

Rev Biomed 1999; 10:241-251.

Estimación de la síntesis de proteína microbial en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina.

Revisión

Carlos A. Sandoval-Castro, Fernando Herrera-Gomez.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN.

La presente revisión tuvo como objetivo recopilar y presentar información actualizada sobre la técnica de los derivados de purina en rumiantes domésticos. La técnica de los derivados de purina representa una alternativa simple y no invasiva para el estudio del aporte de N microbial a nivel intestino delgado en animales rumiantes. Existe información y modelos cuantitativos de respuesta para bovinos y ovinos que permiten el uso de esta técnica, y numerosos métodos analíticos publicados para el análisis de los derivados de purina. El método de los derivados de purina tiene la ventaja de no requerir animales quirúrgicamente preparados, pero tiene la desventaja de requerir colecta total de orina. El uso de submuestras de orina colectadas a lo largo del día(s) junto con el índice 'derivados de purina:creatinina' puede ser una alternativa a la colección total de orina, pero se necesita más

información sobre este punto. La medición de los derivados purínicos en leche no parece ser una alternativa viable a la colección total de orina. Deben de validarse algunos de los parámetros en uso para el cálculo del flujo de nitrógeno microbial al intestino como son; la recuperación de purinas microbiales absorbidas como derivados purínicos en orina y la digestibilidad de la purinas en intestino delgado en animales bajo condiciones de alimentación normal. No obstante, comparada con otras técnicas convencionales, la medición de los derivados de purina en orina representa una herramienta simple para profundizar en el estudio y entendimiento de la dinámica ruminal.

(Rev Biomed 1999; 10:241-251)

Palabras clave: derivados de purina, alantoina, rumiantes

Solicitud de sobretiros: Dr. Carlos A. Sandoval-Castro. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Apartado Postal 4-116. Itzimmá. C.P. 97100. Mérida, Yucatán, México. Tel. (99) 42-32-00 Fax:(99) 42-32-05 E-mail: bcasso@tunku.uady.mx Recibido el 27/Enero/1999. Aceptado para publicación el 3/Mayo/1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991047.pdf>

Vol. 10/No. 4/Octubre-Diciembre, 1999

SUMMARY.**The estimation of microbial protein synthesis in ruminants using the urinary excretion of purine derivatives.**

The aim of the present review was to present up-to-date information on the use of the purine derivatives technique in domestic ruminants. The purine derivatives technique is a simple and non-invasive alternative for the study of microbial-N flow to intestine in ruminants. There are information and quantitative models for cattle and sheep and, several laboratory methods which allow the use of this technique. The purine derivatives technique has the advantage of using intact animal but, the disadvantage of requiring total urine collection. The use of urine spot-samples together with the purine derivatives: creatinine index can be an alternative to replace total urine collection but more research is needed in this area. Purine derivatives in milk do not appear to be a reliable alternative to urine collection. Further validation is needed in the parameters used to estimate microbial-N flow such as; recovery and digestibility of purine bases in normally fed animals. Nevertheless, compared with traditional methods, the purine derivatives technique represent a valuable tool to study and understand rumen dynamics. (**Rev Biomed 1999; 10:241-251**)

Key words: purine derivatives, allantoin, ruminants.

INTRODUCCION.

Los sistemas actuales para la estimación de los requerimientos de nitrógeno (N) de los rumiantes requieren de la estimación de la cantidad de éste que es digerido y absorbido a nivel de intestino delgado (ID). Esta estimación debe diferenciar entre el N de origen dietético que escapa la degradación ruminal (sobrepasante) y el N de origen microbiano (1,2).

Para la estimación del aporte de N-microbiano se han utilizado diversas técnicas basadas en el uso

de marcadores internos (ácido diaminopimélico, ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas) y externos (^{15}N , ^{35}S para marcaje de proteína y ^{32}P para marcaje de fosfolípidos). Estas técnicas requieren del uso de animales con cánulas post-ruminales para la colecta de las muestras y el uso simultáneo de marcadores de flujo de digesta. Smith y McAllan (3), Ling y Buttery (4) y Zinn y Owens (5) señalan que la medición del flujo de ácidos nucleicos al ID permite un alto grado de precisión en la predicción de la síntesis de N-microbiano, sin embargo, requieren de equipos y procedimientos sofisticados. La preocupación por el uso y bienestar de los animales quirúrgicamente preparados para investigación, han estimulado la búsqueda de técnicas alternativas para la estimación del flujo de N microbiano que utilicen animales intactos.

La técnica de los derivados de purinas representa una alternativa simple y no invasiva para estudiar los factores que afectan, y la manipulación de la producción de N-microbiano en rumiantes.

ORIGEN DE LOS DERIVADOS DE PURINA.

Hipoxantina, xantina, ácido úrico y alantoina, en rumiantes, son el producto final del catabolismo de la purinas, son excretados en la orina y colectivamente se les conoce como derivados de purinas (DP). Topps y Elliot (6) fueron los primeros en demostrar que existía una correlación positiva entre la cantidad de alantoina y ácido úrico excretado en orina y el flujo de ácidos nucleicos al duodeno.

Los DP excretados en orina se originan de tres fuentes posibles: i) Bases púricas de microorganismos ruminales, ii) purinas dietéticas y, iii) purinas de origen endógeno, esta última fuente como resultante del recambio tisular de los animales. En rumiantes los DP parecen provenir principalmente de ácidos nucleicos de microorganismos ruminales que fluyen y son digeridos y absorbidos a nivel duodenal (7). A partir de los estudios de McAllan (8, 9) se ha considerado que los ácidos nucleicos de origen dietético son degradados en el

Síntesis microbial en rumiantes y derivados de purina.

rumen, y por lo tanto tienen una contribución nula a la excreción de DP. Sin embargo, trabajos recientes por Perez y col. (10) han demostrado que los DP pueden tener como origen purinas dietéticas que escapen a la digestión ruminal. El flujo de purinas dietéticas a ID dependerá de la naturaleza del sustrato. Así, un alimento sobrepasante y con alto contenido de ácidos nucleicos (i.e. harina de pescado, harina de carne) poseen el potencial de permitir que las purinas resistan el ataque microbiano en rumen y sean sobrepasantes, por ejemplo, 10% harina de pescado y/o carne como suplemento en la dieta resultaría en aproximadamente 6-10% de purinas en duodeno de origen dietético (10). En animales en pastoreo y/o con bajo nivel de suplementación la contribución de purinas dietéticas será nula o mínima.

DERIVADOS DE PURINA COMO MARCADORES DE NITROGENO MICROBIAL.

La alantoina fue propuesta como un marcador de la síntesis de N-microbial por Rys y col. (11) y Antoniewicz y col. (7). Pero solo recientemente se han presentado bases sólidas para su uso. Aunque los supuestos teóricos son similares a aquellos utilizados para el uso de los marcadores internos (ácido diaminopimélico, ARN, ADN, purinas, etc.) a nivel duodenal.

Para la estimación del aporte y/o flujo de N-microbial a nivel duodenal se requiere conocer las relaciones existentes entre: i).- DP de origen endógeno: DP de origen exógeno; ii).- DP : N purínico absorbido a nivel duodenal; iii).- N purínico absorbido: flujo de N purínico a duodeno, y; iv).- N purínico: N ácido nucleico : N microbial. Estos factores representan, i.- Factor de corrección para la excreción real de origen microbial, ii.- tasa de recuperación del marcador, iii.- Digestibilidad del marcador y iv.- Proporción del marcador en el sustrato.

Derivados de purina de origen endógeno.

Existen diversos estudios donde el aporte endógeno de DP ha sido evaluado para diversos

rumiantes (12, 13) y es claro ahora que la excreción endógena es mayor en bovinos (0.450-0.560 mmol/kg PV^{0.75}) comparada con la de ovinos y caprinos (0.170-0.200 mmol/kg PV^{0.75}). Existe un efecto (aunque limitado) del aporte de nutrientes sobre la excreción endógena de DP (14-17).

Condon y col. (18), Smith y col. (19) y Razzaque y col. (20) mostraron que en ovinos las purinas exógenas absorbidas a nivel ID podían ser incorporadas en ácidos nucleicos tisulares. Por lo tanto, la excreción urinaria de DP en respuesta al aporte de purinas a nivel ID no es lineal (16, 21). Sin embargo, a niveles de alimentación >0.8 del requerimiento de mantenimiento la relación se vuelve lineal dada la saturación de la capacidad/necesidad de incorporación de purinas exógenas en la síntesis de ácidos nucleicos. En bovinos, la respuesta es lineal dada la limitada disponibilidad de las purinas absorbidas para ser utilizadas en tejidos para la síntesis de ácidos nucleicos (22).

La disponibilidad de las purinas exógenas para reemplazar la síntesis *de novo* de purinas necesarias para la formación de ácido nucleicos, está relacionada con la presencia de la enzima xantina oxidasa (XO) en mucosa intestinal y plasma, la cual tiene una alta actividad en bovinos, pero baja en ovinos (13, 23). Así, bases purínicas absorbidas a nivel ID o circulando en plasma sufren cambios cuantitativos menores en ovinos, pero en bovinos éstas son metabolizadas en gran parte, tanto a nivel mucosa intestinal como en plasma, lo que las hace no disponibles para su incorporación en ácidos nucleicos tisulares. Debido a esto, la síntesis de purinas *de novo* es necesaria, resultando en un aporte neto inevitable de DP de origen endógeno. Este proceso explica al mismo tiempo las diferencias en la excreción endógena de DP entre ovinos y bovinos.

Recuperación de purinas exógenas como derivados purínicos.

La relación entre las purinas excretadas en orina y el flujo de bases purínicas al duodeno ha sido determinada mediante la infusión post-ruminal

CA Sandoval-Castro, F Herrera-Gomez.

de purinas, ARN y proteína microbial. Las tasas de recuperación son aparentemente muy variables para ovejas (0.15 a 1.0), y presentan una respuesta no-lineal (7, 14, 16, 18-21, 24-26).

En bovinos sin embargo, debido a la elevada actividad de la enzima XO, las bases purínicas absorbidas son catabolizadas, resultando en una relación entre purinas exógenas y DP en orina lineal y con una recuperación mayor (0.65-0.77) (8, 22, 27).

La variabilidad encontrada inicialmente en los estudios de recuperación, fue debida inicialmente a la falta de reconocimiento del aporte endógeno, y la capacidad de reemplazo de la síntesis *de novo*, por la utilización de las purinas absorbidas. En ambos casos, bovinos y ovinos, las purinas exógenas tienen una recuperación media (en base molar) a nivel urinario de 0.84 después de corregir para la contribución de DP endógenos y digestibilidad del sustrato. La fracción faltante (0.16) ha sido atribuida principalmente a una pérdida por reciclaje al rumen vía saliva (17, 28), donde los DP son degradados totalmente. El reciclaje de los DP vía saliva es dado por un mecanismo de transporte pasivo, y dependerá de la cantidad de saliva excretada por día y la concentración plasmática de éstos, sin embargo, no existen estudios sobre el efecto potencial de dietas pobres en N sobre el reciclaje vía saliva de los DP como un efecto asociado a una elevada tasa de reciclaje de urea al rumen.

Estimación de la cantidad de bases purínicas absorbidas en duodeno.

Algunos modelos cuantitativos entre el flujo y/o absorción de purinas a nivel duodenal y su recuperación en orina como DP han sido propuestos.

Para ovinos:

$$y = 0.84X + (0.150 \text{ kg}^{0.75} \exp^{-0.25X}) \quad (16)$$

$$y = 0.938X + (0.2076 \text{ kg}^{0.75} \exp^{-0.14X}) \quad (21)$$

donde:

y = derivados de purina en orina (mmol/d)

X = bases purínicas absorbidas en duodeno (mmol/d)

0.84, 0.938 = tasa de recuperación de las purinas absorbidas

0.150, 0.2076 = excreción endógena de DP (mmol/d)

0.25, 0.14 = tasa reemplazo síntesis *de novo* de purinas por purinas exógenas absorbidas

$$y = 0.8015X - 0.0437 \quad X > X_s$$

$$y = 0.1326 \text{ kg}^{0.75} \quad X < X_s \quad (21)$$

$$y = 0.57X + 2.3 \quad (29)$$

donde:

$X_s = 220$

y = derivados de purina en orina (mmol/d)

X = bases purínicas absorbidas

X_s = punto de reemplazo síntesis *de novo* de purinas por purinas exógenas absorbidas

0.8015, 0.57 = tasa de recuperación de purinas absorbidas

0.1326 = excreción endógena de DP (mmol/d)

Las cuatro ecuaciones proporcionan estimados de purinas exógenas absorbidas en ID que son similares dentro de rangos fisiológicos y nutricionales normales (hasta 30 mmol/d). Para bovinos el único modelo existente entre flujo de purinas a ID y excreción urinaria de DP es el de Verbic *et al.*, (22);

$$y = 0.77X + (0.333 + 0.095 \exp^{-0.16X}) \text{ kg}^{0.75}$$

donde:

y = derivados de purina en orina (mmol/d)

X = bases purínicas absorbidas en duodeno (mmol/d)

0.77 = tasa de recuperación DP absorbidos

0.333 = excreción endógena inevitable de DP (mmol/d)

0.095 = excreción endógena de DP (mmol/d) (síntesis *de novo*) que puede ser evitada por la utilización de las bases purínicas absorbidas

0.16 = tasa reemplazo síntesis *de novo* de purinas por purinas exógenas absorbidas

De acuerdo con la ecuación, la proporción de reemplazo de la síntesis *de novo* es pequeña (0.22) y bajo condiciones de alimentación normales la excreción endógena puede ser tomada constante, ya que el reemplazo de la síntesis *de novo* se

Síntesis microbial en rumiantes y derivados de purina.

ve saturada a partir de aproximadamente 35 mmol de purinas exógenas.

Corrigiendo para la digestibilidad verdadera del material utilizado en su experimento (0.913) Verbic y col. (22) sugiere que la recuperación verdadera es de 0.85. Así mismo, considerando los reportes de excreción endógena existente (493 mmol/kg^{0.75} promedio) sugiere que la excreción endógena será de 0.385 mmol/kg^{0.75}. Así, bajo condiciones de alimentación normal donde se espera una excreción de DP mayor a 35 mmol/d, la relación se vuelve;

$$y = 0.85X + 0.385\text{kg}^{0.75} \quad (22)$$

Debemos considerar sin embargo que en los trópicos bajo condiciones de sub-alimentación el flujo de bases purínicas a ID pudiera ser menor que el necesario para reemplazar la síntesis *de novo* (35 mmol/d). La excreción endógena de DP bajo estas circunstancias no es constante por lo que debería de considerarse la fracción de reemplazo de la síntesis *de novo*, la ecuación resultante es (adaptada de Verbic y col., (22));

$$y = 0.85X + (0.385 + 0.108 \exp^{-0.16X})\text{kg}^{0.75}$$

Osuji (30) ha sugerido que el aporte de DP endógenos en bovinos Cebú es menor (0.185 mmol/kg^{0.75}) y la fórmula debiera modificarse acorde. Sin embargo, no presenta evidencias para respaldar este enfoque. En contraste, estudios en nuestro laboratorio parecen mostrar que en el trópico, bajo condiciones de alimentación y manejo similares, la excreción de DP en *B. indicus* y *B. taurus* será similar, y el aporte endógeno sólo marginalmente inferior en ganado Cebú. (32). Por lo tanto, se recomienda utilizar el valor 0.385 mmol/kg^{0.75} hasta que se presente evidencia sólida para atribuir diferencias en la excreción endógena de DP en bovinos que pudieran ser debidas a especie.

Digestibilidad de las purinas microbiales.

La digestibilidad de las purinas microbiales

en duodeno ha sido estimada en 0.91 (16) y 0.85 (33-34). La digestibilidad de los ácidos nucleicos ha sido reportada como; 0.86 (35), 0.80-0.90 para RNA y 0.75-0.85 para DNA (9). El valor comúnmente utilizado para fines de esta técnica es el de 0.91 (16). Existe cierta incertidumbre sobre la validez del uso de un solo valor para todos los animales y tipos de dieta, el modificar este valor para cada situación representaría la necesidad de usar animales canulados para poder estimar un factor de corrección. Sin embargo, dado el rango de valores reportados para la digestibilidad de las purinas microbiales, la mejora en la precisión será pequeña.

Relación N purínico: N ácido nucleico: N microbial.

Rys y col. (11) sugieren que el N-alantoico representa 0.25 del N ac. nucleico y este, a su vez, representa 0.18 del N microbial. Por su parte, Arambel *et al.* (36) supusieron que el N alantoico representa 0.30 del N ácido nucleico y éste, a su vez, representa 0.20 del N microbial. Según Dewhurst *et al.* (34) 0.112 del N microbial es N purínico y 0.86 de éste N está formado por N alantoico. Recientemente Perez *et al.* (29) reporta un rango de valores de 1.21-1.70 para la relación bases purínicas:N microbial (mmol/mgN). Sin duda existe variación, pero será difícil corregir este valor en busca de una mayor precisión. Adicionalmente, este margen de error se encuentra también asociado a cualquier marcador/técnica utilizado actualmente para la estimación del flujo de N microbial (DNA, RNA, ac. diaminopimélico, etc).

Estimación del aporte de N microbial.

Las estimaciones iniciales del aporte de N microbial a nivel ID estuvieron basados en el nitrógeno alantoico excretado (g/d). Estos cálculos tomaban en cuenta algunos de los factores ya mencionados anteriormente y son presentados a continuación.

$$N_M = N_A / z$$

CA Sandoval-Castro, F Herrera-Gomez.

donde:

N_M = N microbial en ID (g/d)

N_A = N alantoico excretado en orina (g/d)

z = factor de conversión de acuerdo con la relación N purínico: N ácido nucleico: N microbial, 0.06 (36), 0.065 (34), 0.045 (11), 0.0952 (37)

Estos cálculos pueden ser usados tanto en ovinos como en bovinos, sin embargo, estos coeficientes no fueron originados a través de mediciones cuantitativas de superficies de respuesta como los modelos de Chen *et al.* (16), Balcells y col. (21), Perez y col. (29) mencionados anteriormente, y generalmente resultan en una sobreestimación de los flujo de N-microbial. Cuando se usan los modelos cuantitativos para la estimación de la cantidad de purinas absorbidas a nivel ID, la cantidad de N microbial en bovinos y ovinos puede ser estimada a partir de la siguiente fórmula (22, 38).

$$N_M \text{ (g/d)} = 70X / (0.83 * 0.116 * 1000) = 0.727X$$

donde:

70 = Contenido de N de las purinas (mg/mmol)

0.83 = digestibilidad de las purinas microbiales

0.116 = relación entre N purínico y N total en biomasa bacterial mixta.

Estas relaciones no son absolutas y pueden ser modificadas a partir de análisis realizados para cada dieta experimental (cuando sea posible), tal y como han hecho algunos autores (29). Aunque la magnitud del cambio será mínimo. Mediciones di-

rectas de flujo de N microbial al duodeno (vía cántula) y excreción de derivados purínicos sólo han sido reportadas para ovinos por Puchala y Kulasek (39) y Samaniego *et al.* (40) quienes han propuesto las siguientes formulas.

usando alantoina $y = \exp(0.830 + 2.089x)$ (39)

usando DP totales $y = \exp(0.747 + 1.817x)$ (39)

donde:

y = N microbial (g/d)

x = excreción urinaria de N alantoico o N de DP totales (gN/d)

$$y = 0.768 + 1.01x \quad (40)$$

donde:

y = N microbial (g/d)

x = excreción urinaria de DP totales (mmol/d)

MÉTODOS ANALITICOS PARA LOS DERIVADOS DE PURINA.

Se han reportado diversos métodos analíticos para la cuantificación de los derivados de purinas, estos son presentados en el cuadro 1. Revisiones sobre la naturaleza de las técnicas, ventajas y desventajas de los métodos han sido publicadas para alantoina (41) y para ac. úrico (42). Una ventaja del método de los DP, es que las técnicas analíticas reportadas permiten el manejo de grandes cantidades de muestras de manera sencilla y rápida.

MEDICION DE DERIVADOS DE PURINA TOTALES vs ALANTOINA.

Chen y col. (16), Balcells y col. (21) y Puchala y Kulasek (39) sugieren que la medición única de alantoina es suficiente para obtener los estimados

Cuadro 1
Métodos publicados para la determinación de los derivados de purina

Instrumento	Alantoina	Ac. úrico	Xantina e Hipoxantina
Espectrofotómetro	25, 43-45	17, 25, 45-46, 52-53	17, 46, 52
Auto-analizador	17, 46-47	17	17
HPLC	48-51	49, 54	49

Las citas se encuentran en la sección de referencias.

Síntesis microbial en rumiantes y derivados de purina.

de la síntesis de N-microbial, dada la poca variación encontrada entre las proporciones de alantoina:ácido úrico:xantina-hipoxantina. Sin embargo, Fujihara y col. (25,55), Giesecke y col. (14) y Lindberg y col. (15) sugieren que aún cuando todos los DP excretados en orina son tomados en consideración, la estimación del N-microbial es más precisa que utilizando únicamente alantoina. Si consideramos la evidencia existente, debemos recordar que Fujihara y col. (25) reportan que en ocasiones el ácido úrico representa hasta 50% de los derivados de purina. Adicionalmente, los trabajos de Lindberg y col. (15), Chen y col. (13,16) y Balcells y col. (21) han demostrado que en ovinos existen cambios en las proporciones de DP excretados en orina, que son debidos al estado nutricional/flujo de bases purínicas a nivel duodenal. A niveles menores a aproximadamente 0.8 mantenimiento, existe un incremento en la proporción de xantina-hipoxantina y ácido úrico en relación con alantoina. En nuestro laboratorio se ha encontrado que la proporción de ácido úrico urinario excretado no se presenta en una proporción constante de experimento en experimento. Por lo tanto, es recomendable cuantificar los DP totales para obtener una mayor precisión en la cuantificación de la excreción de DP.

ALTERNATIVAS A LA COLECTA TOTAL DE ORINA.

Uso de la relación derivados purínicos:creatinina.

Chen y col. (56) sugieren que el uso de la relación DP totales y/o alantoina:creatinina es un alternativa a la colecta total de orina. Esta propuesta se basa en el supuesto teórico de que la creatinina excretada vía orina es constante y presenta una variación mínima, lo que permitiría su uso como un marcador interno para la estimación del volumen total de orina por día. Para esto se requiere también que la excreción de alantoina a orina no fluctúe y se mantenga constante a lo largo del día. Estudios preliminares con ovinos (56) y bovinos (57) parecen confirmar esta teoría. La excreción urinaria de los derivados purínicos

(mmol/d) pudiera ser estimada en ovinos a partir de las siguientes ecuaciones;

$$y = 3.58 + 1.84x$$

$$y = 5.10 + 1.74x \quad (56)$$

donde:

y = DP : creatinina

x = mmol DP/d

Para intervalos de excreción fisiológica ambas ecuaciones arrojan resultados similares. Aunque este enfoque parece ser promisorio, debe considerarse que los trabajos a la fecha han mostrado que la excreción diaria de creatinina parece ser constante para un individuo pero no entre individuos; así 78% de la varianza en la excreción urinaria de creatinina parece ser debida a individualidad animal (58). Walker y Faichney (58) y Hovell y col. (59) han encontrado un efecto debido a dieta que representa alrededor de 8% de la varianza (58). Dada estas condiciones, es de esperarse que el hecho de usar un solo valor de referencia para la estimación de la excreción de creatinina en relación con peso metabólico conducirá a errores en la estimación >10%. Para aumentar la precisión de esta estimación se ha recomendado hacer la medición por lo menos dos días consecutivos a la misma hora, pero a pesar de esto se espera que únicamente sean detectables diferencias entre tratamientos cuando éstas sean mayores a 20% (60).

No se han efectuado estudios en relación con la del índice DP:Creatinina en bovinos que permitan plantear ecuaciones similares a las propuestas para ovinos. No obstante, trabajos preliminares (38) han obtenido respuestas promisorias. Se requieren estudios adicionales sobre esta área, la cual representaría una alternativa viable si se logra establecer un marcador confiable para la estimación del volumen de la excreción de orina.

Uso de la excreción de alantoina en leche.

La presencia de DP en leche (61-62) abrió una alternativa a la colecta total de orina para el uso de la técnica de DP. Aun cuando la alantoina excretada en leche representa un porcentaje mínimo

del total excretado diario ($\pm 2\%$). Investigaciones iniciales sobre el uso de la alantoina en leche como marcador mostraron resultados promisorios. Rosskopf y Giesecke (63) y Giesecke y col. (64) encontraron que la excreción de alantoina en leche estaba correlacionada con el consumo de energía y también con la concentración de alantoina en plasma (64). La correlación entre alantoina en leche y consumo de energía era mayor que la correlación entre consumo de energía y alantoina en orina (64). Siendo la leche fácil de muestrear, representaba una buena alternativa. Estudios posteriores sugieren que la alantoina presente en leche es debida a un mecanismo de transporte pasivo (64, 65) y que existe poca correlación entre la cantidad de alantoina excretada en leche y la excreción urinaria (65, 66), siendo esta dependiente de la producción diaria de leche. En ciertos estudios existe correlación entre alantoina urinaria y láctea (64, 66) pero cuando la producción de leche se altera por medio de proteína sobrepasante, hay un incremento concomitante en la excreción de alantoina láctea que resulta del aumento de la producción láctea y no de un incremento en el flujo de bases purínicas a nivel ID (65, 66).

Se ha encontrado una alta concentración de ácido úrico en leche, relativa a la concentración plasmática (64-67). Una porción de éste es de origen endógeno (glándula mamaria), como resultado de la alta actividad metabólica de esta glándula. Ortin y col. (67) encontraron una alta actividad de xantina oxidasa en leche, lo que contribuirá a reforzar la idea de que una parte del ácido úrico tiene origen mamario y por lo tanto no debe de utilizarse en la estimación de la excreción diaria de DP. Giesecke y col. (64) sugieren la posible actividad de uricasa en leche, lo que contribuirá a la presencia de alantoina de origen mamario en leche. Hecho que representaría un sesgo en la estimación de la excreción real de DP.

Dadas estas circunstancias, la excreción de alantoina en leche no parece ser una alternativa viable comparada a la colecta total de orina. Dada la reducida proporción que representa de la excre-

ción diaria y el costo que puede representar su determinación, se sugiere que si se deseara corregir la excreción diaria se considere el valor de 0.15 mmol por litro de leche (66).

CONCLUSIONES.

La técnica de los derivados de purinas representa una alternativa simple y no invasiva para la medición de aporte de N microbial en rumiantes. Existen numerosos reportes que muestran la factibilidad de su uso, pero que difieren parcialmente en las relaciones encontradas. Estas diferencias pudieran estar asociadas a la relación N purínico:N total en el material microbial fluyendo a duodeno o a diferencias en la recuperación de las purinas absorbidas. La búsqueda de una metodología alternativa a la colecta total de orina debe ser el siguiente paso. El índice DP:creatinina parece ser una opción viable, pero se requieren estudios adicionales. La técnica de DP es una herramienta útil para el estudio de la dinámica ruminal de rumiantes domésticos.

REFERENCIAS.

- 1.- NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th rev. ed. Washington: National Academy of Science; 1989. p. 158.
- 2.- AFRC. Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. London: CAB International; 1993. p. 160.
- 3.- Smith RH, McAllan AB. Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids. *Br J Nutr* 1971; 25:181-9.
- 4.- Ling JR, BATTERY PJ. The fraction of microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *Proc Nutr Soc* 1976; 35:39A.
- 5.- Zinn RA, Owens FN. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. *J Anim Sci* 1983; 56:471-5.
- 6.- Topps JH, Elliot RC. Relationship between concentration

Síntesis microbial en rumiantes y derivados de purina.

- of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature* 1965; 205:498-9.
- 7.- Antoniewicz AM, Heinemann WW, Hanks EM. The effect of changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. *J Agric Sci Cambridge* 1980; 95:395-400.
- 8.- McAllan AB. The degradation of nucleic acids in the rumen, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. *Br J Nutr* 1980; 44:99-112.
- 9.- McAllan AB. The fate of nucleic acids in ruminants. *Proc Nutr Soc* 1982; 41:309.
- 10.- Perez JF, Rodriguez CA, Gonzalez J, Balcells J, Guada JA. Contribution of dietary purine bases to duodenal digesta in sheep. In situ studies of purine degradability corrected for microbial contamination. *Anim Feed Sci Technol* 1996b; 62:251-62.
- 11.- Rys R, Antoniewicz J, Maciejewicz J. Allantoin in urine as an index of microbial protein in the rumen. *Tracer Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants: Symposium. IAEA. Viena, Austria; 1975. p. 95-8.*
- 12.- Lindberg JE. Urinary allantoin excretion and digestible organic matter intake in dairy goats. *Swed J Agric Res* 1985; 15:31-7.
- 13.- Chen XB, Orskov ER, Hovell FDDeB. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br J Nutr* 1990c; 63:121-9.
- 14.- Giesecke D, Stangassinger M, Tiemeyer W. Nucleic acid digestion and urinary purine metabolites in sheep nourished by intragastric infusions. *Can J Anim Sci* 1984; 64: 144-5.
- 15.- Lindberg JE, Bristav H, Manyenga AR. Excretion of purines in the urine of sheep in relation to duodenal flow of microbial protein. *Swed J Agric Res* 1989; 19:45-52.
- 16.- Chen XB, Hovell FDDeB, Orskov ER, Brown DS. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br J Nutr* 1990a; 63:131-42.
- 17.- Chen XB, Mathieson J, Hovell FDDeB, Reeds PJ. Measurement of purine derivatives in urine of ruminants using automated methods. *J Sci Food Agric* 1990b; 53:23-33.
- 18.- Condon RJ, Hall G, Hatfield EE. Metabolism of abomasally infused ¹⁴C labelled ribonucleic acid, adenine, uracil and glycine. *J Anim Sci* 1970; 31:1037-38A.
- 19.- Smith RC, Moussa NM, Hawkins GE. Utilization of the nucleic acids of *Escherichia coli* and rumen bacteria by sheep. *Br J Nutr* 1974; 32:529-37.
- 20.- Razaque MA, Topps JH, Kay RNB, Brockway JM. Metabolism of the nucleic acids of rumen bacteria by preruminant and ruminant lambs. *Br J Nutr* 1981; 45:517-27.
- 21.- Balcells J, Guada JA, Castrillo C, Gasa J. Urinary excretions of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J Agric Sci Cambridge* 1991; 116:309-17.
- 22.- Verbic J, Chen XB, MacLeod NA, Orskov ER. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J Agric Sci Cambridge* 1990; 114:243-48.
- 23.- Al-Khalidi UAS, Chagliassan TH. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem J* 1965; 97:318-20.
- 24.- Condon RJ, Hatfield EE. Metabolism of abomasally infused ribonucleic acid by sheep. *J Anim Sci* 1970; 31: 1037A.
- 25.- Fujihara T, Orskov ER, Reeds PJ, Kyle DJ. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J Agric Sci Cambridge* 1987; 109:7-12.
- 26.- Chen XB, Kyle DJ, Orskov ER, Hovell FDDeB. Renal clearance of plasma allantoin in sheep. *Exp Physiol* 1991; 76:59-65.
- 27.- Beckers Y, Thewis A. Excretion of purine derivatives in urine of Belgian Blue bulls following duodenal infusion of purines from *Torula* yeast. *Proc Soc Nutr Physiol* 1994; 3:325.
- 28.- Surra J, Guada JA, Balcells J, Castrillo C. Salivary losses of purine derivatives. *Anim Prod* 1993; 56:463-4.
- 29.- Perez JF, Balcells J, Guada JA, Castrillo C. Determination of rumen microbial nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ¹⁵N and purine bases as markers of microbial

CA Sandoval-Castro, F Herrera-Gomez.

- nitrogen entering the duodenum. *Br J Nutr* 1996a; 75:699-709.
- 30.- Osuji PO, Khalili H, Umunna NN. The effects of cottonseed cake with or without molasses on feed utilization, purine excretion and milk production of Boran (*Bos indicus*) cows fed a mixture of wheat and oat straw. *Trop Agric Trinidad* 1995; 72:63-69.
- 32.- Herrera-Gomez F, Hovell FDDeb, Sandoval-Castro CA. Urinary purine derivatives excretion in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Proceedings of the British Society of Animal Science*; 1998. p. 23
- 33.- McAllan AB, Smith RH. Degradation of nucleic acids in the rumen. *Br J Nutr* 1973 29:331-345.
- 34.- Dewhurst RJ, Waters CJ, Webster AJF. Assessment of the energetic efficiency of rumen microbial protein yield using allantoin excretion. *Proceedings International Symposium On Protein Metabolism and Nutrition*. 7-12th September, 1987. Rostock, Germany; 1988. p. 50
- 35.- Storm E, Orskov ER. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. *Br J Nutr* 1983; 50:463-70.
- 36.- Arambel MJ, Bartley EE, Dufva GS, Dennis SM, Riddell DO, Dayton AD, Galitzer SJ. Evaluation of several methods for estimating the proportion of microbial nitrogen reaching the duodenum in cattle. *Nutr Rep Int* 1987; 35:211- 8.
- 37.- Sibanda S, Topps JH. The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasum. *Proc Nutr Soc* 1982; 41:75A.
- 38.- Chen XB, Chen YK, Franklin MF, Orskov ER, Shand WJ. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J Anim Sci* 1992a; 70:1534-42.
- 39.- Puchala R, Kulasek GW. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Can J Anim Sci* 1992; 72:821-30.
- 40.- Samaniego MA, Chen XB, Hovell FDDeB, MacRae JC, Mayes RW. Comparison of methods for the measurement of microbial protein supply in sheep. *Proceedings of the British Society of Animal Science*; 1997. p. 125.
- 41.- Chen XB, Matuszewski W, Kowalczyk J. Determination of allantoin in biological, cosmetic and pharmaceutical samples. *J AOAC Int*. 1996; 79:628-35.
- 42.- Pachla LA, Reynolds DL, Scott D, Kissinger PT. Analytical methods for measuring uric acid in biological samples and food products. *J AOAC* 1987; 70:1-24.
- 43.- Young EG, Conway CF. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J Biol Chem* 1942; 142:839-53.
- 44.- Borchers R. Allantoin determination. *Anal Biochem* 1977; 79:612-3.
- 45.- Grootveld M, Halliwell B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. *Biochem J* 1987; 243:803-808.
- 46.- Pentz EI. Adaptation of the Rimini-Schryver reaction for the measurement of allantoin in urine to the autoanalyzer. *Anal Biochem* 1969; 27:333-42.
- 47.- Lindberg JE, Jansson C. A rapid automated analysis of allantoin in ruminant urine. *Swed J Agric Res* 1989; 19:163-7.
- 48.- Tiemeyer W, Giesecke D. Quantitative determination of allantoin in biological fluids by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1982; 123:11-15.
- 49.- Balcells J, Guada JA, Peiro JM. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1992; 575:153-7.
- 50.- Diez MT, Arin MJ, Resines JA. Simultaneous determination of allantoin and creatinine in urine by a rapid reversed-phase liquid chromatography method. *J Liquid Chromatography* 1992; 15:1337-50.
- 51.- Chen XB, Kyle DJ, Orskov ER. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatisation. *J Chromatography* 1993; 575:153-7.
- 52.- Razzaque MA, Topps JH. Determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid in ruminants' urine. *J Sci Food Agric* 1978; 29:935-9.
- 53.- Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone

Síntesis microbial en rumiantes y derivados de purina.

- chromogenic system in direc enzymatic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem 1980; 26:227-31.
- 54.- Lux O, Naidoo D, Salonikas C. Improved HPLC method for the simultaneous measurement of allantoin and uric acid in plasma. Ann Clin Biochem 1992; 29:674-5.
- 55.- Fujihara T, Orskov ER, MacLeod NA. Effect of protein infusión on excretion of purine derivatives in steers nourished by intragastric nutrition. Proc Nutr Soc 1985; 44:138A.
- 56.- Chen XB, Mejia AT, Kyle DJ, Orskov ER. Evaluation of the use of the purine derivative:creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. J Agric Sci Cambridge 1995; 125:137-43.
- 57.- Chen XB, Grubic G, Orskov ER, Osuji P. Effect of feeding frequency in diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. Anim Prod 1992c; 55:185-91.
- 58.- Walker DM, Faichney GJ. Nitrogen balance studies with the milk fed lamb. 2. The partition of urinary nitrogen and sulphur. Br J Nutr 1964; 18:201-7.
- 59.- Hovell FDDeB, Orskov ER, MacLeod NA, McDonald I. The effect of changes in the amount of energy infused as volatile acids on the nitrogen retention and creatinine excretion of lambs wholly nourished by intragastric infusión. Br J Nutr 1983; 50:331-43.
- 60.- Chen XB, Chowdhury SA, Hovell FDDeB, Orskov ER, Kyle DJ. Endogenous allantoin excretion in response to changes in protein supply in sheep. J Nutr 1992b; 122:2226-32.
- 61.- Tiemeyer W, Stohrer M, Giesecke D. Metabolites of nucleic acids in bovine milk. J Dairy Sci 1984; 67:723-8.
- 62.- Rosskopf R, Rainer H, Giesecke D. Purine and pyrimidine metabolites for the evaluation of rumen metabolism: HPLC analysis in milk and blood plasma. Arch Anim Nutr 1991; 41:411-26.
- 63.- Rosskopf R, Giesecke D. Investigations in cows on the influence of energy intake on rumen metabolism by means of allantoin excretion in the milk. J Vet Med 1992; 39:515-24.
- 64.- Giesecke D, Ehrentreich L, Stangassinger M, Ahrens F. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. J Dairy Sci 1994; 77:2376-81.
- 65.- Martin-Orue SM, Dapoza C, Balcells J, Castrillo C. Purine derivatives excretion in lactating ewes fed straw diets with different levels of fish meal. Anim Feed Sci Technol 1996; 63:341-6.
- 66.- Gonda HL, Linberg JE. Effect of diet on milk allantoin and its relationship with urinary allantoin in dairy cows. J Dairy Sci 1997; 80:364-73.
- 67.- Ortin A, Lopez MJ, Muiño MT, Cebrian JA. Extraction of xanthine oxidase from milk by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. J Chromatography 1991; 558:357-67.