

# Comportamiento de la actividad enzimática de gamma glutamil transferasa en líquido ruminal bovino sometido a métodos térmicos, físicos y químicos<sup>1</sup>

## Behavior of Enzyme Activity of Gamma Glutamyl Transferase in Bovine Ruminal Liquid Subjected to Thermal, Physical and Chemical Treatments

Wilmer A. Cuervo Esp. MSc (c)\*

\* Zootecnista de la Universidad Nacional de Colombia. Especialista en Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia. Magíster en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia. Docente de tiempo completo de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Bucaramanga. Miembro del grupo de investigación "Nutrición, Toxicología y Reproducción" (Grupontra) de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Bucaramanga. Correo electrónico: wilmer.cuervo@campusucc.edu.co

Héctor J. Correa MSc Ph.D.\*\*

\*\* Zootecnista de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Magíster en Producción Animal de la UNAM, México. Ph.D. de la Universidad Nacional de Colombia. Profesor asociado del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Correo electrónico: hjcorreac@unal.edu.co

Recibido: 9 de mayo del 2012 • Aceptado: 9 de agosto del 2012

### Resumen

El proyecto "Comportamiento de la actividad enzimática de gamma glutamil transferasa en líquido ruminal bovino sometido a métodos térmicos, físicos y químicos", desarrollado en el 2012 por el grupo de investigación "Nutrición, Toxicología y Reproducción" (Grupontra), de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Bucaramanga, fue conducido para determinar el efecto de tratamientos de descongelamiento, centrifugación y adición de sales de magnesio sobre la actividad en líquido ruminal (LR) de la enzima gamma glutamil transferasa (GGT) de bovinos fistulados. Se extrajeron 2 muestras de 100 ml de LR de vacas Holstein fistuladas (620±14 kg 7 años de edad). Las muestras se almacenaron en congelación y posteriormente se dividieron en partes

### Abstract

In order to determine the effect of treatments using centrifugation, thawing and the addition of magnesium salts on activity in rumen fluid (LR) of gamma glutamyl transferase (GGT) cattle, 2 samples (100 mL each) of LR were extracted from mature, fistulated Holstein cows (620 ± 14 Kg 7 years old). Samples were stored frozen and then divided equally and subjected to sequential treatments of thawing [room temperature (LRDC) or water bath (LRCal)], centrifugation [9.000 rpm x 10 min (LRDC+C and LRCal+C)], and the addition of salt and Mg [MgSO<sub>4</sub> or MgCl<sub>2</sub>]. The data were compared with fresh rumen fluid (LRF) extracted from the same cows. The activity of the gamma glutamyl transferase (GGT) was measured on all samples by applying the

---

Cómo citar este artículo: Cuervo WA, Correa HJ. Comportamiento de la actividad enzimática de gamma glutamil transferasa en líquido ruminal bovino sometido a métodos térmicos, físicos y químicos. *Spei Domus*, 2012; 8(17):14-21.

<sup>1</sup>Artículo de investigación derivado del proyecto "Comportamiento de la actividad enzimática de gamma glutamil transferasa en líquido ruminal bovino sometido a métodos térmicos, físicos y químicos", desarrollado en el 2012 por el grupo de investigación "Nutrición, Toxicología y Reproducción" (Grupontra), de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Bucaramanga.

iguales y fueron sometidas a tratamientos secuenciales de descongelación [temperatura ambiente (LRDC) o baño de María (LRCal)], centrifugación [9.000 rpm x 10 min (LRDC+C y LRCaI+C)] y adición de sal de Mg [ $MgSO_4$  o  $MgCl_2$ ]; los datos se compararon con líquido ruminal fresco (LRF) extraído de las mismas vacas. Sobre todas las muestras se midió la actividad de la GGT por el método colorimétrico utilizando un kit espectrofotométrico. Los promedios de los tratamientos se compararon por medio de una prueba t, la cual reveló que las muestras de LR con adición de  $MgCl_2$  presentaron significativamente ( $p < 0,01$ ) mayor actividad in vitro que las muestras del tratamiento control o con  $MgSO_4$ . Adicionalmente se observó una disminución en la actividad enzimática del LR que se centrifugó, frente a los demás tratamientos. Se concluye que la adición de  $MgCl_2$  afecta positivamente la actividad de la enzima GGT in vitro, al contrario del efecto generado por el tratamiento físico de centrifugación. Aunque ambos tratamientos térmicos originaron aumentos en la actividad enzimática, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al líquido ruminal fresco.

**Palabras clave:** aminotransferasas, iones divalentes, nitrógeno no proteico, rumen, vacas lecheras.

## Introducción

El estudio de la fisiología digestiva del rumen se ha apoyado en algunos principios, entre ellos la degradación de nutrientes en el ambiente ruminal y la generación de productos de la fermentación microbiana. Dichos fenómenos se han medido por procedimientos como la técnica in situ de la bolsa de nylon (1), la técnica de gases in vitro (2) y el Rusitec (3). Estas técnicas de laboratorio buscan además evaluar el valor nutricional de forrajes y utilizan como inóculo el líquido ruminal (LR). Este fluido provee para los bioensayos valiosa información acerca de la digestión de forrajes, poblaciones bacterianas y de protozoos (4), nivel de ácidos grasos volátiles, así como la presencia y actividad de algunas enzimas de interés (5). El LR de bovinos contiene tanto proteína bacteriana como enzimas, mono y disacáridos libres, macro y micro minerales (6). En el medio líquido se llevan a cabo infinidad de reacciones de fermentación y metabolismo microbiano, que definen en parte el destino y la repartición de nutrientes hacia los tejidos periféricos

colorimetric method using a spectrophotometric kit (Biosystems®). The means of treatments were compared using a t test, which revealed that samples of lr with the addition of  $MgCl_2$  had significantly greater in vitro activity ( $p < 0.01$ ) than samples from the control group or from those treated with  $MgSO_4$ . A decrease in enzyme activity was also observed when the samples were placed in a centrifuge, as compared to other treatments. We conclude that the  $Mg^{++}$  positively affects GGT enzyme activity in vitro in contrast to the physical effect of the spin treatment. Although both thermal treatments increased enzyme activity, there were no significant differences with respect to fresh rumen fluid.

**Keywords:** aminotransferasas, divalent ions, non-protein nitrogen, rumen, dairy cows.

incluyendo el hígado (7). Para su obtención usualmente se utilizan vacas canuladas al rumen (8). Estas técnicas precisan intervención sobre los animales experimentales (fistulación), altos costos, equipos especializados para el análisis de muestras y personal capacitado para realizarlo (9).

Sobre el LR obtenido de animales experimentales por medio de estas técnicas, se llevan a cabo procesos que van desde congelación y posterior descongelación (10), liofilización y diversos tipos de filtrado (11), hasta diversas velocidades de centrifugación (12). Se ha determinado que los microorganismos presentes en LR preservado bajo congelación y posteriormente descongelados y centrifugados poseen hasta 8 veces mayor actividad proteolítica que aquellos microorganismos de LR fresco (13).

Dichos microorganismos llevan a cabo la fijación de nitrógeno no proteico (NNP) para la síntesis de proteína verdadera (14,15,16). Esta incorporación ruminal de compuestos nitrogenados y su posterior conversión

en aminoácidos, está mediada por 4 enzimas, a saber: aspartato amino transferasa (AST E.C. 2.6.1.1), alanino amino transferasa (ALT E.C. 2.6.1.2), glutamato deshidrogenasa (GDH E.C. 1.4.1.4) y gamma glutamil transferasa (GGT E.C. 2.3.2.2) (14). La última es la responsable de la etapa inicial de incorporación de amonio a cetoácidos (17). Por medio de este proceso enzimático se obtiene una molécula de glutamato y se utiliza como coenzima al sistema NADH+H<sup>+</sup> (18), en el que a su vez actúan como cofactores iones divalentes como Co, Cu y Mg (19). En condiciones in vitro se ha determinado que la adición de este tipo de iones al líquido ruminal de ovinos ejerce efectos significativos sobre la actividad de aminotransferasas (5,19). Sin embargo, no se han determinado efectos de tratamientos conjuntos y consecutivos sobre parámetros químicos en el líquido ruminal.

El objetivo del presente estudio fue determinar, por consiguiente, el efecto ejercido por tratamientos térmicos de descongelación, físicos y químicos sobre la actividad enzimática de la GGT en LR de vacas lecheras.

## Materiales y métodos

### Ubicación y animales

La investigación se realizó en la Granja Experimental de Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en el municipio de Santa Elena, Antioquia, a 2.538 msnm y que pertenece a la zona de vida de bosque húmedo montano bajo (bH – MB). Se utilizaron tres vacas de la raza Holstein, adultas no lactantes canuladas al rumen, con un peso y edad promedio de 620 kg y 7 años, respectivamente. Los animales fueron alimentados a voluntad con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov).

### Obtención de muestras

Se tomaron muestras de contenido ruminal de cada animal a las 08:00. A través de la cánula ruminal el contenido fue exprimido y filtrado por cuatro capas de gasa quirúrgica para obtener aproximadamente 200 mL de LR por animal (10,11,20,21). Con el objetivo de mantener las condiciones de anaerobiosis y temperatura, el LR almacenado en un recipiente plástico se transportó al Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en un

termo contenedor con agua a 39 °C. Posteriormente las muestras se congelaron a -4 °C durante 48 horas.

### Diseño experimental

De la muestra inicial, 100 mL se descongelaron a temperatura ambiente (LRDC), mientras que la muestra restante (100 mL) se introdujo en baño de María (LRCal) a 39 °C durante 40 minutos (10,11). En el momento en que ambas submuestras alcanzaron el estado líquido, se dividieron en dos porciones iguales de 50 mL cada una; una porción de cada tratamiento térmico se sometió a centrifugación (LRDC+C, LRCal+C) a 9.000 rpm durante 10 minutos.

Del sobrenadante de cada uno de estos dos tratamientos se extrajeron 3 alícuotas de 10 mL cada una. Estas alícuotas (a, b y c) recibieron adición de MgCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub>, respectivamente, mientras que la última alícuota no recibió adición de mineral. La adición se realizó hasta alcanzar una concentración en el LR de aproximadamente 20x10<sup>-3</sup> mol/L según la metodología de Faixhova et al. (5). De acuerdo con el contenido de Mg se adicionaron 24 mg de MgSO<sub>4</sub> y 19 mg de MgCl<sub>2</sub> a un volumen de 10 mL de LR de cada alícuota (excepto a la del control).

Luego de 7 días se obtuvo LR de los mismos animales fistulados; el análisis de la actividad enzimática de GGT en estas muestras se realizó 1 hora después de su colecta en campo, por lo que se caracterizó como líquido ruminal fresco (LRF). Se tomaron igualmente 3 alícuotas de la muestra de LR de cada animal y se adicionaron MgSO<sub>4</sub> y MgCl<sub>2</sub> en las dosis antes mencionadas.

Debido a que se obtuvieron 200 mL de LR de cada animal, la determinación enzimática para todos los tratamientos se hizo por duplicado.

### Medición de la actividad enzimática

Se realizó la medición sobre las muestras de los cinco tratamientos (LRDC, LRCal, LRDC+C, LRCal+C, LRF) con cada una de las fuentes minerales. Para ello se utilizó un espectrofotómetro de luz visible (UV) vis, y se tomaron lecturas de la absorbancia a 405 nanómetros (NM) registrada cada minuto durante 3 minutos. Se estableció con estos datos la diferencia entre las lecturas ( $\Delta$ ), y esta diferencia se ingresó en la siguiente ecuación:

**Ecuación 1.** Determinación de la actividad enzimática

$$\Delta A / \text{min} \propto \frac{V_t * 10^6}{\epsilon * I * V_s} = U/L$$

Kit No 11520 Byosystems ®

donde:

 $\Delta A / \text{min}$  = diferencia promedio entre lecturas de absorbancia $V_t$  = volumen total de la reacción (1,1) $\epsilon$  = coeficiente de absorción molar de 3-carboxy-4-nitroanilina a 405 nm (9900) $I$  = el paso de la luz (1 cm) $V_s$  = volumen de la muestra (0,1)**Análisis estadístico**

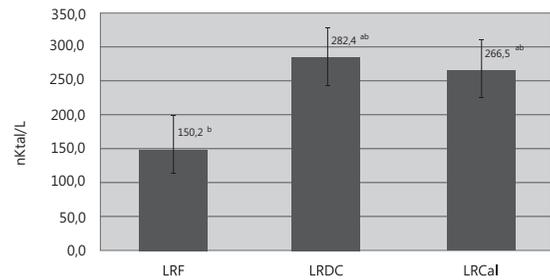
Se utilizó un diseño en bloques incompletos al azar. Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó un arreglo factorial 3x2x3, en el que los factores analizados fueron: el tratamiento térmico (con dos niveles), el tratamiento físico (centrifugación, con dos niveles), y la adición de fuentes minerales, este último con tres niveles ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  y sin adición de mineral). Los datos se introdujeron en un análisis de varianza, en el que se establecieron efectos e interacciones significativas a partir de valores de  $p < 0,05$ .

Se utilizó el PROC GLM y el comando LSMEANS del paquete estadístico SAS® (1998) en donde la variable respuesta por analizar fue la actividad enzimática, expresada en nKtal/L. De igual forma se expresó en porcentaje, considerando 100% la actividad enzimática de las vacas control. Los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar, y la significancia estadística de las diferencias entre valores se determinó por la prueba t-Student.

**Resultados**

De manera general, como se observa en la figura 1, se detectaron cambios importantes causados por los tratamientos físicos, térmicos y químicos sobre el LR, para lo cual resultó útil la comparación con el LR fresco. Se evidenció un alto nivel de variabilidad en la actividad de la enzima entre las muestras de los animales del experimento.

El LR descongelado a temperatura ambiente presentó una mayor actividad enzimática con respecto al calentado y al fresco. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos térmicos ( $p > 0,01$ ).



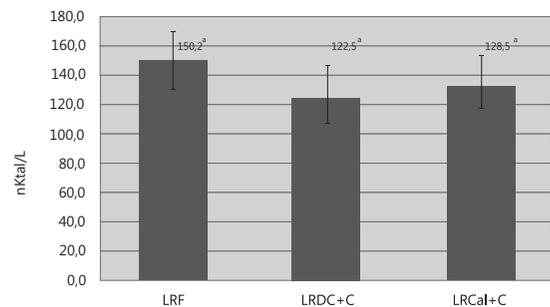
nKtal/L = nanokatales por litro.

LRF: Líquido ruminal fresco; LRDC: LR descongelado; LRDC+C: LR descongelado y centrifugado; LRCal: LR calentado; LRCal+C: LR calentado y centrifugado.

Medias con letras diferentes presentaron (ab)  $p < 0,0034$ **Figura 1.** Valores promedio de la actividad enzimática ruminal de GGT (nKtal/L) según dos tratamientos de descongelación

Fuente: los autores

Como se observa en la figura 2, se presentó una disminución en la actividad ruminal de la GGT causada por el tratamiento físico de la centrifugación. La ausencia de tratamiento de centrifugación generó un aumento en la actividad enzimática de la GGT en el LR ( $p < 0,05$ ).



LRF= Líquido ruminal fresco; LRDC+C= LR descongelado y centrifugado; LRCal+C=LR calentado y centrifugado.

Medias con letras diferentes (ab) presentaron diferencias significativas t ( $p > 0,01$ ) (a) no existen diferencias significativas**Figura 2.** Valores promedio del efecto físico sobre la actividad ruminal GGT (nKtal/L)

Fuente: los autores

Hubo un efecto del tratamiento físico de centrifugación ( $p < 0,01$ ) sobre la actividad enzimática, así como de la adición de sal mineral ( $p < 0,01$ ). No se presentaron interacciones significativas de segundo orden; sólo una de primer orden ( $p < 0,0001$ ) entre el tratamiento térmico (LRDC o LRCal) y el químico ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , SIN). La información se resume en la tabla 1.

A pesar de que la interacción del calentamiento y la adición de sal fueron significativas, los resultados mostraron que la actividad de la GGT se vio afectada por la utilización de las sales de magnesio, por lo que se

analizó el efecto generado por este tratamiento (véase tabla 2). Para este análisis se hizo una comparación de medias por medio de la prueba t de Student. El único

tratamiento que mostró una actividad superior fue el del LR en el que se adicionó MgCl<sub>2</sub>, y que se resume en la tabla 2.

**Tabla 1.** Significancia de los efectos principales e interacciones sobre la actividad de la GGT

Fuente variación	gl	Error tipo III	CMC	p
Animal	2	6231,5	3115,8	0,670
Calentamiento	2	12875,0	6437,5	0,442
Centrifugación	1	193004,9	193005,0	<,0001
Calentamiento y centrifugación	1	9,8	9,9	0,971
Adición sal	2	125017,9	62508,9	0,001
Calentamiento y adición sal	4	283230,2	70807,5	<,0001
Centrifugación y adición sal	2	45,3	22,6	0,997
Calentamiento, centrifugación y adición sal	2	2133,9	1066,9	0,870

gl: grados de libertad  
 CMC: cuadrado medio calculado  
 p: Valor p (significancia < 0,01)

Fuente: los autores

Como se observa en la tabla 2, la adición de MgCl<sub>2</sub> sobre el LR fresco generó un aumento significativo en la actividad enzimática. Se comprueba que la aplicación de tratamiento físico sobre el LR produce una disminución significativa incluso con la adición de sal mineral.

Comparando la actividad enzimática de GGT ruminal de los diversos tratamientos físicos y térmicos, se determinó que la adición de MgCl<sub>2</sub> en el LR fresco eleva la actividad enzimática de la GGT (p < 0,001), como se muestra en la figura 3 y en la tabla 3.

**Tabla 2.** Efecto de la adición de sales de Mg sobre la actividad enzimática de GGT (nKtal/L) en el líquido ruminal con tratamientos previos

Adición sal mineral	T° Ambiente		39 °C x 40 min		LR Fresco	p	Media
	Sin centrifugación	Con centrifugación	Sin centrifugación	Con centrifugación			
SIN	282,4 <sup>a</sup>	122,5 <sup>b</sup>	266,5 <sup>a</sup>	128,5 <sup>b</sup>	150,2 <sup>b</sup>	**	190,09
MgSO <sub>4</sub>	248,2 <sup>a</sup>	125,4 <sup>b</sup>	272,5 <sup>a</sup>	108,3 <sup>b</sup>	169,8 <sup>b</sup>	***	184,7
MgCl <sub>2</sub>	260,5 <sup>bc</sup>	100,8 <sup>c</sup>	268,7 <sup>b</sup>	134,6 <sup>bc</sup>	616,3 <sup>a</sup>	***	276,2

Medias con diferente letra en cada fila presentaron diferencias estadísticamente significativas (p<0,01)

(\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,01)

SIN= LR sin adición de sal mineral; MgSO<sub>4</sub>= LR con adición de MgSO<sub>4</sub>; MgCl<sub>2</sub>= LR con adición de MgCl<sub>2</sub>

Fuente: los autores

**Tabla 3.** Efecto general de los tratamientos sobre la actividad enzimática ruminal GGT

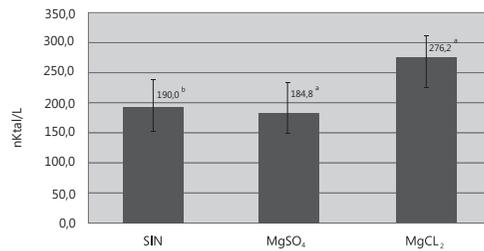
Tratamiento químico	LRDC		LRCal		LR fresco
	Centrifugado	No centrifugado	Centrifugado	No centrifugado	
Adición MgSO <sub>4</sub>	83±35NS	165±27NS	72±22***	181±54*	113±46NS
Adición MgCl <sub>2</sub>	67±18NS	173±58NS	90±4NS	179±34*	410±190***
Sin adición	82±27NS	188±64*	86±22NS	177±34*	-

Centrifugado= LR que fue centrifugado; no centrifugado= LR que no fue centrifugado.

Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad enzimática ruminal, considerando 100% la actividad presentada por el líquido ruminal fresco.

Los datos se presentan como la media aritmética ±DE. En cada fila, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 y NS sin diferencias significativas.

Fuente: los autores



Datos promedio de todas las mediciones de LR  
Medias con letras diferentes presentaron diferencias significativas t ( $p < 0,001$ ).

La gráfica muestra que hubo diferencia significativa entre los parámetros sin frente a los otros dos parámetros; sin embargo no mostró diferencia significativa entre los otros dos parámetros.

**Figura 3.** Valores promedio del efecto del tratamiento químico sobre la actividad ruminal GGT

Fuente: los autores

Pese a la significancia de los resultados, se observó un alto nivel de variabilidad entre las actividades enzimáticas de los líquidos ruminales en los animales experimentales. El efecto general de la adición de  $MgCl_2$  sobre la actividad de la GGT en LR se observó de manera evidente en las muestras de LR fresco y aquel que fue calentado pero no centrifugado.

## Discusión

Contrario a lo reportado en el presente estudio, Mayo et al. (13), trabajando con temperaturas de congelación mucho menores ( $-20$  a  $-80$  °C), encontraron en LR descongelado de ovejas disminuciones de la actividad digestiva normal en LR medida como la digestibilidad in vitro de la materia seca. Los mismos autores, midiendo digestibilidad de la materia seca in vitro (DIVMS), observaron una marcada disminución en la actividad ruminal, que en parte puede ser atribuida a la pérdida de microorganismos ruminales o al agotamiento de nutrientes (22); en este caso la actividad enzimática ruminal de GGT en LR descongelado a temperatura ambiente o calentado en baño de María presentó valores similares al del LR fresco.

De acuerdo con Ziegler et al. (10), la congelación de líquido ruminal (LR) para su preservación y posterior estudio de la actividad digestiva de las bacterias ruminales es un proceso viable, al menos en estudios de digestibilidad in vitro de la materia seca de dos pasos. Sin embargo, en el presente trabajo no se utilizó la adición de solución buffer o de urea; por lo demás, el congelamiento y descongelamiento siguió la misma metodología de trabajos previos (10,11,20) alcanzando

el LR descongelado valores superiores en la actividad de la aminotransferasa.

Por otro lado, los datos del presente trabajo concuerdan con los reportes de Luchini et al. (11), que determinaron que tratamientos físicos de centrifugación por encima de 5.000 rpm en líquido ruminal bovino disminuyen la actividad normal de las bacterias ruminales preservadas (23).

Resultados similares a los encontrados en el presente experimento fueron reportados por Faixová et al. (19), en los que se comprueba el efecto positivo de la adición de Mg en el LR sobre la actividad enzimática, específicamente de aminotransferasas. Al igual que Cruz et al. (24) y Faixova y Faix (5), que trabajaron con diversos iones divalentes (Mg, Zn, Cu, Ba, Co), en este experimento se demuestra que estos cumplen un papel fundamental como cofactores en la reacción de transaminación, potenciando la actividad de dichas enzimas; en el caso particular, de la GGT.

Al igual que en estudios previos (5,19) la sal de Mg utilizada ( $MgCl_2$ ) generó un aumento en la actividad de la GGT en el LR de vacas lecheras. No obstante, el aumento detectado fue de más de 400% con respecto a la actividad del LR fresco, mientras que el reporte previo fue de un 131%, proveniente de LR ovino. La concentración utilizada en dichos trabajos fue de  $5 \times 10^{-3}$  mol/L y en el presente estudio fue de  $20 \times 10^{-3}$  mol/L.

Se confirma el carácter ubicuo de las aminotransferasas, especialmente de la GGT, siendo una glicoproteína anclada en la membrana plasmática de células animales (25), lo que permite al menos postular que esta enzima puede ser producida por microorganismos ruminales (23), teniendo en cuenta que otras aminotransferasas han sido encontradas en microorganismos ruminales como la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la alanina deshidrogenasa (ALT) (18).

Dado que investigaciones previas han determinado que todo proceso de liofilización, centrifugación (11) y congelamiento (13,10) sobre el LR produce una disminución en la masa microbiana, así como agotamiento de nutrientes en el medio, es plausible señalar que la actividad de esta enzima no se ve afectada por ninguno de los factores antes mencionados.

Tradicionalmente se ha citado al óxido o al carbonato como fuentes suplementadas en dietas para bovinos (26), sirviendo como bufferizantes, e incluso al sulfato y al cloruro (27) como elementos preventivos en la aparición de hipomagnesemia posparto. No obstante, en el presente estudio la adición in vitro del  $MgCl_2$  generó efectos

significativamente superiores a los expresados con la adición de  $MgSO_4$  en la actividad enzimática ruminal.

Se postula que la diferencia exhibida por parte de las fuentes minerales puede estar relacionada con el tamaño de partícula de acuerdo con lo encontrado previamente por Henry y Benz (28) y Fishwick (29). Por otro lado, el  $MgCl_2$ , al presentar un alto contenido de Cl (37%) (30), es un compuesto con una absorción superior a nivel ruminal (23), que genera mayor cantidad de cofactor (Mg) en la reacción de fijación de amonio a un cetoácido, mediada por la GGT, lo que en parte explicaría el fenómeno observado en el presente estudio (31).

Finalmente es necesario aclarar que en la presente investigación se utilizó una menor velocidad de centrifugación (9.000 rpm vs. 17.000 rpm) y tiempo (10 min vs. 30 min) que la reportada previamente por Luchini et al. (11), pero se utilizó un tiempo similar al reportado por Moharrerry y Tirta (20). Además, la temperatura de congelación del LR fue mucho menor que la indicada en todos los reportes previos de Mayo et al. (13) y Luchini et al. (11) (-20 °C a -80 °C) o la reportada por Moharrerry y Tirta (20) (-196 °C en nitrógeno líquido). De igual forma, no se utilizaron elementos criopreservantes como el glicerol ni la adición de  $CO_2$  de acuerdo con las metodologías relacionadas anteriormente.

## Conclusiones

Los resultados del estudio indican que, independientemente del método de descongelación del LR, el tratamiento físico de centrifugación a 9.000 rpm durante 10 minutos disminuye la actividad enzimática de la GGT, posiblemente por la ubicación de esta enzima en la membrana celular de los microorganismos ruminales localizados en su mayoría en la fase sólida del contenido ruminal adherida a partículas fibrosas de la dieta.

Los datos analizados en el experimento demuestran que, sin importar el tratamiento físico o térmico, la adición al LR de  $MgCl_2$  como fuente de Mg aumentó significativamente la actividad de la GGT.

Los resultados de la presente investigación permiten postular que la actividad de la GGT en LR fresco obtenido de animales fistulados es ampliamente superior en ovinos (1.110 nKtal/L) que en bovinos (150 nKtal/L). No obstante, el aumento generado por la adición in vitro de  $MgCl_2$  es ampliamente superior (410%) al reportado previamente.

En el experimento, el efecto positivo en la actividad ruminal de la GGT por parte del  $MgSO_4$  fue

significativamente inferior al exhibido por el  $MgCl_2$ , lo cual indica que adicionalmente al efecto preventivo en la hipomagnesemia, el  $MgCl_2$  puede ser utilizado como una fuente alternativa para aumentar la fijación de nitrógeno no proteico por parte de los microorganismos ruminales, disminuyendo su excreción.

Según lo evidenciado en esta investigación, se recomienda que para el procesamiento de muestras de LR congelado se utilice baño de María como método de descongelación. De igual forma, para experimentos de determinación de enzimas en el LR, es aconsejable, en la medida de lo posible, no centrifugar las muestras.

Los resultados encontrados en este experimento ponen de manifiesto la necesidad de futuras investigaciones acerca de la suplementación con  $MgCl_2$ , específicamente para comprobar sus efectos a nivel in situ e in vivo, sobre la actividad de esta y otras aminotransferasas, así como la utilización de nitrógeno amoniacal midiendo este elemento en rumen, y de nitrógeno ureico en sangre o en leche. Resultaría útil de igual manera el estudio de otras aminotransferasas como la ALT, AST y GDH en bovinos, para tener una idea completa acerca del efecto de la suplementación mineral sobre el metabolismo nitrogenado en el medio ambiente ruminal.

## Referencias

1. Ørskov E, DeB Hovell FD, Mould F. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop Anim Prod* 1980; 5:3.
2. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*. 1994; 48: 185-97.
3. Czerkawski J, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br J Nutr*. 1977; 38:371.
4. Owen F, Goetsch A. Fermentación Ruminal. En: Church DE. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Cap. 8. Zaragoza: Ed. Acribia; 1989.
5. Faixová Z, Faix S. Influence of Metal Ions on Ruminant Enzyme Activities. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2002; 71(1):451-5.
6. Church DE. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Cap. 8, p. 168-72; Cap. 3, p. 283. Zaragoza: Ed. Acribia; 1988.
7. Reynolds C, Maltby S. Regulation of Nutrient Partitioning by Visceral Tissues in Ruminants. *American Institute of Nutrition*; 1994. 0022-3166/94.
8. Posada S, Noguera R. Técnica in vitro de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para

- rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 2005; 17(4).
9. Ceballos A, Noguera R, Bolívar D, Posada S. Comparación de las técnicas in situ de los sacos de nylon e in vitro (DaisyII) para estimar la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 2008; 20(7).
  10. Zeigler D, Schlegel M, Edwards M. Development of A Rumen Fluid Preservation Technique and Application to An In Vitro Dry Matter Digestibility Assay. Nutrition Advisory Group. California State Polytechnic University Pomona; 2003.
  11. Luchini N, Broderick G, Combs D. Preservation of ruminal microorganisms for in vitro determination of ruminal protein. *J Anim Sci*. 1996; 74:1134-43.
  12. Hsu J, Fahey G. Effects of Centrifugation Speed and Freezing on Composition of Ruminal Bacterial Samples Collected from Defaunated Sheep Original Research Article. *Journal of Dairy Science*. January 1990; 73(1):149-52.
  13. Mayo M, Sánchez M, Hernández F, Rivas M. Evaluación de diferentes métodos de conservación del líquido ruminal para pruebas in vitro. *Nutrición y alimentación*. 2000; xxv: comunicación 9.
  14. Owens F, Zinn R. Metabolismo de la proteína en los rumiantes. En: Church D. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Cap 12. Zaragoza: Ed Acribia; 1988.
  15. Huntington GB. Uptake and transport of nonprotein nitrogen by the ruminant gut. *Fed Proc*. 1986; 45:2272-6.
  16. Anison E, Briden W. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. II. Metabolism in ruminant tissues. *Nutrition Research Reviews*. 1999; 12: 147-77.
  17. Conn E, Stumpf P, Bruening G, Doi R. *Bioquímica fundamental*. 5a. ed. Cap 6; 2000. p. 138-9.
  18. Pabón M. Notas de clase. *Bioquímica ruminal*; 2004.
  19. Faixová Z, Faix S, Makova Z, Vaczi P, Prosboba M. Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2006; 56(1):17-23.
  20. Moharrery A, Tirta K. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Reprod Nutr Dev*. 2001; 41:513-29.
  21. Cuervo W, Orrego C, Correa HJ. Determinación de la actividad in situ de gama glutamil transferasa (GGT) bajo el efecto de infusión ruminal de magnesio. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2011; 24:3.
  22. Reynolds C, Maltby S. Regulation of Nutrient Partitioning by Visceral Tissues in Ruminants. *American Institute of Nutrition*. 0022-3166/94. 1994.
  23. Owen F, Goetsch A. Fermentación ruminal. Cap. 8. En: Church D. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Zaragoza: Ed. Acribia; 1989.
  24. Cruz R, Hernández-Calva L, Guerrero M, Pérez C, Ramírez-Bribiesca E. Fisiología digestiva en corderos alimentados con dietas altas. En: *Energía y dos concentraciones de selenio y magnesio*. XXIX Congreso Nacional de Buiatría, México; 2002.
  25. Keillor JR, Castonguay R, Lherbet C. *Meth. Enzymol*. 2005; 401:449-67.
  26. Schaefer D, Wheeler L, Noller C, White J. Neutralization of Acid in the Rumen by Magnesium Oxide and Magnesium Carbonate. *Journal of Dairy Science*. 1982; 65(5):732-9.
  27. Kemp A, Todd, JR Prevention of hypomagnesaemia in cows: the use of magnesium alloy bullets. *Veterinary Record*. 1970; 86:463-4.
  28. Henry PR, Benz SA. Magnesium bioavailability. In: Ammerman CB, Baker DH, Lewis AJ editors. *Bioavailability of Nutrients for Animals*. New York: Academic Press; 1995. p. 239-56.
  29. Fishwick G. Utilisation of the phosphorus and magnesium in some calcium and magnesium phosphates by growing sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1978; 21:571-5.
  30. NRC. National Research Council 2001 Nutrients requirements of dairy cattle. Seven Revised ed., Chap 1, 9, 12, 15. National Academic Press; 2001.
  31. Tokoyama M, Johnson K. Microbiología del rumen e intestino en el rumiante. En: Church D. *Fisiología digestiva y nutrición*; 1988. p. 137, 189.