. Interacciones metabólicas entre ciclo de la urea, ciclo de Krebs y vía gluconeogénica en rumiantes. Adaptado de Visek 1979. PEP = fosfoenolpiruvato; PEPCCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, EC = 4.1.1.32; FBPase = Fructosa-1,6 bisfosfatasa, EC: 3.1.3.11.

FIGURE 1. Metabolic interactions between the urea cycle, Krebs cycle and gluconeogenic path in ruminants. Adapted from Visek 1979. PEP = phosphoenolpyruvate; PEPCCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase, EC = 4.1.1.32; FBPase = Fructose-1,6 biphosphatase, EC: 3.1.3.11.

consequent liberation of urea.^{19,22} The liberated fumarate remains available to form oxalacetate in the Krebs cycle (Figure 1), a path that forms 3 ATP.

When there is an unbalance in the availability of intermediaries of the urea cycle, the removal of NH_4^+ decreases and it accumulates in tissues.^{7,12,23} There are specific mechanisms to reduce the risk of NH_4^+ accumulation, for example, in the periportal hepatocytes, the K_{eq} of mitochondrial GD strongly favors the synthesis of glutamate from NH_4^+ and oxoglutarate. In ureagenesis via NH_4^+ , the ammonia N can enter the urea cycle through the N of either the CbP or the aspartate.²¹ The latter depends on the synthesis of glutamate from NH_4^+ , oxoglutarate, ketoglutarate and NADH. The glutamate is probably the main donor of intermediary-N for aspartate.²⁴ This GD action, when it joins to aspartate, via AST (aspartate aminotransferase; EC: 2.6.1.1), transfers the NH_4^+ to the mitochondrial aspartate, an important path when the extraction of this exceeds the aminoacidic catabolism. This probably occurs under physiological circumstances in ruminants fed fresh forage or silage with a high content of ammonia N.^{15,25,26}

In studies using ovine hepatocytes incubated with $^{15}\text{NH}_3$, it was demonstrated the possibility of producing ^{15}N -urea, determining that $^{15}\text{NH}_3$ can be transferred to aspartate.^{24,27} During a NH_4^+ overcharge, 32% of the aspartate can be derived from NH_4^+ .²⁸ Other studies with $^{15}\text{NH}_3$ incubated hepatocytes indicate that glutamate and aspartate are similarly enriched with $^{15}\text{NH}_3$, confirming that the auxiliary enzymes of ureagenesis, GD and AST, are involved in the detoxification of NH_4^+ in ruminants.¹⁵

The aspects that differentiate ruminants from monogastric are the higher enzyme activities of OTC,

aspartato dona el segundo N para la síntesis de urea, reacción que requiere un ATP.^{12,19} Por otro lado, el costo para la formación del aspartato es de 3 ATP cuando proviene de alanina ($2 \text{ alanina} + \text{CO}_2 + 3\text{ATP} \rightarrow 2 \text{ piruvato} + \text{urea} + 2 \text{ADP} + 2\text{Pi} + \text{AMP} + \text{PPi}$) o glutamina ($\text{glutamina} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + 3 \text{ATP} \rightarrow \text{oxoglutarato} + \text{urea} + \text{NAD} + 2 \text{ADP} + 2\text{Pi} + \text{AMP} + \text{PPi}$).²⁰

La reacción subsiguiente es un quiebre reversible, catalizado por la arginino succinasa, la cual retiene el N del arginosuccinato y libera el esqueleto del aspartato formando fumarato y arginina. La reacción final del ciclo de la urea es la división hidrolítica de la arginina catalizada por la arginasa (EC: 3.5.3.1) hepática, y la consecuente liberación de urea.^{19,22} El fumarato liberado queda disponible para formar oxalacetato en el ciclo de Krebs (Figura 1), ruta que forma 3 ATP.

Cuando ocurren desbalances en la disponibilidad de intermediarios del ciclo de la urea, disminuye la remoción del NH_4^+ y éste se acumula en los tejidos.^{7,12,23} Existen mecanismos específicos para reducir el riesgo de acumulación de NH_4^+ , por ejemplo, en los hepatocitos periportales, la K_{eq} de la GD mitocondrial favorece fuertemente la síntesis de glutamato a partir de NH_4^+ y de oxoglutarato. En la ureagénesis vía NH_4^+ , el N amoniacal puede ingresar al ciclo de la urea tanto a través del N del CbP como del aspartato.²¹ Esta última vía de ingreso depende de la síntesis de glutamato a partir de NH_4^+ , oxoglutarato, cetoglutarato y NADH. El glutamato probablemente es el principal donador del N-intermediario para aspartato.²⁴ Esa acción de la GD, cuando se acopla al aspartato, vía AST (aspartato aminotransferasa; EC: 2.6.1.1), transfiere el NH_4^+ al aspartato mitocondrial, ruta importante cuando la extracción de éste excede al catabolismo aminoacídico. Lo anterior probablemente ocurre en circunstancias fisiológicas de

arginase and GD, suggesting they have a greater capacity to detoxify NH_4^+ via the urea cycle.²⁹

It is still not completely clear if ureagenesis is actively or passively controlled, or which are the factors involved. It is known that concentrations and activities of the urea cycle enzymes can control ureagenesis, for example the increase in the AAS activity after a short time of high protein feeding, apparently decreases the toxicity due to urea, and that metabolic acidosis reduces the ureagenesis.¹⁵

Glucagon leads to a decrease in N retention and consequent synthesis of urea. At the same time, insulin diverts amino acids towards the anabolism of peripheral tissues; however, *in vivo* insulin actions on the urea cycle are not clear.^{7,15}

Subclinical hyperammonemia

Hyperammonemia occurs when the portal flow of NH_4^+ exceeds the capacity of hepatic capture. As a consequence of a high protein intake, there is a rapid accumulation of NH_4^+ in the rumen, increasing its absorption. When the animals are not previously adapted to diets with a high content of proteins or when the amino acids of the urea cycle are limited, the hepatic capacity to metabolize urea is exceeded, producing hyperammonemia with accumulation of NH_4^+ in the tissues, which is toxic, since its tissue concentration is over 50 times higher than in blood.⁷

Hyperammonemia is characterized by an increase of the concentration of blood NH_4^+ and hyperglycemia.^{30,31} It has been demonstrated that hyperglycemia, due to hyperammonemia in ruminants, is associated with hepatic glycogenolysis, reduction of the use of peripheral glucose, and decreased pancreatic secretion of insulin.^{30,32} The subclinical intoxication by NH_4^+ reduces plasma concentration of insulin in ovines³⁰ and heifers,³³ probably due to the inhibition of insulin secretion.^{31,34}

The physiological limits of the plasma concentrations of NH_4^+ in bovines range between 7 and 95 μM /^{133,35} and 76 to 164 μM /l in the peripheral blood of ovine.³⁶ There is a subclinical intoxication in bovines when the arterial concentrations of NH_4^+ are higher than 190 μM /l.³²

There are few studies regarding the *in vivo* maximum hepatic capacity of the lactating dairy cow to metabolize NH_4^+ . Apparently, the maximum capacity of NH_4^+ extraction is approximately 1.84 mM of NH_3 /min/kg of liver,³⁷ amount that is equivalent to the intake of 29 g of N/d for a 40 kg ovine (1.05 g N/kg^{0.9}) and of 435 g of N/day, for a 600 kg bovine (1.37 g N/kg^{0.9}).^{25,38}

The hepatic capacity to metabolize NH_4^+ to urea can be exceeded in animals fed with a high amount

rumiantes alimentados con forrajes frescos y ensilajes de elevado contenido de N amoniacal.^{15,25,26}

En estudios donde se utilizaron hepatocitos ovinos incubados con $^{15}\text{NH}_3$ se demostró la posibilidad de producción de ^{15}N -urea, determinando que el $^{15}\text{NH}_3$ puede ser transferido al aspartato.^{24,27} Durante una sobrecarga por NH_4^+ 32% del aspartato puede ser derivado del NH_4^+ ;²⁸ otros estudios con hepatocitos incubados con $^{15}\text{NH}_3$ indican que el glutamato y el aspartato se enriquecen similarmente con $^{15}\text{NH}_3$, confirmando que las enzimas auxiliares de la ureagénesis, GD y AST, están involucradas en la desintoxicación del NH_4^+ en los rumiantes.¹⁵

Como se sabe, los aspectos que diferencian a los rumiantes de los monogástricos es la actividad enzimática más elevada de la OTC, arginasa y GD, sugiriendo que tienen una mayor capacidad de desintoxicar NH_4^+ vía el ciclo de la urea.²⁹

Todavía no está completamente esclarecido si la ureagénesis es activa o pasivamente controlada, y cuáles son todos los factores involucrados. Se sabe que las concentraciones y actividades de las enzimas del ciclo de la urea pueden controlar la ureagénesis, por ejemplo el aumento de la actividad de la AAS después de un corto tiempo con alimentación elevada en proteína, aparentemente disminuye la toxicidad por urea, y que la acidosis metabólica reduce la ureagénesis.¹⁵

El glucagón conduce a una disminución de la retención de N y consecuente síntesis de urea. A su vez, la insulina desvía los aminoácidos en dirección al anabolismo de tejidos periféricos, no obstante, las acciones de la insulina sobre el ciclo de la urea no están esclarecidos *in vivo*.^{7,15}

Hiperamonemia subclínica

La hiperamonemia ocurre cuando el flujo portal de NH_4^+ excede la capacidad de captación hepática. Como consecuencia de una elevada ingesta de proteínas, se produce una rápida acumulación de NH_4^+ en el rumen, aumentando su absorción. Cuando los animales no están previamente adaptados a dietas con alto contenido de proteínas o cuando los aminoácidos del ciclo de la urea son limitados, se sobrepasa la capacidad hepática de metabolización a urea, por lo que se produce una hiperamonemia con acumulación de NH_4^+ en los tejidos, donde ejerce toxicidad, ya que las concentraciones tisulares de éste son unas 50 veces superiores a las sanguíneas.⁷

La hiperamonemia está caracterizada por una elevación de las concentraciones de NH_4^+ sanguíneas e hiperglucemia.^{30,31} Se ha demostrado que la hiperglucemia debido a la hiperamonemia en rumiantes está asociada con una glucogenólisis hepática, reducción

of RDP, which produces daily fluctuations in the NH_4^+ production, or by the excessive absorption of amino acids.²⁶ The lag time of the organism to adjust the enzyme metabolic pathway, needed to cope with an increase of NH_4^+ and consequently to produce an increase of blood urea concentration, is one week.³⁵

Gluconeogenesis in the ruminant

Gluconeogenesis is a term that includes all the mechanisms and metabolic ways responsible for the conversion of non-carbohydrate origin substances to glucose or glycogen. The liver and the kidneys are the two tissues capable of carrying out the gluconeogenesis, since they contain all the gluconeogenic enzymes.³⁹

Gluconeogenesis is particularly relevant in grazing ruminants, especially those fed with fiber rich forages, because their digestive tract absorbs insignificant amounts of glucose and their capacity of storing glycogen in the liver is limited.⁴⁰ The requirement of glucose by the central nervous system, gestation and lactation in ruminants can be higher than in monogastrics, as it is observed in high producing dairy cows. Approximately 60% of the glucose in a lactating ruminant is used for the synthesis of lactose.^{3,40,41} For example, 2200g of glucose are needed to produce 30 liters of milk;⁴² therefore, gluconeogenesis becomes more important when there is an increase in milk production.

The non-gluconeogenics volatile fatty acids acetate and butyrate are the largest sources of absorbable energy in ruminants and propionate is the main gluconeogenic precursor. Meanwhile, glycerol, lactate and valerate are also gluconeogenics, but their production is not enough to cover the gluconeogenic requirements.^{40,41} However, during fasting periods, glycerol and glucogenic amino acids are the main precursors of glucose.^{40,43}

Lactate comes from the anaerobic glycolysis and from propionate metabolized at the ruminal epithelium, and originates glucose via the Cori cycle, entering the Krebs cycle as pyruvate, which is carboxylated to oxaloacetate.^{40,44} On the other hand, propionate enters the Krebs cycle via succinyl-CoA. The glycerol from lipid mobilization originates glucose in the liver and the kidneys. During periods of fasting or high demand, when the degradation of stored lipids increases, the gluconeogenesis via glycerol increases. This amount would increase from 5% in ovine fed a balanced diet⁴⁵ to 23% during fasting.⁴⁰

The role of amino acids in the gluconeogenesis of cows and sheep can represent between 5-30% of the total glucose production.^{40,46-48} The conversion of amino acids to glucose occurs in the liver of the ruminant, and to a lesser extension in the kidney. Most of the

de la utilización periférica de glucosa, y disminuida secreción pancreática de insulina.^{30,32} La intoxicación subclínica por NH_4^+ reduce la concentración plasmática de insulina en ovinos³⁰ y novillos,³³ probablemente por inhibición de la secreción de insulina.^{31,34}

Los límites fisiológicos de las concentraciones plasmáticas de NH_4^+ en bovinos están entre 7 y 95 $\mu\text{M}/\text{l}$ ^{33,35} y de 76 a 164 $\mu\text{M}/\text{l}$ en sangre periférica de ovinos.³⁶ Se considera una intoxicación subclínica por NH_4^+ en bovinos, cuando las concentraciones de NH_4^+ arterial son superiores a 190 $\mu\text{M}/\text{l}$.³²

La máxima capacidad hepática de la vaca lechera en lactancia para metabolizar NH_4^+ está poco estudiada *in vivo*. Aparentemente, la máxima capacidad de extracción de NH_4^+ es aproximadamente 1.84 mM de $\text{NH}_3/\text{min}/\text{kg}$ de hígado,³⁷ cantidad equivalente a la ingesta de 29 g de N/d para un ovino de 40 kg (1.05 g N/kg^{0.9}) y de 435 g de N/día, para un bovino de 600 kg (1.37 g N/kg^{0.9}).^{25,38}

La capacidad hepática para metabolizar el NH_4^+ a urea puede ser sobrepasada en animales alimentados con alto suministro de PRD, en los que se producen fluctuaciones diarias en la producción de NH_4^+ , o bien por excesiva absorción de los aminoácidos.²⁶ El organismo requiere de una semana para realizar sus ajustes metabólicos enzimáticos que permitan que el aumento del NH_4^+ se traduzcan en aumento de las concentraciones de urea en sangre.³⁵

Gluconeogénesis en el rumiante

Gluconeogénesis es el término que incluye todos los mecanismos y vías responsables de la conversión de sustancias no originarias de carbohidratos a glucosa o glucógeno. El hígado y los riñones son los dos tejidos capaces de realizar gluconeogénesis, pues contienen todas las enzimas gluconeogénicas.³⁹

La importancia de la gluconeogénesis en rumiantes de pastoreo alimentados principalmente con forrajes ricos en fibra, se debe a que su organismo absorbe cantidades insignificantes de glucosa por el tracto digestivo y su capacidad de almacenamiento de glucógeno en el hígado es limitada.⁴⁰ Cuando se compara la necesidad de glucosa en rumiantes para el sistema nervioso central, gestación y lactación, con la de los monogástricos, se comprueba que no es inferior, sino incluso mayor, como en el caso de vacas de elevada producción. Aproximadamente 60% de la glucosa del rumiante en lactancia es utilizada para la síntesis de la lactosa.^{3,40,41} Como ejemplo, para sintetizar 30 litros de leche se necesitan 2200 g de glucosa,⁴² de ello se deduce que a medida que se eleva la productividad, la gluconeogénesis adquiere mayor importancia.

Cuantitativamente, la mayor fuente de energía absorbible en rumiantes son los ácidos grasos volátiles

amino acids from the skeletal muscle are not carried directly to the liver as such, but are initially converted to carrier amino acids such as alanine and glutamine in the muscle. Glutamine and alanine are the two amino acids mainly responsible for the glucose production in sheep, and aspartate is also important in cows.^{40,49}

The mean energy cost of gluconeogenesis is close to that of ureagenesis (4-5 moles of ATP per mol of formed glucose, starting from a proportion of 70% propionate, 10% lactate and 20% amino acids as gluconeogenic substrates).²⁰

Relationships between ureagenesis and hepatic gluconeogenesis

Periportal hepatocytes are responsible of the ureagenesis, gluconeogenesis and glycogenolysis, and the perivenous hepatocytes are responsible for glycolysis, lipogenesis and synthesis of glutamine.¹⁶ The gluconeogenic enzymes phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, EC: 4.1.1.32), glucose-6-phosphatase (EC:3.1.3.9), 1,6 fructose biphosphatase (FBPase, EC: 3.1.3.11) and glucokinase (EC:2.7.1.2) are mainly localized in the hepatic periportal zone.^{14,50-52}

The hepatic ureagenesis is controlled by the ureagenic enzymes, the intermediaries of the urea cycle and the availability of aspartate. The gluconeogenesis and ureagenesis processes in the periportal hepatocytes^{14,16} are integrated via Krebs cycle, through specific amino acids (aspartate, glutamate, alanine) and oxaloacetate (Figure 1).² This suggests that a higher ureagenic demand can affect the gluconeogenic efficiency.

The excess of NH_4^+ affect the gluconeogenesis from amino acids, and propionate.²⁷ *In vitro* assays using ovine hepatocytes treated with florizine, a substance that induces glycosuria increasing the glucose demand, demonstrate that ammonium chloride (NH_4Cl) decreases the maximum speed for conversion of propionate to glucose, affecting the capacity of the hepatocytes to use propionate in the oxidation and gluconeogenesis.⁴⁸ The conversion of propionate to glucose *in vitro* decreases 30% in ovine hepatocytes treated with NH_4 (0.25-0.5 mM).⁵³ Another study reports that the urea synthesis, stimulated by the NH_4^+ , can reduce in 25% the hepatic gluconeogenesis.²¹

The NH_4Cl inhibits the conversion of alanine to glucose in isolated ovine hepatocytes, but the mechanism involved in that inhibition is unknown. The primary effect of NH_4Cl in hepatocytes of rats is the conversion of mitochondrial oxaloacetate to malate and then to aspartate, contributing with the ureagenesis with one N atom,⁵⁴ and consequently decreasing the mitochondrial oxaloacetate and its flow for PEPCK and, therefore, the gluconeogenesis.

acetato y butirato, no gluconeogénicos, y propionato, principal precursor gluconeogénico. A su vez, el glicerol, el lactato y el valeriato, también son gluconeogénicos, pero su producción es insuficiente para cubrir los requerimientos gluconeogénicos.^{40,41} Sin embargo, en periodos de carencia alimentaria, el glicerol y los aminoácidos glucogénicos son los principales precursores de glucosa.^{40,43}

El lactato, proveniente de la glucólisis anaeróbica y del propionato metabolizado en el epitelio ruminal, origina glucosa vía ciclo de Cori, entrando al ciclo de Krebs como piruvato, que es carboxilado a oxalacetato.^{40,44} Por otro lado, el propionato entra al ciclo de Krebs vía succinil-CoA. El glicerol procedente de la movilización lipídica origina glucosa tanto en el hígado como en los riñones. En periodos de ayuno o de elevado requerimiento, donde aumenta la degradación de las reservas lipídicas, aumenta la gluconeogénesis vía glicerol. Esta cantidad ascendería de 5% en ovinos alimentados con una dieta balanceada⁴⁵ a 23% en ayuno.⁴⁰

El papel de los aminoácidos en la gluconeogénesis en vacas y ovinos puede representar entre 5 y 30% de la producción total de glucosa.^{40,46-48} La conversión de aminoácidos a glucosa ocurre en el hígado del rumiante, y en menor extensión, en el riñón. La mayoría de los aminoácidos derivados del músculo esquelético no son transportados directamente al hígado como tal, sino que inicialmente son convertidos a aminoácidos de transporte como alanina y glutamina en el músculo. La glutamina y la alanina son los dos aminoácidos mayormente responsables por la producción de glucosa en los ovinos, y en las vacas se suma el aspartato.^{40,49}

El costo energético medio de la gluconeogénesis es próximo al de la ureagénesis (4-5 moles de ATP por mol de glucosa formado, partiendo de una proporción de 70% de propionato, 10% de lactato y 20% de aminoácidos como sustratos gluconeogénicos).²⁰

Relaciones entre ureagénesis y gluconeogénesis hepática

Los hepatocitos periportales son responsables de la ureagénesis, gluconeogénesis y glucogenólisis, y los perivenosos lo son de la glucólisis, lipogénesis y síntesis de glutamina.¹⁶ Las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, EC: 4.1.1.32), glucosa-6-fosfatasa (EC:3.1.3.9), 1,6 fructosa bifosfatasa (FBPasa, EC: 3.1.3.11) y glucoquinasa (EC:2.7.1.2) se localizan predominantemente en la zona periportal hepática.^{14,50-52}

La ureagénesis hepática está controlada por las enzimas ureagénicas, los intermediarios del ciclo de la urea, y por la disponibilidad de aspartato. Los procesos de gluconeogénesis y ureagénesis en los hepato-

The hyperammonia decreases the production and liberation of hepatic glucose in sheep⁵⁵ and cows.³² The analysis of the hepatic net flows of NH_4^+ and urea for a wide range of intake and diets, indicate that the quotient of ureic N synthesis for NH_4^+ approximates to 2, suggesting that the urea synthesis requires one additional contribution of N aminoacidic, which is provided by the aspartate. This contribution, even if it allows to balance the entering of NH_4^+ to the urea cycle as CbP,⁵⁶ would reduce the availability of amino acids for gluconeogenesis.

Lambs supplemented with a high amount of NNP in the diet⁵⁷ or grazing cows on pastures with a high content of RDP and supplemented with NNP⁵⁸ show an increase of the gluconeogenic capacity via propionate,⁵⁹ a higher PEPCK activity and a more positive energy balance.⁵⁷

On the other hand, *in vitro* assays with ovine hepatocytes demonstrated that the propionate inhibits the ureagenesis. The addition of propionate (1.25 mM) to hepatocytes in the presence of NH_4Cl and alanine, decreases that production of urea.²⁷ The finding of a marked increase in the concentrations of NH_4^+ in the peripheral blood of dairy cows, suggests that propionate reduces the hepatic capacity to detoxify NH_4^+ .³³ Apparently, the inhibition of ureagenesis by propionate occurs in one point between the fixation of NH_4^+ and the formation of citrulline. Propionate in concentrations of 0.5 mM reduces 80% of the citrulline synthesis through the hepatocytes mitochondria. Another metabolic factor that reduces the ureagenesis is the hepatic lipidosis produced by the excessive lipid mobilization at the beginning of lactation.

NH_4 can also alter the energy metabolism and takes to depletion of ketoglutarate and ATP.⁶⁰ Ovines fed with urea have 36% less ketoglutarate, 14% piruvate and 32% glucose 6-P, respectively, when compared to those fed soy protein.⁶⁰

On the other hand, the urea detoxification cost and probably other cost associated with energy expenses for maintenance are higher with the increase of the N intake.⁶¹ However, some ATP can be retrieved from cells when the ketoacids formed during the aminoacidic deamination are oxidated through the Krebs cycle.⁶² However, any requirement for the ureagenesis caused by a low efficiency in the use of N, not only represents a loss of N but also a potential loss of useful energy.

Also, it is described a decrease in the activity of the isocitrate dehydrogenase (isocitrato $\Rightarrow$ cetoglutarato), in presence of NH_4^+ . The higher ureagenic enzyme activities in ovines supplemented with urea indicate a higher potential of conversion and intake of ketoglutarate in order to preserve ornithine. Glutamate synthesis is a requirement for the maximum formation of urea

citos periportales,^{14,16} se integran, vía ciclo de Krebs, por medio de aminoácidos específicos (aspartato, glutamato, alanina) y oxalacetato (Figura 1).² Lo anterior hace suponer que una mayor demanda ureagénica puede alterar la eficiencia gluconeogénica.

El exceso de NH_4^+ puede afectar la gluconeogénesis aminoacidica, así como del propionato.²⁷ Ensayos *in vitro* con hepatocitos ovinos tratados con florizina, sustancia que provoca glucosuria aumentando la demanda de glucosa, demuestran que el cloruro de amonio (NH_4Cl) disminuye la velocidad máxima de conversión de propionato a glucosa, afectando la capacidad de los hepatocitos para utilizar propionato en la oxidación y gluconeogénesis.⁴⁸ La conversión de propionato a glucosa *in vitro* disminuye 30% en hepatocitos ovinos tratados con NH_4 (0.25-0.5 mM).⁵³ Otro estudio indica que la síntesis de urea, estimulada por NH_4^+ , puede reducir la gluconeogénesis hepática 25 por ciento.²¹

El NH_4Cl inhibe la conversión de alanina a glucosa en hepatocitos aislados de ovinos, pero el mecanismo involucrado en esa inhibición no se conoce. En hepatocitos de ratas el efecto primario de NH_4Cl es la conversión del oxalacetato mitocondrial a malato y de éste a aspartato, con la finalidad de contribuir con un átomo de N para la ureagénesis,⁵⁴ disminuyendo consecuentemente el oxalacetato mitocondrial y su flujo para PEPCK y, por lo tanto, la gluconeogénesis.

La hiperamonemia disminuye la producción y liberación de glucosa hepática en ovejas⁵⁵ y vacas.³² Los análisis de los flujos netos hepáticos de NH_4^+ y urea para un rango amplio de consumo y dietas, indican que el cociente de síntesis N ureico por NH_4^+ se aproxima a 2, sugiriendo que la síntesis de urea requiere una contribución adicional de N aminoacidico, el que es entregado por aspartato. Este aporte, si bien permite equilibrar el ingreso de NH_4^+ al ciclo de la urea como CbP,⁵⁶ reduciría la disponibilidad de aminoácidos para la gluconeogénesis.

A su vez corderos suplementados con alto contenido de NNP en la dieta⁵⁷ o vacas en pastoreo de praderas con alto contenido de proteínas y suplementadas con NNP⁵⁸ presentan un incremento en la capacidad gluconeogénica vía propionato,⁵⁹ una mayor actividad de la PEPCK y un balance energético más positivo.⁵⁷

Por otro lado, ensayos *in vitro* con hepatocitos de corderos demostraron que el propionato inhibe la ureagénesis. La adición de propionato (1.25 mM) a hepatocitos en presencia de NH_4Cl y alanina, disminuye la producción de urea.²⁷ El hallazgo de un marcado aumento en las concentraciones de NH_4^+ en sangre periférica de vacas lecheras, sugiere que el propionato reduce la capacidad hepática para desintoxicar NH_4^+ .³³ Aparentemente, el sitio de la inhibición de la ureagénesis por propionato ocurre en un punto entre la fijación del NH_4^+ y la formación de la citrulina. El pro-

playing a important role in the N metabolism.⁶⁰ Approximately 8% of the corporal glucose comes from glutamate, so both glutamine and glutamate are substrates that share the ureagenesis and gluconeogenesis.⁶³

These data show that both, ureagenesis and the synthesis of glutamine work effectively in the N metabolism with important implications for the ruminant productivity. At the same time, both pathways can be coped under conditions of peripheral hyperammonemia, and in this situation the aminoacidic catabolism can be stimulated to replace the additional need of N-aspartate, producing an unbalance in the Krebs cycle. Therefore, the capacity for keeping an adequate biotransformation of NH_4^+ depends on the availability of aspartate and glutamate generated via oxaloacetate and ketoglutarate.

Since the protein metabolism in ruminants is closely related to the energy metabolism, a protein or energy metabolic unbalance can lead to a lower productivity performance. The magnitude of the effects of ammonium excess on the energy metabolism is still unknown; however, it interferes in the maximum productive expression, resulting in a performance lower than expected, a situation of importance in high yielding dairy cows kept grazing or supplemented with RDP, which require a full gluconeogenic capacity, or in growing animals that need a high aminoacidic contribution. The relationship between ureagenesis and gluconeogenesis suggests that the increase of RDP or NNP could affect gluconeogenesis negatively, a critical situation during periods of high demand.

Referencias

1. HUNTINGTON GB, ARCHIBEQUE SL. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *J Anim Sci.* 2000; 78: 742-749.
2. REYNOLDS CK. Metabolism of nitrogenous compounds by ruminant liver. *J Nutr* 1992; 122: 850-854.
3. BERGMAN EN, HOGUE DE. Glucose turnover and oxidation rates in lactating sheep. *Am J Physiol* 1967; 213: 1378-1384.
4. SINCLAIRKD, SINCLAIRLA, ROBINSONJJ. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptative changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 2000; 78: 2659-2669.
5. MOORE DA, VARGA G. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. *Compendium* 1996; 18: 712-720.
6. HALIBURTON JC, MORGAN SE. Nonprotein nitrogen-induced ammonia toxicosis and ammoniated feed toxicity syndrome. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1989; 5: 237-249.
7. VISEK WJ. Ammonia: Its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J Dairy Sci* 1984; 67: 481-498.

pionato en concentraciones de 0.5 mM reduce 80% la síntesis de citrulina por la mitocondria de hepatocitos. Otro factor metabólico que reduce la ureagénesis es la lipidosis hepática, producto de la excesiva movilización lipídica al inicio de lactancia.

El NH_4 puede alterar el metabolismo energético, además de llevar a la depleción de cetoglutarato y de ATP.⁶⁰ Los ovinos alimentados con urea poseen 36% menos cetoglutarato, 14% de piruvato y 32% de glucosa 6-P, respectivamente, que los alimentados con proteína de soya.⁶⁰

Por otro lado, el costo de la desintoxicación de la urea y, probablemente otros gastos energéticos de mantenimiento hepático asociados, son mayores con el incremento de la ingesta de N.⁶¹ Sin embargo, algunos ATP pueden ser recuperados de las células cuando los cetoácidos formados durante la deaminación aminoacidica se oxidan a través del ciclo de Krebs.⁶² No obstante, cualquier requisito para la ureagénesis provocada por una baja eficiencia de utilización de N, no sólo representa una pérdida de N sino también potencialmente de energía útil.

Además, se describe una disminución en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (isocitrato $\Rightarrow$ cetoglutarato), en presencia de NH_4^+ . Las mayores actividades enzimáticas ureagénicas en ovinos suplementados con urea se traducen en un mayor potencial de conversión y de consumo de cetoglutarato con la finalidad de conservar ornitina. El glutamato ocupa un papel central en el metabolismo N y su síntesis aparentemente es un prerrequisito para la máxima formación de urea.⁶⁰ Del glutamato procede aproximadamente 8% de la glucosa corporal,⁴⁰ de modo que ambos, glutamina y glutamato, son sustratos que comparten la ureagénesis y gluconeogénesis.⁶³

Los antecedentes presentados señalan que tanto la ureagénesis como la síntesis de glutamina operan efectivamente, ejerciendo importantes implicaciones para la productividad del rumiante. A su vez, ambas rutas pueden ser excedidas en condiciones de hiperamoniemia periférica y el catabolismo aminoacídico puede ser estimulado para suplir la necesidad adicional de N-aspartato, produciendo un desequilibrio con el ciclo de Krebs. De esa información se supone que la manutención de una adecuada biotransformación de NH_4^+ depende de la disponibilidad de aspartato y glutamato, generados vía oxalacetato y cetoglutarato.

Como el metabolismo proteínico en rumiantes está íntimamente relacionado con el metabolismo energético, un desequilibrio metabólico proteínico o energético puede conducir a un menor desempeño productivo. Todavía no se ha contabilizado la magnitud de los efectos del exceso de amonio sobre el metabolismo energético; sin embargo, su exceso parece interferir en la máxima expresión productiva, resultando en un des-

8. ANTONELLI AC, TORRES GAS, MORI CS, SOARES PC, MARUTA CA, ORTOLANI EL. Intoxicação por amônia em bovinos que receberam uréia extrusada ou granulada: alterações em alguns componentes bioquímicos do sangue. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2009; 46: 69-76.
9. GUSTAFFSON AH, PALMQUIST DL. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J Anim Sci* 1993; 76: 475-484.
10. MACKLE TR, PARR CR, BRYANT AM. 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* 1996; 39: 341-356.
11. HENNING PH, STEYN DG, MEISSNER HH. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *J Anim Sci* 1993; 71: 2516-2528.
12. VISEK WJ. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. *Nutr Rev* 1979; 37: 273-282.
13. MAZZAFERRO E, HACKETT T, WINGFIELD W, OGILVIE G, FETTMAN M. Role of glutamine in health and disease. *Compendium* 2000; 22: 1094-1103.
14. KATZ NR. Metabolic Heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr* 1992; 122: 843-849.
15. LOBLEY GE, MILANO GD, VAN DER WALT JG. The liver: Integrator of nitrogen metabolism. In: CRONJE P B, editor. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Pretoria, South Africa: CABI, 2000: 149-168.
16. HÄUSSINGER D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J* 1990; 267: 281-290.
17. BAREJW. On extent of ureagenesis and gluconeogenesis in ruminants with regards to the diet. *Arch Anim Nutr* 1986; 40: 154-163.
18. NOLAN JV, NORTON BW, LENG RA. Further studies of the dynamics of nitrogen metabolism in sheep. *Br J Nutr* 1976; 35: 127-147.
19. RODWELL VW. Catabolism of proteins and of amino acid nitrogen. In: MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW, editors. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. New York, USA: MacGraw-Hill, 2000: 313-322.
20. MADSEN A. The molecular basis of animal production: Metabolism in liver cells. In: RIIS PM, editor. *Dynamic Biochemistry of Animal Production*. New York, USA: Elsevier, 1983: 53-74.
21. LUO QJ, MALTBY SA, LOBLEY GE, CALDER AG, LOMAX MA. The effect of amino acids on the metabolic fate of ¹⁵NH₄Cl in isolated sheep hepatocytes. *Eur J Biochem* 1995; 228: 912-917.
22. HARTWELL JR, CECAVA MJ, DONKIN SS. Rumen undegradable protein, rumen-protected choline and mRNA expression for enzymes in gluconeogenesis and ureagenesis in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84: 490-497.
23. VISEK WJ. Some aspects of ammonia toxicity in animal cells. *J Dairy Sci* 1968; 51: 286-295.
24. LOBLEY GE, CONNELL A, LOMAX MA, BROWN DS, MILNE E, CALDER AG *et al*. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *Br J Nutr* 1995; 73: 667-685.
25. LOBLEY GE, BREMNER DM, NIETO R, OBITSU T, MOORE AH, BROWN DS. Transfers of N metabolites across the ovine liver in response to short-term infusions of an amino acid mixture into the mesenteric vein. *Br J Nutr* 1998; 80: 371-379.
26. WHITT J, HUNTINGTON G, ZETINA E, CASSE E, TANIGUCHI K, POTTS W. Plasma flow and net nutrient flux across gut and liver of cattle fed twice daily. *J Anim Sci* 1996; 74: 2450-2461.
27. MUTSVANGWA T, BUCHANAN-SMITH JG, MCBRIDE BW. 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* 1997; 75: 1149-1159.
28. LOBLEY GE, BREMNER DM, BROWN DS. Response in hepatic removal of amino acids by the sheep to short-term infusions of varied amounts of an amino acid mixture into the mesenteric vein. *Br J Nutr* 2001; 85: 689-698.
29. FICO ME, MOTYL T, MILNER JA. Species comparison of the influence of ammonia on orotic acid and urea biosynthesis in liver. *J Nutr* 1984; 114: 613-621.
30. FERNANDEZ JM, CROOM JR WJ, JOHNSON AD, JAQUETTE RD, EDENS FW. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentrations. *J Anim Sci* 1988; 66: 3259-3266.
31. KAYE MM, FERNANDEZ JM, WILLIAMS CC, WHITE TW, WALKER RL. Differential responses to an oral urea load test in small ruminants: species and breed effects. *Small Rum Res* 2001; 42: 211-217.
32. FERNANDEZ JM, CROOM WJJ, TATE LP, JOHNSON AD. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on hepatic and portal-drained visceral flux of metabolites and regulatory hormones. *J Anim Sci* 1990; 68: 1726-1742.
33. CHOUNG JJ, CHAMBERLAIN DG. Effects of intraruminal infusion of propionate on the concentrations of ammonia and insulin in peripheral blood of cows receiving an intraruminal infusion of urea. *J Dairy Res* 1995; 62: 549-557.

34. FERNANDEZ J, SAHLU T, HART S, POTCHOIBA M, EL SHAER H, JACQUEMET N *et al.* Experimentally-induced subclinical hyperammonemia in dairy goats. *Small Rum Res* 2001; 42: 5-20.
35. BRITO AL. Avaliação do uso intensivo de cama de frango na alimentação de bovinos: Alguns aspectos toxicológicos e do metabolismo do nitrogênio (tese doutorado). São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo-USP, 1999.
36. ROLLER MH, RIEDEMANN GS, ROMKEMA GE, SWANSON RN. Ovine blood chemistry values measured during ammonia toxicosis. *Am J Vet Res* 1982; 43: 1068-1071.
37. SYMONDS HW, MATHER DL, COLLIS KA. The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia. *Br J Nutr* 1981; 46: 481-486.
38. GRAHAM NM. Units of metabolic body size for comparisons amongst adult sheep and cattle. *Proceedings of Australian Society of Animal Production, Ninth Biennial Conference*. 1972 Feb 13-19; Canberra, Australia: Ramsay Were Publishing Pty Ltd. 1972; 9: 352-355.
39. MAYES P. Gluconeogenesis and control of the blood glucose. In: MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW, editors. 25th ed. New York, USA: MacGraw-Hill, 2000: 208-218.
40. HERDT TH. Fuel homeostasis in the ruminant. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1988; 4: 213-231.
41. HERDT TH. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2000; 16: 215-230.
42. KOLB E. Fisiología Veterinaria. Vol. II. Zaragoza, España: Acribia, 1991.
43. TELENI E, ANNISON EF. Release of gluconeogenic amino acids from hind-limb muscles of fed and starved sheep. In: BAKER SK, GAWTHORNE JM, MACKINTOSH JB, PURSER DB, editors. *Ruminant physiology: concepts and consequences: a tribute to R. J. Moir*. Perth, Australia: University of Western Australia, 1984.
44. GONZÁLEZ FD, SILVA SC. Introdução à bioquímica clínica veterinária, 2ª Ed. Porto Alegre RS-Brasil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
45. BERGMAN EN, STARR DJ, REULEIN SSJ. Glycerol metabolism and gluconeogenesis in the normal and hypoglycemic ketonic sheep. *Am J Physiol* 1968; 215: 874-880.
46. CHALUPA W, SNIFFEN CJ. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am: Food An Prac* 1991; 7: 353-372.
47. FORD EJ, REILLY PE. The utilization of plasma free amino acid and glucose carbon by sheep. *Res Vet Sci* 1969; 10: 409-418.
48. OVERTON TR, DRACKLEY JK, OTTEMANN-ABBAMONTE CJ, BEAUIEU AD, EMMERT LSC. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J Anim Sci* 1999; 77: 1940-1951.
49. MILLS SE, BEITZ DC, YOUNG JW. Evidence for impaired metabolism in liver during induced lactation ketosis of dairy cows. *J Dairy Sci* 1986; 69: 362-370.
50. YANEZ AJ, BERTINAT R, CONCHA II, SLEBE JC. Nuclear localization of liver FBPase isoenzyme in kidney and liver. *FEBS Lett* 2003; 550: 35-40.
51. SAEZ DE, FIGUEROA CD, CONCHA II, SLEBE JC. Localization of the fructose 1,6-bisphosphatase at the nuclear periphery. *J Cell Biochem* 1996; 63: 453-462.
52. YANEZ AJ, GARCIA-ROCHA M, BERTINAT R, DROPPELMANN C, CONCHA II, GUINOVART JJ *et al.* Subcellular localization of liver FBPase is modulated by metabolic conditions. *FEBS Lett* 2004; 577: 154-158.
53. DEMIGNÉ C, YACOUB C, RÉMÉSY C, FAFOURNOUX P. Propionate and butyrate in rat or sheep hepatocytes. *Bioch Bioph Acta* 1986; 875: 535-542.
54. MEIJER AJ, GIMPEL JA, DELEEUW G, TISCHLER ME, TAGER JM, WILLIAMSON JR. Interrelationships between gluconeogenesis and ureogenesis in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 1978; 253: 2308-2320.
55. ORZECZOWSKI A, PIERZYNOWSKI S, MOTYL T, BAREJ W. Net hepatic metabolism of ammonia, propionate and lactate in sheep in relation to gluconeogenesis and ureagenesis. *J Anim Physiol Anim Nutr* 1988; 59: 113-122.
56. PARKER D, LOMAX M, SEAL C, WILTON J. Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. *Proc Nutr Soc* 1995; 54: 549-563.
57. NORO M. Gluconeogénesis hepática en ovinos (*Ovis aries*) alimentados con una dieta alta en nitrógeno no proteico (tesis doctoral). Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, 2006.
58. NORO M, BARBOZA CS, BENITEZ O, PULIDO R, WITTEW 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 SOCHIPA; 2010 octubre 27-29; Coyhaique, Chile, Coyhaique, INIA Tamel Aike, 2010: 137-138.
59. NORO M, WITTEW P, SCANDOLO D, GONZALEZ C, HARO F, SANDOVAL A. Effect of non-protein nitrogen supplementation on glucose and urea syntheses after a propionate loading test in sheep. *Vet Clin Path* 2005; 34: 305.
60. CHALUPA W, CLARK J, OPLIGER P, LAVKER R. Detoxication of ammonia in sheep fed soy protein or urea. *J Nutr* 1970; 100: 170-176.
61. MARINI JC, KLEIN JD, SANDS JM, VAN AMBURGH ME. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *J Anim Sci* 2004; 82: 1157-1164.
62. NEWSHOLME E, LEECH A. *Biochemistry for the Medical Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Inc, 1983.
63. NEWSHOLME P, LIMA MM, PROCOPIO J, PITHON-CURI TC, DOI SQ, BAZOTTE RB *et al.* Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 153-163.