



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

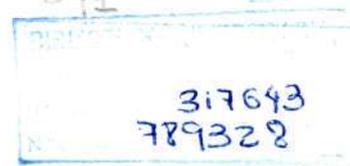
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN GANADO CAPRINO: USO DE  
CALOSTROS ALTERNATIVOS, CONSERVACIÓN E HIGIENIZACIÓN DEL  
CALOSTRO Y EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO  
CONJUGADO EN LA DIETA**

**Noemí Castro Navarro**

**Las Palmas de Gran Canaria, febrero 2005**



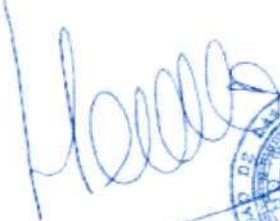


D. PEDRO HERRAEZ THOMAS, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento de Morfología, en su sesión de fecha 15 de octubre de dos mil cuatro tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **"INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN GANADO CAPRINO: USO DE CALOSTROS ALTERNATIVOS, CONSERVACIÓN E HIGIENIZACIÓN DEL CALOSTRO Y EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN LA DIETA"** presentada por la doctoranda D<sup>o</sup> Noemí Castro Navarro y dirigida por los Doctores Anastasio Argüello Henríquez y Juan Capote Álvarez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente, en Las Palmas de Gran Canaria, a veinticuatro de noviembre de dos mil cuatro




**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA  
PROGRAMA DE DOCTORADO "SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL"**

**INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN GANADO CAPRINO: USO DE  
CALOSTROS ALTERNATIVOS, CONSERVACIÓN E HIGIENIZACIÓN DEL  
CALOSTRO Y EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO  
CONJUGADO EN LA DIETA**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por Noemí Castro Navarro

Dirigida por el Dr. Anastasio Argüello Henríquez y el Dr. Juan Capote Álvarez

El Director

Dr. Anastasio Argüello Henríquez

El Director

Dr. Juan Capote Álvarez

La Doctoranda

Noemí Castro Navarro

Las Palmas de Gran Canaria, febrero 2005

ANASTASIO ARGÜELLO HENRÍQUEZ, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y JUAN CAPOTE ÁLVAREZ, INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN ANIMAL, PASTOS Y FORRAJES DEL INSTITUTO CANARIO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**INFORMAN:**

Que Noemí Castro Navarro, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "Inmunidad humoral y celular en ganado caprino: uso de calostros alternativos, conservación e higienización del calostro y efecto de la inclusión de ácido Linoleico conjugado en la dieta" considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, febrero 2005



Fdo. Anastasio Argüello Henríquez



Fdo. Juan Capote Álvarez

**A mis padres y hermana**

**A Juan Miguel**

## AGRADECIMIENTOS

## Agradecimientos

A continuación quiero expresar en unas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado para que hoy se pueda presentar este trabajo.

En primer lugar, y no por formalismo, quiero dar las gracias a mis Directores, Anastasio Argüello y Juan Capote, a ambos tengo que agradecerles mucho más que esta Tesis Doctoral. Tacho ha sido mi maestro desde el año 1998, momento en que yo llegué a la Unidad de Producción Animal, y a él tengo que agradecerle que unos años más tarde me brindara la oportunidad de realizar este trabajo, así como el gran esfuerzo que le ha supuesto llevarlo adelante. De él aprendo cada día cosas nuevas, siempre está pendiente de mi formación, dejando incluso de lado sus cosas para ayudarme en todo momento, pero fundamentalmente me gustaría destacar como ha sabido soportar mi difícil carácter incluso en los peores momentos. A Capote igualmente quiero agradecerle que haya confiado en mí, así como cada uno de sus sabios consejos y su gran colaboración sin la cual, tal vez, este trabajo no vería la luz. Tanto el Dr. Argüello como el Dr. Capote han sabido llevar a cabo a la perfección que el arte de dirigir consiste en saber cuando hay que abandonar la batuta para no molestar a la orquesta. De verdad, es un gran lujo trabajar y dialogar con ambos GRACIAS

A Rafa, Juanma y M<sup>a</sup> Jesús por su colaboración con este trabajo y por lo que me han tenido que aguantar más de una vez en muchas de nuestras conversaciones, de cada una de ellas he aprendido algo.

A los miembros de la Unidad de Reproducción y Obstetricia por su gran apoyo en todo momento.

A los operarios de la Granja (Antonio, Juan, Luis y Rosario) por su colaboración en la tarea de recogida de muestras, así como por todos los buenos ratos que me han hecho pasar, los cuatro han prestado su colaboración incluso sin entender muchas veces porqué. Asimismo quisiera agradecer a los conserjes, personal de limpieza, Jose (mantenimiento) y Jose (jardinería) su colaboración.

A todos los alumnos que han estado colaborando con las tareas de la lactancia artificial quisiera agradecerles el interés y esmero que han puesto en todo momento.

A Félix, por su ayuda con los análisis de óxido nítrico, pero fundamentalmente por todo lo que me ha tenido que escuchar y aguantar esbozando en todo momento la mejor de sus sonrisas.

Al personal de la Unidad de Producción Animal Pastos y Forrajes del ICIA, Marichu, Pilar, Nicolás, Sergio, Dani, Javier, Arturo, Ramón, Hilario, Juan Ramón, Manolo y Angeles por haberme hecho muy cálidos los fríos días de enero en Tenerife y por su importante colaboración en este trabajo.

A mi amigo Dani, siempre pendiente de mí cuando lo he necesitado y a Balta “mi informático de cabecera”.

A mis padres por haber inculcado en mí un valor tan importante como la libertad, lo cual me ha servido de gran ayuda a lo largo de mi vida y por mostrarme su máximo apoyo cuando he tenido que tomar decisiones que podían parecer difíciles y a Raquel, mi hermana, quien a pesar de no entender muy bien esto de la “ciencia” ha tenido la paciencia de aguantar todas mis “excentricidades” como ella las llama.

A Juan Miguel tengo que agradecerle su constante apoyo y comprensión, así como su empuje en los momentos de flaqueza. Gracias por tomarte este trabajo con el mismo entusiasmo que yo y por todas esas horas de conversación (incluso de madrugada) en las que has escuchado con infinita paciencia como te relataba cada uno de los experimentos. Gracias por estar ahí.

Al Cabildo de Gran Canaria por concederme la beca que me ha permitido dedicar mi tiempo a este trabajo.

Por último, a todas aquellas personas a las que sin quererlo haya olvidado mencionar y que de una u otra forma hayan colaborado en la elaboración de este trabajo.

**INDICE**

PREFACIO.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
<b>1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
1.1.- DEFINICIÓN DE CALOSTRO E IMPORTANCIA DEL ENCALOSTRADO.....	2
1.2.- SÍNTESIS DEL CALOSTRO.....	2
1.3.- CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN SANGRE.....	3
1.4.- FUNCIONES DEL CALOSTRO.....	5
1.4.1.- <i>Transferencia de inmunidad pasiva</i> .....	5
1.4.2.- <i>Viability</i> .....	6
1.4.3.- <i>Transferencia de inmunidad celular</i> .....	8
1.4.4.- <i>Elevación de la temperatura corporal</i> .....	8
1.4.5.- <i>Establecimiento del vínculo materno-filial</i> .....	10
1.4.6.- <i>Expulsión de los meconios</i> .....	11
1.5.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALOSTRO.....	11
1.6.- INMUNOGLOBULINAS.....	12
1.6.1.- <i>Clasificación de las inmunoglobulinas</i> .....	12
Inmunoglobulina G (IgG).....	12
Inmunoglobulina M (IgM).....	14
Inmunoglobulina A (IgA).....	14
Otras Inmunoglobulinas.....	15
1.6.2.- <i>Evolución de la concentración de IgG en el calostro</i> .....	15
1.6.3.- <i>Factores de variación de la concentración de IgG del calostro</i> .....	16
1.6.3.1.- <i>Genotipo</i> .....	16
1.6.3.2.- <i>Nutrición durante el periodo de secado</i> .....	17
1.6.3.4.- <i>Número de lactación</i> .....	19
1.6.3.5.- <i>Prolificidad</i> .....	20
1.6.3.6.- <i>Longitud de la gestación</i> .....	20
1.7.- <i>TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA A LOS CABRITOS</i> .....	21
1.7.1.- <i>Evolución de la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de rumiantes neonatos</i> .....	24
1.7.2.- <i>Comienzo de la producción endógena de inmunoglobulinas</i> .....	25
1.7.3.- <i>Efecto de los niveles de inmunoglobulinas en sangre sobre el crecimiento de los animales</i> .....	26
1.7.4.- <i>Eficacia aparente en la absorción de inmunoglobulinas</i> .....	27
1.7.5.- <i>Factores que afectan a la transferencia de inmunidad pasiva en los cabritos</i> .....	28
1.7.5.1.- <i>Edad a la primera toma de calostro</i> .....	28
1.7.5.2.- <i>Separación temprana de la madre</i> .....	29
1.7.5.3.- <i>Tamaño de la camada y peso al nacimiento</i> .....	30
1.7.5.4.- <i>Sexo</i> .....	32
1.7.5.6.- <i>Cantidad y calidad del calostro consumido</i> .....	33
1.8.- ALTERNATIVAS AL USO DE CALOSTRO NATURAL.....	35
1.9.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL CALOSTRO.....	39
<i>Congelación</i> .....	39
<i>Deshidratación</i> .....	40
<i>Acidificación</i> .....	40
1.10.- <i>ACIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)</i> .....	40
1.10.1.- <i>Actividades biológicas</i> .....	42
Efecto antcarcinogénico.....	43
Efecto antaterogénico.....	43
Efecto sobre la composición corporal.....	43
Efecto sobre el sistema inmune.....	44
1.11.- <i>INMUNIDAD CELULAR MEDIDA POR EL ÓXIDO NÍTRICO</i> .....	46
<b>2.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

<b>CAPÍTULO I.- USO DE CALOSTROS ALTERNATIVOS EN GANADO CAPRINO.....</b>	<b>72</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>73</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>75</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>77</b>
<b>2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>80</b>
2.1.- PREPARACIÓN DEL CALOSTRO.....	80
2.2.- ANIMALES.....	81
<i>Experimento 1</i> .....	82
<i>Experimento 3</i> .....	83
<i>Experimento 4</i> .....	84
2.3.- TOMA DE MUESTRAS .....	86
2.4.- CUANTIFICACIÓN DE IGG.....	87
2.5.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	93
<b>3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>94</b>
3.1.- EXPERIMENTO 1: USO DE CALOSTRO REFRIGERADO, CONGELADO Y COMERCIAL.....	94
3.2.- EXPERIMENTO 2: USO DE CALOSTRO CAPRINO CONGELADO Y LIOFILIZADO.....	99
3.3.- EXPERIMENTO 3: CANTIDAD DE IGG SUMINISTRADA CON EL CALOSTRO.....	101
3.4.- EXPERIMENTO 4: TIEMPO DE ENCALOSTRADO Y NÚMERO DE TOMAS.....	103
<b>4.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>5.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>108</b>
<b>CAPÍTULO II.- CONSERVACIÓN E HIGIENIZACIÓN DEL CALOSTRO CAPRINO.</b>	<b>112</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>113</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>114</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>115</b>
<b>2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>117</b>
2.1.- TOMA DE MUESTRAS Y METODOLOGÍA EMPELADA .....	117
<i>Experimento 1</i> .....	117
<i>Experimento 2</i> .....	117
<i>Experimento 3</i> .....	119
2.2.- CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G .....	119
2.3.- VALORACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS .....	120
2.4.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	121
<b>3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
3.1.- EXPERIMENTO 1: CONSERVACIÓN DEL CALOSTRO EN REFRIGERACIÓN.....	122
3.2.- EXPERIMENTO 2: CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DEL CALOSTRO .....	123
3.3.- EXPERIMENTO 3: PASTEURIZACIÓN DEL CALOSTRO .....	125
<b>4.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>128</b>
<b>5.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO III.- ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO E INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN GANADO CAPRINO.....</b>	<b>132</b>

RESUMEN .....	133
SUMMARY .....	135
1.- INTRODUCCIÓN .....	136
2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	139
2.1.- ANIMALES Y METODOLOGÍA .....	139
<i>Experimento 1</i> .....	139
<i>Experimento 2</i> .....	140
<i>Experimento 3</i> .....	142
2.2.- TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS REALIZADOS .....	143
<i>Experimento 1</i> .....	143
<i>Experimento 2</i> .....	144
<i>Experimento 3</i> .....	144
2.3.- CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IgG .....	145
2.4.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y L-CITRULINA .....	145
<i>Óxido Nítrico (nitritos/nitratos)</i> .....	145
2.5.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	150
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	151
EXPERIMENTO 1: CONCENTRACIÓN DE IgG EN SUERO SANGUÍNEO Y CALOSTRO .....	151
EXPERIMENTO 2: CONCENTRACIÓN DE IgG EN SUERO SANGUÍNEO DE CABRITOS .....	156
EXPERIMENTO 3: CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL SUERO SANGUÍNEO DE LOS CABRITOS.....	158
4.- CONCLUSIONES .....	161
5.- BIBLIOGRAFÍA.....	162
ANEXOS.....	166

## PREFACIO

## Prefacio

El ganado caprino de las Islas Canarias, que ha supuesto tradicionalmente un recurso económico importante (Capote, 1989), en la actualidad aporta el 30% de la producción del subsector ganadero.

Antes del año 1985 se consideraba oficialmente que toda la población caprina canaria estaba englobada dentro de una raza, si bien con posterioridad este término fue sustituido por el de Agrupación Caprina Canaria. Recientemente se ha modificado el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (Orden APA/2420/2003), suprimiéndose la última denominación y reconociéndose la existencia de tres razas caprinas insulares: Majorera (Figura 1), Palmera y Tinerfeña.



*Figura 1.- Cabras de raza Majorera*

La principal aptitud del ganado caprino canario es la lechera, mientras que la cárnica está relegada a un segundo término. No obstante, este tipo de producción puede ser mejorada tanto cuantitativa como cualitativamente.

Debido a la marcada condición lechera de la ganadería caprina canaria y a que en gran medida el destino final de este producto es su transformación en queso, la práctica de la lactancia artificial se hace necesaria

para poder aprovechar la mayor cantidad de leche posible, bien vendiéndola o, como ocurre en muchos casos, transformándola en las propias explotaciones, lo cual permite el incremento de su rentabilidad.

Por estas razones en la Unidad de Producción Animal de La Facultad de Veterinaria de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria se han estado investigando, desde hace más de una década, diferentes aspectos relacionados con las técnicas de la lactancia artificial (Argüello, 2000). Tanto el manejo del calostro como la transferencia de inmunidad pasiva en los cabritos han sido dos de las líneas que se han considerado como prioritarias y que han generado especial motivación.

### **Bibliografía**

- Argüello, A., 2000. Lactancia artificial de cabritos, encalostro, crecimiento, calidad de la canal y de la carne. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 356 pp.
- Capote, J., 1989. Agrupación Caprina Canaria. Libro de actas del I Simposium Internacional de la explotación caprina en zonas áridas. Fuerteventura, España, 17-33.
- Orden APA/2420/2003 de 28 de agosto por la que se modifica el catálogo oficial de razas de ganado de España, contenido en el anexo del Real Decreto 1682/1997 de 7 de noviembre, por el que se actualiza el catálogo oficial de razas de ganado de España.

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1.- Revisión bibliográfica

### 1.1.- Definición de calostro e importancia del encalostrado

El calostro es la primera secreción que se forma en la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos unas semanas antes del parto (Labadía y Tovar, 1996). En los rumiantes la ingesta de calostro es especialmente importante debido a que la placenta tiene unas características histológicas que la hacen impermeable al paso de las inmunoglobulinas (Ig). Por ello, los neonatos son muy sensibles a las infecciones y necesitan adquirir su protección inmunológica de forma pasiva a través del calostro (Brambell, 1970; Leveux, 1984).

### 1.2.- Síntesis del calostro

Alrededor de las diez últimas semanas de gestación, la ubre empieza a manifestar los signos externos propios de la producción de leche. Así en este momento comienza la formación de un líquido, con unas características similares a las de la leche, que contiene una elevada concentración de inmunoglobulinas (Fleet *et al.*, 1975). Dentro de los diferentes tipos de inmunoglobulinas, la que aparece en una mayor concentración (80-90%), en el suero sanguíneo y calostro bovino, es la inmunoglobulina G (IgG) (Klaus *et al.*, 1969). Asimismo su presencia es mayoritaria en el suero sanguíneo (88,64%) y calostro (91,65%) del ganado ovino (Smith *et al.*, 1975).

La concentración de IgG del calostro caprino es superior a la del suero sanguíneo y la subclase IgG<sub>1</sub> representa un 95-98% del total de la IgG (Micusan y Borduas, 1977). Durante la formación del calostro la incorporación de la citada IgG<sub>1</sub> al mismo parece estar regulada por los niveles de estrógenos y progesterona existentes en esta fase de la gestación y

se realiza mediante un transporte selectivo desde la sangre (Butler, 1969; Butler et al., 1971; Kiddy et al., 1971; Smith y Larson, 1975; Micusan y Borduas, 1977), provocando que los niveles de inmunoglobulinas en la misma disminuyan. En vacas lecheras, Lacetera et al. (1996) observaron la mencionada reducción de inmunoglobulinas en suero sanguíneo, con una disminución de la concentración entre 3,2 y 2,6 mg/ml en las tres últimas semanas de gestación. Por el contrario Sawyer et al. (1977) no encontraron, en ganado ovino, ninguna correlación entre la concentración de IgG e IgM en sangre y calostro, si bien trabajando con esta misma especie Ciuperescu (1977) describió un descenso brusco en la concentración de IgG<sub>1</sub> e IgM del suero sanguíneo en las dos últimas semanas de gestación.

Este mecanismo de transferencia selectiva de la IgG<sub>1</sub>, se ha utilizado en ganado caprino para obtener calostros, con gran cantidad de inmunidad específica, frente a determinados patógenos, procedentes de madres previamente vacunadas (Vihan, 1993).

Respecto al transporte de IgG, durante la formación del calostro, Mayer et al. (2002b) han descrito la presencia de un receptor en la glándula mamaria de las ovejas que puede jugar un papel importante cuando la citada inmunoglobulina es transportada hacia la ubre durante la síntesis del calostro. Este mismo receptor ha sido encontrado en las células epiteliales del duodeno de los corderos. Asimismo se ha observado que estos receptores cambian su distribución en la glándula mamaria antes y después del parto, hecho que lleva a pensar su relación con el transporte de IgG durante la formación del calostro (Mayer et al., 2002a).

### 1.3.- Concentración de inmunoglobulinas en sangre

Micusan y Borduas (1977) observaron que la concentración media de IgG en el suero sanguíneo de cabras adultas no gestantes era de  $19,97 \pm 1,55$

mg/ml (representando la IgG<sub>1</sub> el 55% de las Ig), mientras la concentración de esta inmunoglobulina en el calostro era de  $53,27 \pm 5,30$  mg/ml. Estos mismos autores encontraron que la evolución de la concentración de IgG en sangre de cabras preñadas fue ascendente desde las ocho a las cinco semanas antes del parto, produciéndose desde este momento hasta el parto un descenso en sus niveles. Tras el parto la concentración de IgG en el suero sanguíneo de estos animales experimentó de nuevo un ascenso. Ha et al. (1986) encontraron un tenue incremento en la concentración sérica de IgG de cabras nativas coreanas, pasando de 7,36 y 6,58 mg/ml en el momento del parto a 11,58 y 12,86 mg/ml (primíparas y múltiparas respectivamente) a las 120 horas postparto.

En este sentido Martín (1998), trabajando con cabras de raza Majorera, encontró que la concentración de IgG en el suero sanguíneo fue de  $11,66 \pm 3,06$  mg/ml en el momento del parto y de  $14,01 \pm 4,05$  mg/ml cinco días después del mismo. Similares resultados han sido descritos en animales de la misma raza por Castro (2000) quien encontró un ascenso del 44,87% en la concentración de IgG del suero sanguíneo desde el parto hasta las 132 horas postparto.

Este ascenso en los niveles de la IgG sérica tras el parto, también descrito por Rabbani et al. (1990), puede ser explicado por el cese en el transporte masivo de IgG desde la sangre al calostro o bien por la desaparición de la degradación provocada por el estrés del parto, e incluso por la acción de ambos fenómeno simultáneamente (Meiron et al., 1977; Logan et al., 1981a).

En ovejas Finnish x Dorset Horn, Ciupercescu (1977) halló una evolución similar, si bien la concentración de inmunoglobulinas sanguíneas mostraba un incremento en su nivel hasta dos meses antes del parto, descendiendo posteriormente de forma ligera hasta los 15 últimos días de

gestación y de forma drástica desde este momento hasta el parto. Si bien esta evolución fue experimentada por la IgG<sub>1</sub>, la concentración de IgG<sub>2</sub> no mostró cambios significativos a lo largo de este periodo.

En este sentido, Kiddy et al. (1971) observaron en ganado bovino que existía una correlación negativa ( $r=-0,43$ ) entre las concentraciones de IgG sanguínea y calostrala, de forma que al final de la gestación la concentración sérica de inmunoglobulinas descendía y la del calostro aumentaba, proceso que se invertía tras el parto. En ganado caprino esta correlación ( $r=-0,27$ ) ha sido descrita por Ha et al. (1986).

#### 1.4.- Funciones del calostro

Una de las funciones del calostro más citada en la bibliografía es la transmisión de inmunidad pasiva, pero además de ésta el calostro cumple otras funciones esenciales como la elevación de la temperatura corporal y la eliminación del meconio, entre otras.

##### 1.4.1.- Transferencia de inmunidad pasiva

El calostro es una importante fuente de inmunoglobulinas y en el caso de los rumiantes, Tizard (1992) estimó que las vehiculadas en el calostro que consumían los terneros, durante las primeras 24 horas de vida, suponían la mayor fuente de las encontradas en el suero sanguíneo de los mismos durante las primeras semanas tras el parto.

Evaluando la concentración de IgG en el suero sanguíneo de los cabritos en el momento del nacimiento, mediante inmunodifusión radial, se encontró que los cabritos son agammaglobulinémicos (Constant et al., 1994; Dos Santos et al., 1994; Argüello, 2000). Sin embargo, algunos autores, empleando el test de turbidez del sulfato de Zinc, han señalado pequeñas

concentraciones de inmunoglobulinas en suero de cabritos antes de la ingestión de calostro (Guerrault, 1990; Sherman *et al.*, 1990). Los cabritos dependen de la absorción de las inmunoglobulinas del calostro para su protección contra las enfermedades infecciosas durante las primeras semanas de vida (Nandakumar y Rajagopalaraja, 1983; Vihan, 1988). A pesar de ello, Rowan *et al.* (1994) afirmaron que la crianza con éxito de cabritos sin consumo de calostro (alimentándolos con leche de vaca) es posible siempre y cuando se les provea de tratamientos antiinfecciosos adecuados.

Las inmunoglobulinas presentes en el calostro, aportan al neonato una fuente de anticuerpos que éste es aún incapaz de sintetizar. Asimismo, estos anticuerpos calostrales, además de la acción sistémica, desempeñan una acción a nivel local (IgM e IgA) tal y como observaron en terneros Babiuk *et al.* (1990). La mencionada actividad ha sido descrita como profiláctica y no como curativa, al evaluar su efecto frente a diarreas producidas por rotavirus en terneros (Osame *et al.*, 1991).

#### 1.4.2.- Viabilidad

Tal y como se ha citado con anterioridad, una de las principales funciones que cumple el calostro es el aporte de inmunoglobulinas con el objetivo de incrementar las posibilidades de supervivencia de la cría (Tizard, 1992). La mayoría de los mamíferos, exceptuando los humanos, conejos y conejillos de indias, adquieren inmunidad pasiva en las primeras etapas de su vida sólo a través de la ingesta de calostro (Lampert, 1975; Smith y Larson, 1975; Hunter *et al.*, 1977; Muller y Ellinger, 1981; Stott *et al.*, 1981; Stott y Fellah, 1983). Así, son muchos los autores (Halliday, 1971; McGuire *et al.*, 1976; Sawyer *et al.*, 1977; Gay, 1983; Nandakumar y Rajagopalaraja, 1983; Morand-Fehr, 1984; Nocek *et al.*, 1984; Morand-Fehr, 1989) que han demostrado que la supervivencia de cabritos, corderos

o terneros depende de la adecuada adquisición de inmunidad a través del calostro.

De este modo, en ganado caprino, Dos Santos *et al.* (1994) trabajando con cabritos mestizos criados en Brasil, encontraron que los niveles de IgG en el suero sanguíneo eran inferiores en los animales que murieron durante la experiencia (25,6 y 33,11 mg/ml de IgG, muertos y vivos respectivamente). Asimismo O'Brien y Sherman (1993) observaron, en cabritos de raza Alpina Francesa, diferencias significativas en los niveles de inmunoglobulinas en sangre entre los animales que morían y los que sobrevivían (medidos con test de turbidez en el primer mes de vida) siendo las concentraciones 75,07 mg/ml en los muertos y 143,91 mg/ml en los vivos.

Por el contrario, Al-Jawad y Lees (1985), trabajando con corderos, han afirmado que el nivel de inmunoglobulinas en sangre (valoradas mediante el test de turbidez del sulfato de zinc) no fue un factor tan determinante en la viabilidad de los mismos ya que los animales sobrevivieron, al menos durante ocho semanas, habiéndose obtenido concentraciones muy bajas de Inmunoglobulinas (5,6 mg/ml aproximadamente) en sangre en las primeras 36 horas de vida.

Algunos autores coinciden en la afirmación de que la falta de consumo de una adecuada cantidad de calostro con una concentración suficiente de inmunoglobulinas es la causa principal de la aparición de ciertas patologías, en corderos y cabritos, tales como el síndrome de boca mojada (García de Jalón *et al.*, 1990) o la criptosporidiosis (Molina *et al.*, 1994; Goyena *et al.*, 1997).

#### 1.4.3.- Transferencia de inmunidad celular

La bibliografía existente respecto al estudio de la población celular en el calostro es muy escasa. En este sentido Gonzalo *et al.* (1988) realizaron un estudio detallado de los componentes celulares del calostro ovino en el que encontraron que éste presentaba una mayor cantidad de linfocitos y macrófagos que la leche. Los mismos autores observaron que la cantidad de linfocitos del calostro casi doblaba su presencia en la leche, hecho que para ellos podría estar asociado a un mecanismo de transferencia de inmunidad celular al neonato, lo que ha sido también apuntado por otros autores (Parmely y Beer, 1977; Lee y Outteridge, 1981; Outteridge y Lee, 1981). Por otra parte los macrófagos del calostro, debido a su elevada capacidad fagocitaria, realizarían fundamentalmente una función de protección del intestino de los corderos recién nacidos frente a las infecciones bacterianas (Lee y Outteridge, 1981).

#### 1.4.4.- Elevación de la temperatura corporal

Además de las funciones anteriormente descritas, el calostro también desempeña un papel importante como fuente de energía, lo que favorece el incremento de la temperatura corporal de los terneros (Vermorel *et al.*, 1983). Estos autores encontraron que la producción de calor en terneros mantenidos a 10°C se incrementaba en un 18 y 9% en la primera y segunda hora tras el consumo de calostro respectivamente. Asimismo, Godfrey *et al.* (1991) observaron que el consumo temprano de calostro por parte de los terneros supone un aporte de energía, glucosa y moléculas precursoras de ésta, resultando todos ellos elementos fundamentales para los terneros nacidos en condiciones ambientales desfavorables.

Eales *et al.* (1982), trabajando con corderos, encontraron que una de las principales causas de mortalidad, en las primeras horas de vida de los

mismos, fue la pérdida de temperatura corporal, por lo que recomendaron como medida profiláctica para la hipotermia un adecuado encalostrado de los animales en esta etapa crítica. Hamadeh *et al.* (2000) tras realizar estudios con corderos, afirmaron que la ingesta temprana de calostro es primordial para la inducción de la termogénesis en corderos neonatos.

En el caso de los cabritos, éstos sufren una evaporación de líquidos durante sus primeras horas de vida produciéndose una disminución en la temperatura rectal de los animales (Dos Santos *et al.*, 1994). Posteriormente Morand-Fehr (1989) y Dos Santos *et al.* (1994) encontraron que un aporte temprano de calostro a los cabritos favorece la elevación de su temperatura rectal durante las primeras horas de vida.

Muller y McCutcheon (1991), en una experiencia en la que compararon la resistencia al frío de cabritos y corderos, observaron que la ingesta temprana de calostro era esencial (fundamentalmente en cabritos) como aporte energético ya que, como ellos describen, el bajo peso al nacimiento de los cabritos, la inhabilidad de estos animales para mantener la temperatura corporal elevada (tras un estrés por frío) y su menor capacidad para la producción de calor, sugiere que los cabritos tienen una mayor dificultad para resistir condiciones ambientales desfavorables (Figura 1).



*Figura 1.- Cabritos con foco de calor*

A todo lo descrito anteriormente hay que sumarle que Sanz *et al.* (1995) apuntaron que los cabritos tienen unas necesidades energéticas muy superiores a las de los corderos para el mantenimiento de la vida.

#### 1.4.5.- Establecimiento del vínculo materno-filial

El establecimiento del vínculo materno-filial se instaura después del parto (Figura 2) en un periodo muy específico y breve (Ramírez *et al.*, 1996). Existen varios trabajos al respecto que afirman que en varias especies de ungulados los primeros diez minutos tras el nacimiento son básicos para el establecimiento de esta relación (Collias, 1956; Klopfer *et al.*, 1964).



Figura 2.- Vínculo materno-filial tras el parto

Para algunos autores el consumo temprano de calostro hace que los corderos presenten una mayor actividad y estén más vigorosos, viéndose de esta forma favorecido el reconocimiento materno (Nowak *et al.*, 1990). En cambio, García y Goddard (1998) no mejoraron el establecimiento de la relación materno-filial mediante el aporte de una dosis extra de calostro comercial en el momento del nacimiento del cordero. Según sus consideraciones la existencia de un reflejo de saciedad por repleción estomacal reduce las posibilidades de que se produzcan mejoras en la citada relación entre la madre y la cría.

#### 1.4.6.- Expulsión de los meconios

La importancia de la ingesta de calostro para proporcionar una adecuada inmunidad pasiva es conocida, pero no se puede olvidar el papel que desempeña el calostro como estimulador del peristaltismo de la mucosa intestinal en el neonato. Esta acción es de vital importancia para la expulsión de las heces, que durante los últimos meses de gestación se han ido acantonando en el intestino de los cabritos y corderos, evitando así que se favorezca la colonización bacteriana de la mucosa intestinal (García de Jalón *et al.*, 1990; Barza *et al.*, 1993).

#### 1.5.- Composición química del calostro

La composición química del calostro, en relación a la de la leche, se caracteriza por presentar un mayor contenido de proteína, grasa, vitaminas y una menor concentración de lactosa. La composición del calostro cambia gradualmente durante los tres primeros días después del parto para transformarse en leche (Labadía y Tovar, 1996).

Desde un punto de vista cualitativo la fracción más importante de las proteínas presentes en calostro corresponde a las inmunoglobulinas por su papel en la transmisión de inmunidad al recién nacido. En este sentido Gawad *et al.* (1986) valoraron que de las proteínas presentes en el suero del calostro un 58% eran inmunoglobulinas.

Por otra parte, dentro de las proteínas presentes en el calostro, destacan algunas enzimas, hormonas y factores de crecimiento que pudieran jugar un papel muy importante a la hora de favorecer o dificultar la absorción de las macromoléculas por parte del intestino (Bainter, 1986; Besser y Osborn, 1993). Brock *et al.* (1977), trabajando con terneros, describieron la presencia de un inhibidor de la tripsina que acelera la

absorción de IgG a la par que protege su degradación. Este inhibidor ha sido hallado por Soares-Filho et al. (2002) en el calostro de vacas en una concentración de 0,957 mg/ml.

## 1.6.- Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son las glucoproteínas de mayor peso molecular y de cuya síntesis se encargan las células del sistema retículo endotelial. Son las principales responsables de la denominada inmunidad humoral, que es aquella que no está mediada por células.

### 1.6.1.- Clasificación de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos, tales como su movilidad electroforética, su peso molecular y su estructura antigénica. No obstante, la clasificación más extendida actualmente está basada en la presencia de diferentes tipos de epítomos (antígenos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas).

De esta forma se diferencian distintos isotipos (Alberts et al., 1986) entre los que se encuentran las inmunoglobulinas G, M y A (IgG, IgM e IgA respectivamente) y otras inmunoglobulinas de menor importancia (IgD, IgE). Todos los mamíferos tienen IgG, IgM e IgA. Las características de los distintos isotipos son iguales en todas las especies, pero el número y tipo de los subisotipos varía según la especie animal a la que se haga referencia.

### Inmunoglobulina G (IgG)

Se trata de una inmunoglobulina con un peso molecular de 160 kDa que presenta en su superficie epítomos tipo Gamma. La IgG contiene cuatro cadenas polipeptídicas enlazadas, dos de ellas son idénticas y cada una pesa

entre 50 y 60 kDa, denominándoseles cadenas pesadas. Las otras dos cadenas también son idénticas, pero de menor peso molecular y se denominan cadenas ligeras.

La IgG es el isotipo que se encuentra en mayor concentración en sangre, desempeñando por ende, el papel más importante en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos (Tizard, 1992). Debido a su tamaño relativamente pequeño (160 kDa), la IgG escapa de los vasos sanguíneos con mayor facilidad que las demás inmunoglobulinas, participando por ello con rapidez en la defensa de los espacios tisulares y de las superficies corporales.

En el caso de los rumiantes la IgG es la que aparece en una mayor cantidad en sangre y calostro, pudiendo llegar a representar entre el 80 y 90% del total de las inmunoglobulinas (Klaus *et al.*, 1969; Neubauer y Schöne, 1979; Lacetera *et al.*, 1996). La IgG se puede subdividir en dos subisotipos (IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>) diferenciables mediante el uso de métodos electroforéticos (Meckenzie, 1970; Butler *et al.*, 1971; Kehoe, 1971).

En ganado bovino la IgG<sub>1</sub> supone el 50% de las inmunoglobulinas del suero sanguíneo, siendo la más predominante en leche (Tizard, 1992). En el caso del ganado ovino (Finnish x Dorset Horn) la IgG<sub>2</sub> representa escasamente el 1% de las inmunoglobulinas presentes en la sangre en las primeras etapas de la vida del cordero (Ciupercescu, 1977).

La IgG<sub>1</sub> y la IgG<sub>2</sub> presentes en el calostro son de origen sanguíneo. Lascelles *et al.* (1980) observaron un mecanismo de transporte selectivo para la IgG<sub>1</sub> y uno de difusión pasiva para la IgG<sub>2</sub> en varias especies (ovejas, vacas, etc). Estos mismos autores encontraron que la concentración de IgG<sub>1</sub> en el calostro de vaca y oveja era de 48,24 y 94,10 mg/ml, respectivamente, mientras la concentración de IgG<sub>2</sub> en el calostro de estas mismas especies era de 3,98 y 2,50 mg/ml.

En el suero sanguíneo, calostro y leche de cabra fueron encontradas unas concentraciones de IgG de 22,0, 58,0 y 0,25 mg/ml respectivamente (Pahud y Mach, 1970).

Asimismo en ganado ovino Smith et al. (1975) observaron que la presencia de IgG es mayoritaria en suero sanguíneo (88,64%), leche (84,29%) y calostro (91,65%).

### Inmunoglobulina M (IgM)

La IgM es una inmunoglobulina de gran tamaño, posee un peso molecular de 900 kDa y tiene epítomos Mu. En el suero de la mayoría de los mamíferos ocupa el segundo lugar en concentración después de la IgG. Las moléculas de IgM encontradas en el calostro se producen localmente (Lascelles et al., 1980).

En ganado ovino, la presencia de IgM es minoritaria, de forma que representa únicamente el 9,5% en el suero sanguíneo (Smith et al., 1975).

En ganado caprino, Pahud y Mach (1970) encontraron que en leche, calostro y suero sanguíneo las concentraciones de IgM eran de 0,03, 3,8 y 0,16 mg/ml respectivamente.

### Inmunoglobulina A (IgA)

La IgA es también denominada inmunoglobulina de secreción debido a que se encuentra casi exclusivamente en secreciones del organismo. Tiene un peso molecular de 360 kDa y epítomos tipo Alfa. Al igual que ocurría con la IgM, esta inmunoglobulina también es producida localmente.

Trabajando con calostro, suero sanguíneo y leche de cabra, Pahud y Mach (1970) estimaron que la concentración de IgA en cada uno de estos fluidos era la siguiente: 1,70 mg/ml en calostro, 0,06 mg/ml en leche y 0,32 mg/ml en suero sanguíneo.

### Otras Inmunoglobulinas

Se trata de inmunoglobulinas de menor importancia debido a las pequeñas cantidades sintetizadas. En mamíferos se describen la IgE y la IgD que actúan fundamentalmente como anticuerpos ligados a membranas (Tizard, 1992).

#### 1.6.2.- Evolución de la concentración de IgG en el calostro

La evolución seguida por la IgG del calostro en ganado bovino ha sido estudiada por Oyeniyi y Hunter (1978) quienes comprobaron que la concentración de IgG presente en el calostro era decreciente según transcurre el tiempo postparto. Así la IgG encontrada en el calostro de las vacas por estos autores a las 12 y 24 horas del nacimiento representaba solamente el 78,3 y el 47,5%, respectivamente, de la IgG observada en el momento del parto.

En ganado caprino, explotado en Brasil, los niveles de IgG (analizados mediante inmunodifusión radial) disminuyeron rápidamente (Dos Santos et al., 1994) entre la primera y décima hora postparto ( $125,98 \pm 11,39$  y  $34,07 \pm 4,26$  mg/ml respectivamente), destacando además la gran variabilidad existente en los valores encontrados para la concentración de IgG en la primera hora tras el parto, que oscilaban entre 69,3 y 217,8 mg/ml.

En razas especializadas en la producción de leche (Saanen y Camosciata), Ubertalle et al. (1987) observaron unas concentraciones de

IgG algo menores una hora después del parto (51,7 mg/ml), que descendían hasta niveles de 3,6 mg/ml a las 24 horas postparto. En este sentido Argüello (2000), trabajando con cabras de raza Majorera, también encontró que los niveles IgG en el calostro seguían una evolución descendente según transcurría el tiempo postparto. Así, este mismo autor cita concentraciones de IgG en el calostro de 45 mg/ml en el momento del parto mientras tres días después este valor es cercano a cero.

Chen *et al.* (1998) trabajando con calostro caprino de raza Nubia, analizado con métodos electroforéticos, observaron que la concentración de gammaglobulinas en el calostro evolucionaba desde  $72,2 \pm 11,0$  mg/ml en el momento del parto hasta  $17,9 \pm 3,6$  mg/ml 36 horas después del mismo.

En otros trabajos O'Doherty y Crosby (1996), utilizando técnicas de inmunodifusión radial (Fahey y McKelvey, 1965; Mancini *et al.*, 1965) encontraron grandes coeficientes de variación en la concentración de IgG (95,48%) en calostro bovino. Estas amplias variaciones también han sido descritas por otros autores (Kruse, 1970; Logan, 1977; Petrie, 1984). En ganado caprino (raza Majorera) Argüello (2000), empleando técnicas de cuantificación de IgG similares, observó coeficientes de variación del 77% en los cinco días postparto. Variabilidades análogas han sido descritas recientemente por Levieux *et al.* (2002) quienes encontraron en calostro caprino concentraciones de IgG que oscilaban desde 19,9 a 94,5 mg/ml.

### 1.6.3.- Factores de variación de la concentración de IgG del calostro

#### 1.6.3.1.- Genotipo

En ganado bovino hay muchos trabajos que han descrito diferencias en la concentración de IgG entre diferentes razas (Tennant *et al.*, 1969; Newstead, 1976; Halliday, 1978; Losonczy *et al.*, 1979; Muller y Ellinger,

1979). Cabe destacar el estudio realizado por Shearer *et al.* (1992) quienes trabajando con 2045 vacas encontraron que el calostro procedente de las de raza Holstein poseía una concentración de inmunoglobulinas dos veces superior al de otras razas estudiadas.

En este sentido Argüello (2000) afirmó que, si bien las razas caprinas seleccionadas para la aptitud lechera (Figura 3) presentan concentraciones de IgG calostrales menores, esto no implicaba que la producción total de la citada inmunoglobulina sea inferior, ya que la producción total de calostro es generalmente mayor.



*Figura 3.- Aptitud lechera de la raza Majorera*

### **1.6.3.2.- Nutrición durante el periodo de secado**

Shearer *et al.* (1992), trabajando con ganado vacuno, observaron que aquellos animales que durante el secado incrementaban su condición corporal, poseían una mayor concentración de inmunoglobulinas en su calostro que los que mantenían o veían reducida la citada condición corporal durante dicho periodo. En este sentido Quigley y Dewdry (1998) afirmaron que se debe incrementar la calidad de la ración de las vacas lecheras entre las

dos y cuatro últimas semanas de gestación, para aumentar la concentración de inmunoglobulinas.

En cuanto a la calidad de la dieta antes del parto, Hough *et al.* (1990) estudiaron la influencia que tenía la restricción en el aporte de proteína en la misma sobre la cantidad de inmunoglobulinas presentes en el calostro. Así tras alimentar dos lotes de vacas Angus con el 100 y 57% de las necesidades proteicas, comprobaron que la calidad inmunológica del calostro producido no se alteraba. Sin embargo, la cantidad de inmunoglobulinas absorbidas por los terneros era de un 21,8% menos en los que consumían calostro de vacas alimentadas con la dieta de restricción en proteínas. Estos mismos autores apuntaron que debía existir algún componente en el calostro que, con la restricción proteica, afectaba a la absorción intestinal de inmunoglobulinas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto O'Doherty y Crosby (1996) y O'Doherty *et al.* (1997) trabajando con ovejas (cruces de Suffolk y Texel) encontraron que los animales alimentados con un suplemento proteico antes del parto, poseían una mayor concentración de IgG en su calostro, si bien no hicieron pruebas de la asimilación de esta IgG. De forma análoga Pattinson *et al.* (1991) observaron que en ovejas Cambridge existía una ligera tendencia ( $P=0,064$ ) a incrementar la cantidad de proteína en el calostro si los animales recibían una dieta más rica en proteína en el periodo de secado. En este mismo sentido Mazzone *et al.* (1999) encontraron que el calostro de ovejas Rambouillet, cuya dieta estaba suplementada con proteína cruda en un 115% de sus necesidades básicas, presentaba una mayor concentración de IgG que el calostro de los animales que recibían un 85% de la citada proteína.

#### 1.6.3.4.- Número de lactación

El aumento del número de lactación en ganado bovino producía un incremento en la concentración de IgG presente en el calostro (Kruse, 1970; Oyeniyi y Hunter, 1978). No obstante esta diferencia sólo se puso de manifiesto entre las tres primeras lactaciones y las posteriores. De forma análoga Shearer et al. (1992) encontraron que las vacas primíparas poseían una concentración menor de inmunoglobulinas en su calostro que las de segunda o posteriores lactaciones.

Vijil et al. (1986) estudiando el calostro ovino, indicaron que el número de lactación no tenía influencia sobre ninguno de sus constituyentes, si bien denotaron una cierta tendencia, sin diferencias significativas, de tal forma que las ovejas de mayor edad presentaban valores más elevados de IgG.

Sin embargo, en ganado caprino explotado en Brasil Dos Santos et al. (1994), valorando el efecto del número de lactación sobre la concentración de IgG del calostro, no observaron diferencias estadísticas en la citada concentración entre cabras de segunda y posteriores lactaciones. Ha et al. (1986) afirmaron que la concentración de IgG del calostro de cabras nativas coreanas primíparas, era inferior a la de cabras multiparas (115,09±17,24 y 153,28±39,89 mg/ml de IgG en el momento del parto, primíparas y multiparas respectivamente). No obstante, estas diferencias sólo se mantenían en las primeras 24 horas tras el nacimiento.

En este sentido Argüello (2000) estudiando el calostro de cabras de raza Majorera, de primera lactación y de segunda y posteriores lactaciones, no encontró diferencias significativas en la concentración de IgG (39,88±23,18 y 34,24±19,51 mg/ml, primera y posteriores lactaciones respectivamente) desde el momento del parto hasta las 132 horas postparto.

#### 1.6.3.5.- Prolificidad

Halliday (1978) apuntó que en ovejas con gestación múltiple, la mayor parte de los nutrientes aportados a la madre son dirigidos a la formación de los embriones, quedando así una menor cantidad de proteína disponible para la síntesis de las inmunoglobulinas destinadas al calostro. Sin embargo, Csapo *et al.* (1989) trabajando con cabras y ovejas, encontraron que el calostro procedente de hembras cuya descendencia había sido múltiple tenía un contenido mayor en IgG que el de hembras con descendencia simple.

Argüello (2000) también evaluó el efecto de la prolificidad sobre la concentración de IgG del calostro de cabras de raza Majorera. Este autor no encontró diferencias significativas, pero sí una cierta tendencia a concentraciones superiores en el calostro procedente de animales de parto simple, coincidiendo con Halliday (1978) al sugerir que los animales con una sola cría tienen unas menores necesidades nutritivas lo cual puede favorecer la incorporación de IgG al calostro.

#### 1.6.3.6.- Longitud de la gestación

La longitud de la gestación ha sido estudiada por Castro (2000) en ganado caprino, comprobando la existencia de una correlación positiva ( $r=0,156$ ) entre la misma y la concentración de IgG presente en el calostro. De esta manera los animales con gestaciones superiores a 146 días presentaron concentraciones superiores de IgG en su calostro que aquellos cuyo parto se presentó antes.

No obstante, Hoerlein y Jones (1977) trabajando con ganado bovino habían observado que la concentración de IgG del calostro de animales, cuyo parto era inducido mediante inyección de corticosteroides (el parto se

producía entre 3 y 22 días antes de la fecha prevista) no era diferente de la concentración de IgG de las vacas que parían a término.

### 1.7.- Transferencia de inmunidad pasiva a los cabritos

En la especie humana, en los primates y los roedores las inmunoglobulinas empiezan a transferirse desde la circulación materna a la fetal a partir del último tercio de la gestación (Gitlin et al., 1964). Este transporte de inmunoglobulinas es selectivo para las IgG, de forma que los recién nacidos de estas especies, poseen altas cantidades circulantes de IgG en sangre (Bernier et al., 1967; Virella et al., 1972).

Al contrario de lo descrito anteriormente, las características de la placenta de los ungulados impiden el paso de inmunoglobulinas al feto (Brambell, 1970), por lo que el consumo de calostro, por parte de la progenie de estas especies, es esencial para la adquisición de una protección inmunológica en las primeras semanas de vida. Estos anticuerpos calostrales no sólo desempeñan una acción sistémica (Babiuk et al., 1990) sino que además actúan a nivel local evitando la aparición de diarreas víricas durante la primera semana de vida del ternero.

Desde hace tiempo es sabido que el transporte de inmunoglobulinas, en las primeras etapas de la vida de los ungulados, no es un proceso selectivo (Balfour y Comline, 1959; Pierce, 1961; Brandon y Lascelles, 1971), si bien existen algunos factores presentes en el calostro que ayudan o colaboran para que su absorción sea máxima. Entre los primeros que se descubrieron destaca el inhibidor de la tripsina (Laskowski y Laskowski, 1951) que impide en las primeras 24-36 horas la acción de dicha enzima gástrica sobre las inmunoglobulinas. También hay que citar el papel de los “*Insulin Growth Factors*” (IGF) en el recién nacido (Baumrucker y Blum, 1993). En este mismo sentido Mayer et al. (2002b) observaron, en la glándula mamaria de

las ovejas, un receptor que podría participar en el transporte de IgG hacia la ubre durante la síntesis del calostro.

La evolución de la concentración sérica de inmunoglobulinas tras el nacimiento ha sido bien estudiada en terneros. En este sentido Bush y Staley (1980) observaron que, fruto de la ingestión de calostro durante las primeras horas de vida, la concentración de inmunoglobulinas en sangre era mucho mayor que la encontrada en los animales al nacimiento. En terneros Lacetera *et al.* (1996) encontraron concentraciones de inmunoglobulinas en sangre menores a los 28 días de vida que a los dos días postparto, lo cual se explica por la degradación fisiológica de las inmunoglobulinas en la sangre y porque los animales son aún incapaces de sintetizar sus propias inmunoglobulinas (Logan *et al.*, 1972). A partir del día 28 y hasta los 56 días de vida de los terneros, Lacetera *et al.* (1996) apreciaron un ligero incremento en la concentración de inmunoglobulinas en sangre debido tal vez a la producción endógena de las mismas.

Los cabritos son agammaglobulinémicos en el momento del nacimiento según Constant *et al.* (1994) y Argüello (2000), aunque para Guerrault (1990), Rabbani *et al.* (1990) o para Sherman *et al.* (1990) existan mínimas concentraciones de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo al nacimiento. En este sentido Logan *et al.* (1972) encontraron niveles de IgG e IgM en sangre de terneros recién nacidos que no habían consumido calostro. Este hecho contrasta con lo descrito posteriormente por los mismos autores, al detectar por primera vez inmunoglobulinas en sangre a las 4 horas de vida, considerando a los terneros agammaglobulinémicos hasta este momento (Logan *et al.*, 1978b).

Logan y Pearson (1978) han estudiado en terneros la localización de la zona de máxima absorción de inmunoglobulinas. Estos autores demostraron, mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia, que la

misma se encuentra en la región pilosa del intestino delgado. La duración de la permeabilidad intestinal a las macromoléculas en los ungulados es breve, estimándose entre 24 y 48 horas (McCarthy y McDougall, 1953; Pierce, 1955; Lecce y Morgan, 1962; Jeffcott, 1971). Algunas experiencias realizadas con ganado porcino, han conseguido, mediante el ayuno o la ingestión de agua en las primeras horas tras el parto, alargar el periodo de absorción de las inmunoglobulinas hasta las 86-106 horas de vida (Lecce y Morgan, 1962; Payne y Marsh, 1962). Al contrario de lo que sucede en ungulados, el periodo de absorción de inmunoglobulinas en ratas o ratones, se puede alargar hasta los 14 ó 18 días de vida (Halliday, 1958; Bamford, 1966).

El mecanismo de absorción de macromoléculas en el recién nacido se cree que se realiza mediante pinocitosis en el lumen intestinal y pinocitosis inversa en la parte basal de la célula. Así, las macromoléculas son vertidas a los conductos linfáticos aferentes hasta alcanzar el conducto torácico (Sibalin y Björkman, 1966; Krahenbuhl y Campiche, 1969; Yoffey y Courtice, 1970). Por otra parte, parece que el mecanismo de cierre intestinal está mediado por la acción de la glándula suprarrenal que es activada en el momento del nacimiento (Clark, 1959; Halliday, 1959). Con posterioridad, Nightengale y Stott (1981) encontraron una correlación negativa parcial entre el nivel de cortisol en los terneros a las 24 horas de vida y la concentración de IgG, completando lo publicado por Stott (1980) quien, en una revisión sobre el efecto del estrés en la absorción de inmunoglobulinas de los terneros neonatos, explicó que la relación entre los glucocorticoides y el cierre intestinal no estaba clara. Sin embargo, en un trabajo más reciente realizado en cabritos, Chen *et al.* (1999b) observaron que el nivel del pico de gammaglobulinas, alcanzado 18 horas después de la primera toma de calostro, fue superior en los animales que habían nacido con mayor concentración de cortisol en su suero sanguíneo, por lo que concluyeron que

es deseable la presencia de elevados niveles de cortisol al nacimiento de los cabritos, si bien el mecanismo por el cual ocurre todo esto está en discusión.

Algunas de las teorías más actuales sobre el final del periodo de absorción de macromoléculas en el intestino del recién nacido, apuntan hacia la maduración de las células de la mucosa intestinal y el desarrollo del aparato digestivo intracelular, tal como indicaron Jochims *et al.* (1994). Así, una de las mejores descripciones del proceso de cierre intestinal ha sido la citada por estos autores quienes afirmaron que el mismo puede ser interpretado como un evento multifactorial que comprende el reemplazo de los enterocitos fetales (capaces de absorber macromoléculas) por una población madura, un cese retrógrado de la transferencia y un incremento de la actividad proteolítica intracelular a cargo de los lisosomas. Además hay que tener en cuenta que el factor inhibidor de la tripsina está más presente en la fase inicial del calostro y según éste disminuye, aumenta la actividad de la tripsina en el abomaso (Quigley *et al.*, 1995).

#### 1.7.1.- Evolución de la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de rumiantes neonatos

Respecto a la evolución de la concentración de IgG en los neonatos, en el caso de los terneros (Logan *et al.*, 1978b) los niveles máximos de IgG se alcanzaron entre las 16 y 48 horas ( $21,5 \pm 2,6$  mg/ml). En corderos Finnish x Dorset Horn (Ciupercescu, 1977) se alcanzó la máxima concentración de IgG<sub>1</sub> a los 3 días de vida (22 mg/ml), descendiendo el nivel hasta casi el 50% en las primeras 2 semanas (12 mg/ml), y manteniéndose este descenso a lo largo del primer mes (8 mg/ml). A partir de este momento la concentración de IgG<sub>1</sub> incrementó ligeramente su valor hasta las 14 semanas de vida (12 mg/ml). La IgG<sub>2</sub> con una evolución inicial similar (0,25 mg/ml a los 3 días de vida) sufrió un gran incremento hacia el final del periodo de estudio (1 mg/ml a las 14 semanas de vida).

En ganado caprino Chen et al. (1999a) trabajando con cabritos de raza Nubia encontraron un pico en la concentración de inmunoglobulinas en suero sanguíneo de 33,3 mg/ml a las 24 horas de vida. Sin embargo O'Brien y Sherman (1993) describieron fallos en la transferencia de inmunidad pasiva en cabritos, cuando los niveles en sangre no superaban los 120 mg/ml, si bien en este último trabajo no se hace referencia a la técnica empleada para la determinación de inmunoglobulinas. En cabritos de raza Majorera, Argüello et al. (2004) observaron que el pico en la concentración de IgG en el suero sanguíneo se producía entre las 24 y 60 horas de vida de los animales. Los niveles de IgG encontrados por estos autores en este momento fueron de 22,21, 17,89 y 18,34 mg/ml, en animales enalostrosados con su madre y en lactancia artificial (*ad libitum* y restringida) respectivamente.

Al igual que sucede en el calostro hay muchos autores que describen grandes coeficientes de variación (55,82, 62,44 y 51,20%) en la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de cabritos (Sherman et al., 1990; O'Brien y Sherman, 1993; Chen et al., 1999a). Coeficientes de variación análogos han sido observados por Argüello (2000), en cabritos de raza Majorera, quien encontró valores del 60% en cabritos enalostrosados con sus madres, 50% en cabritos enalostrosados en lactancia artificial *ad libitum* y del 20% en los cabritos que recibieron el calostro en cantidad restringida.

### 1.7.2.- Comienzo de la producción endógena de inmunoglobulinas

Logan et al. (1972) tras experimentar con terneros, y citando varias fuentes, afirmaron que podía existir una influencia de la presencia de inmunoglobulinas procedentes del calostro en sangre sobre el comienzo en la producción de inmunoglobulinas endógenas, de forma que en animales enalostrosados con calostro de buena calidad inmunológica (alta

concentración de inmunoglobulinas), la síntesis propia comenzaba a las cuatro semanas de vida, mientras que los terneros agammaglobulinémicos privados del consumo de calostro comenzaban la síntesis endógena pocos días después de su nacimiento. Este hecho fue reafirmado posteriormente por Logan y Pearson (1978) quienes observaron que las placas de Peyer del intestino delgado de terneros privados del consumo de calostro producían inmunoglobulinas a los pocos días del nacimiento del animal. Sin embargo, en los terneros que habían consumido calostro, no se producía la citada síntesis en los primeros días de vida. Este hecho lo corrobora la revisión realizada por Roy (1990), donde se afirma que la producción propia de inmunoglobulinas en terneros privados del consumo de calostro comienza antes (hacia los diez días de vida) que en aquellos que sí tienen acceso al mismo. En este sentido Abel Francisco y Quigley III (1993) trabajando con terneros que consumieron calostro y comparando los niveles de absorción con otros alimentados con calostro al que se le añadía un suplemento de inmunoglobulinas, observaron que el aporte extra de éstas no influía sobre el comienzo de la síntesis endógena de las mismas.

### 1.7.3.- Efecto de los niveles de inmunoglobulinas en sangre sobre el crecimiento de los animales

En terneros en los que se utilizaron dos fuentes de inmunoglobulinas (calostro e inyección endovenosa de inmunoglobulinas) Crawford *et al.* (1995) no encontraron diferencias en la velocidad de crecimiento aunque sí apreciaron cierta tendencia a un mayor desarrollo en animales que consumieron calostro con respecto a los que no tuvieron acceso al mismo. Estos mismos autores afirmaron que la tendencia observada se debía más a una reducción de la velocidad de crecimiento, por una mayor sensibilidad a enfermedades, que a la presencia de factores de crecimiento en el calostro. Por el contrario Odde (1986) observó correlaciones significativas entre la

concentración de IgG sérica y el peso alcanzado a los 60, 120 y 180 días de vida.

En cabritos con diferentes concentraciones sanguíneas de IgG a las 24 horas de vida (14,6 mg/ml y 8,51 mg/ml) Constant et al. (1994) no encontraron diferencias de peso a los 42 días de vida ( $7,3 \pm 1,5$  kg y  $7,5 \pm 2,1$  kg). Resultados análogos fueron descritos por O'Brien y Sherman (1993), también en ganado caprino.

En el caso de corderos, Ciupercescu (1977) observó una correlación negativa entre los niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> a las 14 semanas y la ganancia media diaria (GMD) entre las 6 y las 12 semanas de vida. El citado autor explicaba la existencia de esta correlación en el hecho de que la producción endógena de inmunoglobulinas está favorecida por el estímulo antigénico, de forma que los corderos que presentaron un mayor crecimiento fueron los que estuvieron expuestos a una menor tasa de antígenos lo que influyó positivamente en su desarrollo.

#### 1.7.4.- Eficacia aparente en la absorción de inmunoglobulinas

La eficacia aparente en la absorción (EAA) aporta mayor información sobre la absorción de inmunoglobulinas que la concentración sérica de las mismas a las 24 o 48 horas de vida. La EAA se define como el porcentaje de las inmunoglobulinas consumidas que son realmente absorbidas (Quigley et al., 1998). Para el cálculo de la EAA es necesario conocer la cantidad de calostro ingerida, la concentración de inmunoglobulinas de éste, la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de la cría y el volumen de suero del animal. A menudo el volumen total del suero sanguíneo es estimado, obteniéndose valores del 6,5 al 9,3% del peso vivo (McEwan et al., 1970a; Möllerberg et al., 1975; Quigley et al., 1995).

En este sentido Crawford *et al.* (1995), trabajando con terneros Holstein que fueron encalostrados con suficiente cantidad de calostro natural, han afirmado que el 24,4% de las IgG fueron absorbidas.

#### 1.7.5.- Factores que afectan a la transferencia de inmunidad pasiva en los cabritos

##### 1.7.5.1.- Edad a la primera toma de calostro

Tal y como se cita con anterioridad en esta revisión bibliográfica el primer factor limitante de la transferencia de inmunidad pasiva es el denominado cierre intestinal que ha sido estudiado detalladamente por Staley y Bush (1985) y Jochims *et al.* (1994). Sobre este tema Nightengale (1979) y Stott *et al.* (1979b), trabajando con terneros, afirmaron que según incrementa la edad a la primera toma de calostro disminuyen tanto la concentración máxima de inmunoglobulinas en sangre como la eficacia en su absorción.

Otro de los factores (también citado anteriormente) es la secreción de enzimas digestivas que degradan las inmunoglobulinas y reducen la absorción de las mismas (tripsina). Así quedó demostrado por Quigley *et al.* (1995) quienes adicionaron un inhibidor de la tripsina al calostro proporcionado a terneros de raza Jersey, obteniendo de esta forma una mayor absorción de inmunoglobulinas.

También en terneros, Logan *et al.* (1979) observaron que la presencia de bacterias patógenas (*Escherichia coli*), que alteran las células de las microvellosidades intestinales, reducía la absorción de inmunoglobulinas en el intestino. Asimismo James *et al.* (1981) comprobaron que el comienzo del desarrollo de la flora microbiana intestinal disminuía absorción de inmunoglobulinas.

El fenómeno del cierre intestinal ha sido explicado por Rajala y Castrén (1995) mediante la creación de un modelo en el que correlacionaban el tiempo transcurrido entre el nacimiento de los terneros y la primera ingesta de calostro con los niveles de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo. Según estos autores cada 30 minutos de retraso en el consumo de calostro disminuye la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo en 2 mg/ml. Sin embargo, Orsel et al. (2000), trabajando con cabritos, no encontraron diferencias en los niveles de gammaglobulinas en el suero sanguíneo cuando el calostro era suministrado a los 30, 60 ó 90 minutos postparto (Figura 4).

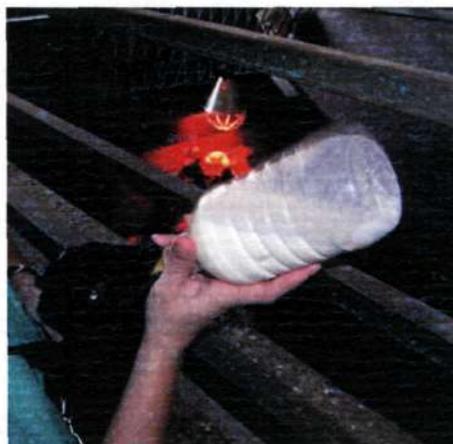


Figura 4.- Encalostrado con biberón

#### 1.7.5.2.- Separación temprana de la madre

Stott et al. (1979b), utilizando terneros para sus estudios, encontraron que la proporción en la absorción de inmunoglobulinas era mayor en aquellos criados con sus madres (forzados a una alimentación temprana) que en los que se alimentaban con balde. En cambio Brignole y Stott (1980) y Logan et al. (1981b) observaron lo contrario, afirmando incluso que los terneros criados con sus madres comenzaban a mamar calostro más tarde (sin intervención humana) que los encalostrados con balde o biberón.

La separación temprana de corderos (2 días) mostró en los animales menores tasas de anticuerpos en comparación con los resultados de una separación más tardía (15 días), tal vez provocada por un aumento en la tasa de cortisol endógeno (Napolitano *et al.*, 1995). Estos mismos autores estimaron que la separación temprana sólo era viable cuando las condiciones del medio fueron altamente saludables. En contraste con lo anterior y separando a los corderos al nacimiento, Dos Santos *et al.* (1994) no encontraron diferencias significativas entre las 0 y las 19 horas postparto, en los niveles de cortisol e IgG<sub>1</sub>, entre corderos criados con sus madres y separados al nacer.

En ganado caprino son escasas las referencias existentes al respecto. En este sentido Ramírez *et al.* (1996) afirmaron que el vínculo materno-filial, en numerosas especies de ungulados, se establece en los diez primeros minutos tras el parto, lo cual puede explicar la diferencia entre los dos experimentos anteriores. Así, mientras Napolitano *et al.* (1995) separaron a los animales tras dos días de contacto con las madres, permitiendo de esta forma el establecimiento del vínculo materno-filial, Dos Santos *et al.* (1994) realizaron la separación justo tras el nacimiento, no permitiendo la instauración de dicho vínculo.

#### 1.7.5.3.- Tamaño de la camada y peso al nacimiento

Chen *et al.* (1999a) trabajando con cabritos de raza Nubia encontraron menores concentraciones de inmunoglobulinas en el suero de los animales procedentes de parto simple (14,3 y 35,0 mg/ml, parto simple y doble respectivamente) a las 24 horas de vida. En cambio Rabbani *et al.* (1990) no observaron diferencias entre cabritos procedentes de parto simple o doble. Sin embargo Argüello (2000) encontró mayores concentraciones de IgG en el suero de cabritos de raza Majorera procedentes de parto simple

(20,24 y 18,40 mg/ml a las 24 horas de vida, parto simple y múltiple respectivamente) si bien las diferencias no fueron significativas.

No obstante, resulta curioso tener en cuenta que el comportamiento de los cabritos procedentes de parto simple normalmente es algo precoz (tiempo al primer intento de puesta en pie, primera puesta en pie con éxito y primer amamantamiento) con respecto a los de parto doble (Ramírez *et al.*, 1998), lo que podría respaldar lo encontrado por los autores citados anteriormente.

En corderos, Ciupercescu (1977) y Bekele *et al.* (1992) constataron que el tamaño de la camada no afectaba a la tasa de inmunoglobulinas séricas siempre que la cantidad de calostro no fuera limitante, afirmación en la que coincidieron con Halliday (1976).

Respecto al peso al nacimiento, Bekele *et al.* (1992) no hallaron diferencias, en la concentración de inmunoglobulinas en suero sanguíneo a las 48 horas de vida, entre corderos nacidos con un peso de 1 a 1,5 kg (36,3 mg/ml) y los animales cuyo peso al nacimiento superaba los 3 kg (40,8 mg/ml). Resultados análogos han sido descritos por Argüello (2000) quien no encontró correlaciones significativas entre el peso nacimiento y la concentración de IgG sérica en cabritos de raza Majorera. Si bien no aparecieron diferencias estadísticamente significativas, existía una tendencia a incrementar la concentración de inmunoglobulinas según aumentaba el peso al nacimiento (Argüello, 2000). Sin embargo, Cabello y Levieux (1981) encontraron, trabajando con corderos, que el peso al nacimiento estaba correlacionado positivamente con la eficiencia en la absorción de inmunoglobulinas. Tal vez la explicación pueda haber estado nuevamente en lo descrito por Halliday (1976) quien, al igual que Bekele *et al.* (1992), afirmó que el tamaño de la camada no afectaba a la tasa de anticuerpos en sangre de los corderos, siempre y cuando la cantidad de calostro no fuera

limitante. Así, Halliday (1976) encontró que, en razas ovinas con escasa producción de calostro, Merino o Caras negras, el tamaño de la camada y como consecuencia el peso al nacimiento de los corderos, sí afectaba a la concentración de inmunoglobulinas en sangre de los mismos.

#### 1.7.5.4.- Sexo

En terneros, existen opiniones contradictorias respecto al efecto del sexo sobre la concentración de inmunoglobulinas. De esta manera para Roy (1990) las hembras poseían una mayor capacidad de absorción que los machos. Sin embargo, Vann *et al.* (1995) no encontraron diferencias entre géneros ni en *Bos indicus* ni en *Bos taurus*.

En ganado caprino Chen *et al.* (1999a), si bien no observaron efecto del sexo en cabritos de raza Nubia sobre la concentración sérica de inmunoglobulinas, apuntaron una tendencia a una mayor concentración en las hembras (37,3 y 29,7 mg/ml, hembras y machos respectivamente, medidas mediante electroforesis). Por el contrario, aunque O'Brien y Sherman (1993) tampoco encontraron diferencias estadísticas entre sexos en cuanto a la concentración de inmunoglobulinas séricas, mostraron la existencia de una mayor concentración en los machos 135,2 mg/ml que en las hembras 91,4 mg/ml (medidas realizadas con test de turbidez). En trabajos más recientes Argüello (2000) afirmaba que el sexo no afectó a los niveles séricos de IgG en cabritos de raza Majorera, a la vez que tampoco observó efecto alguno sobre la concentración máxima ni sobre el pico de aparición de la misma. En el comportamiento inicial de los cabritos Ramírez *et al.* (1998) tampoco encontraron diferencias entre sexos.

Resultados análogos a los descritos en caprino han sido encontrados por Ciupercescu (1977) en ganado ovino, al no observar diferencias en los niveles sanguíneos de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgM, entre sexos en corderos Finnish x

Dorset Horn. Akdogan *et al.* (2000) tampoco observaron diferencias en las concentraciones de IgG del suero sanguíneo entre corderos machos y hembras.

#### 1.7.5.6.- Cantidad y calidad del calostro consumido

Dos Santos *et al.* (1994) no encontraron, en cabritos cruzados de raza Saanen y Anglonubia con cabras locales de Brasil, relación entre la concentración de IgG en el calostro a la hora postparto y los niveles de IgG en el suero de los cabritos a las 25 horas de vida. Asimismo Chen *et al.* (1999a) tampoco encontraron diferencias, en cabritos Nubios, cuando los animales tomaban un calostro de alta concentración proteica (200 mg/ml) y baja (100 mg/ml). Por el contrario, teniendo en cuenta las concentraciones de inmunoglobulinas, estos autores observaron que aquellos alimentados con calostros ricos en inmunoglobulinas (aproximadamente 100 mg/ml) obtenían mayores tasas de las mismas en sangre a las 24 horas de vida (40,1 y 21,8 mg/ml de IgG, encalostros con calostro rico y pobre en inmunoglobulinas respectivamente), que los alimentados con calostro de baja concentración de inmunoglobulinas (65 mg/ml). En este sentido Argüello (2000) encontró una alta correlación positiva ( $r=0,79$ ) entre la cantidad de IgG consumida y la encontrada en el suero sanguíneo de cabritos de raza Majorera, principalmente en las primeras 72 horas de vida.

Para Stott *et al.* (1979a), ingestas superiores a los 2 litros de calostro en terneros están relacionadas positiva y linealmente con la proporción de inmunoglobulinas absorbidas. Respecto a la cantidad de calostro Orsel *et al.* (2000) encontraron que los cabritos que ingerían 100 ml del mismo, tenían una menor concentración de inmunoglobulinas en sangre que los que consumían entre 150 y 200 ml. Asimismo en ganado caprino, Argüello *et al.* (2004) no encontraron diferencias estadísticas en los niveles de IgG en el

suero sanguíneo de cabritos de raza Majorera, aportando calostro *ad libitum* o calostro de forma restringida (10% del peso nacimiento/día).

Si bien los autores citados anteriormente hacían referencia a la cantidad de calostro consumido, Stott y Fellah (1983), trabajando con terneros, afirmaron que la concentración de inmunoglobulinas presentes en el calostro era un factor fundamental en la absorción de las mismas. Así, los terneros que consumían un litro de calostro con una concentración de 60 mg/ml, poseían un mayor nivel de inmunoglobulinas en sangre que aquellos que consumían dos litros con una concentración de inmunoglobulinas de 30 mg/ml. De igual forma, Muller y Ellinger (1981) encontraron coeficientes de correlación positivos entre la concentración de IgG (0,52), IgA (0,56) e IgM (0,36) presentes en el calostro y la resultante en el suero de los terneros. En contra de lo expuesto anteriormente, Michanek *et al.* (1989a y b) observaron que en terneros la ingesta de grandes cantidades de inmunoglobulinas, en las primeras tomas de calostro, podía provocar el cese de la transferencia de inmunidad pasiva.

También en terneros otros autores encontraron que la relación entre las inmunoglobulinas consumidas y la concentración de las mismas en el suero sanguíneo era lineal (McEwan *et al.*, 1970b; Stott y Fellah, 1983).

Por el contrario, Al-Jawad y Lees (1985) no encontraron diferencias en la eficacia de absorción en corderos Clun Forest al proporcionarles inmunoglobulinas, procedentes de diferentes fuentes, que oscilaban en su concentración entre 139 mg/ml (calostro ovino) y 38 mg/ml (suero sanguíneo ovino). Este hallazgo concuerda con lo expresado por Sawyer *et al.* (1977) quienes, trabajando también con corderos, afirmaron que si la cantidad de calostro suministrada no era limitante, la concentración no jugaba un papel fundamental en la absorción, sino que lo serían factores de absorción intestinales.

El consumo de leche no calostrai previo a la ingesta de calostro, no afectó a la absorción de IgG por parte de terneros Holstein (Michanek *et al.*, 1990). En este caso las concentraciones halladas fueron de  $10,2 \pm 2,3$  y  $9,6 \pm 2,7$  mg/ml de IgG, en terneros que no ingirieron leche antes del calostro y en los que sí lo hicieron respectivamente.

#### 1.8.- Alternativas al uso de calostro natural

El uso de fuentes alternativas de calostro está especialmente indicado en casos de ausencia de la producción de éste por parte de las madres, partos múltiples, crías débiles o con escaso peso al nacimiento, así como en caso de muerte de la madre o en el manejo propio de la lactancia artificial, el cual, como ya se ha citado reiteradamente con anterioridad, se ve dificultado por una relación larga entre la cría y la madre (Larson *et al.*, 1974; Eales *et al.*, 1982; Al-Jawad y Lees, 1985; Sherman *et al.*, 1990; Winter y Clarkson, 1992; Argüello *et al.*, 1998).

Asimismo el empleo de alternativas al calostro de la madre (Figura 5) está también establecido como método de profilaxis ante ciertas patologías, como la artritis-encefalitis caprina (CAEV) cuya principal vía de transmisión es galactogénica (Peretz, 1992; Greenwood *et al.*, 1995; Nord *et al.*, 1998; Contreras *et al.*, 2003).



Figura 5.- Cabrito mamando de su madre

Tampoco se debe obviar, como ya se ha mencionado, que el calostro además del aporte de inmunidad cumple otra serie de funciones, entre las cuales está la de actuar como laxante al estimular el peristaltismo de la mucosa intestinal (García de Jalón *et al.*, 1990). En este sentido Heath (1985) afirmó que el aporte de la misma cantidad de calostro bovino que de calostro ovino a un cordero, disminuye a la mitad la cantidad de grasa ingerida, reduciendo el efecto laxante de la misma, por lo que recomienda añadir aproximadamente 55 g de aceite vegetal por litro de calostro bovino que se proporcione a corderos.

En el ganado caprino el uso de calostro bovino también se encuentra extendido. Greenwood (1993) realizó un estudio con animales de raza Saanen y Alpina Británica, en Australia, donde un lote de cabritos fue encalostrado con un producto de origen bovino, no observándose ningún efecto adverso. Sin embargo, Nord *et al.* (1998) tras encalostrar a 229 cabritos con calostro de vaca, encontraron un ligero aumento en los problemas respiratorios, achacables a la ausencia de ingesta de calostro caprino. El uso de calostro bovino para encalostrar cabritos es un manejo seguido habitualmente como medida profiláctica del contagio de la artritis encefalitis caprina (Nord *et al.*, 1998) o de la enfermedad de Jonh (paratuberculosis). Guerrault (1990) trabajando con cabritos, probó cuatro

tipos de calostro, caprino pasteurizado, bovino sin tratar, calostro en polvo y una preparación comercial a base de calostro liofilizado, encontrando que las concentraciones séricas de los cabritos eran de 15, 11, 1 y 3 mg/ml el segundo día.

En el caso del ganado ovino (Logan *et al.*, 1978a; Eales *et al.* 1982; Al-Jawad y Lees, 1985; Sherman *et al.*, 1990; Winter y Clarkson, 1992) uno de los principales substitutivos del calostro materno ha sido también el de origen bovino, dada la gran producción por parte de las vacas y el escaso uso comercial que se hace de él. Así, Larson *et al.* (1974) demostraron la efectividad del calostro bovino liofilizado en la transferencia de inmunoglobulinas específicas contra antígenos de *Escherichia coli*. El suero sanguíneo bovino también ha sido usado satisfactoriamente como alternativa al calostro ovino en corderos (Al-Jawad y Lees, 1985), si bien estos autores lo acompañaron en su experiencia de un lactorreemplazante que actuaba como fuente energética. Por el contrario, estos mismos autores no recomendaron el uso de sangre entera (bovina u ovina) como reemplazante del calostro ovino en corderos, ya que ésta que no aportaba los suficientes niveles de inmunidad.

Uno de los principales problemas que ocasiona el uso de calostros heteroespecíficos, es la aparición de anemias hemolíticas en los animales recién nacidos. Este hecho se debe a la ingesta de anticuerpos sensibilizados a la propia especie. La anemia hemolítica por consumo de calostro bovino ha sido descrita en cabritos y corderos por Winter (1990) y Perrin *et al.* (1995).

Como una nueva alternativa en el encalostro, se considera el uso de calostros comerciales, cada vez más ampliamente distribuidos, principalmente en ganado ovino (Solanes *et al.*, 1995), si bien se encuentran además en la bibliografía algunas referencias respecto al uso de calostros comerciales en

ganado bovino (Chelack et al., 1993; Wereme et al., 2001) y, aunque en menor medida, también en ganado caprino (Zadoks et al., 2001).

Generalmente se trata de productos concentrados y esterilizados procedentes de ganado bovino u ovino y, hasta el momento, su utilización como única fuente de inmunoglobulinas no ha tenido resultados satisfactorios. Así, usando calostro comercial de origen caprino, Constant et al. (1994) no obtuvieron en su experiencia concentraciones sanguíneas de IgG en cabritos superiores a las encontradas en cabritos encalostrados con calostro natural caprino pasteurizado. La presencia de ciertas enzimas, hormonas y factores de crecimiento podrían explicar este hecho o, tal vez, porque el mecanismo de absorción de macromoléculas en el intestino no es selectivo para las inmunoglobulinas, con lo que una mayor proporción de albúmina en los calostros comerciales podría competir con la absorción de inmunoglobulinas, tal y como sucede en terneros, donde la adición de albúmina al calostro disminuye la absorción de IgG<sub>1</sub> de un 59 a un 36% (Besser y Osborn, 1993). Zadoks et al. (2001), tras probar distintos calostros comerciales en cabritos, concluyeron que ninguno de ellos era adecuado para sustituir al calostro de cabra como fuente de inmunoglobulinas.

Solanes et al. (1995) encontraron mayores mortalidades en lotes de corderos, criados sólo con calostro comercial (60 g/animal), que en lotes donde se había usado como complemento del encalostrado natural. Asimismo Bernabé et al. (1998) asociaron el uso de un calostro comercial con la aparición de casos de poliartritis asociada a *Klebsiella pneumoniae* en cabritos.

Quigley y Welborn (1996) han utilizado la vía parenteral (intravenosa y subcutánea), con cierto éxito, para solucionar problemas de fallo de transferencia pasiva de inmunidad en terneros. Estos autores emplearon

soluciones concentradas de inmunoglobulinas, procedentes de sangre bovina obtenida en mataderos. Los resultados encontrados difirieron según se tratase de inyección endovenosa o subcutánea. Así, mientras la solución administrada por vía intravenosa incrementó la concentración de IgG de los terneros en 2,9 mg/ml, cuando ésta se administraba por vía subcutánea los niveles séricos de los terneros no variaron. La diferencia probablemente estribaba en el método de obtención del concentrado de inmunoglobulinas. No obstante, el uso de concentrados de inmunoglobulinas por vía parenteral puede ser empleado como fuente de inmunidad en terneros en los que ha concluido el periodo de transporte intestinal de macromoléculas (Crowley et al., 1994; Crawford et al., 1995; Quigley y Welborn, 1996).

### 1.9.- Métodos de conservación del calostro

El manejo de la lactancia artificial lleva asociada la necesidad de conservar calostro para tener suficientes reservas en el momento del nacimiento de las crías. Actualmente hay varios métodos de conservación descritos en la bibliografía, si bien las referencias hasta el momento son escasas.

#### Congelación

Chelack et al. (1993) consideraron que la congelación del calostro no es un método óptimo en ganado bovino, debido a que habitualmente se solían congelar los calostros de los seis ordeños postparto sin contrastar su contenido en inmunoglobulinas. Otra de las razones que aportaban estos autores es que se necesitaba un amplio espacio en condiciones de congelación y, además, a la hora de proporcionárselo a los terneros era necesario realizar tareas de descongelación y atemperado que podían ser largas y tediosas, por lo que proponían como alternativa los calostros deshidratados. En cambio Klobasa et al. (1998) encontraron que no había

diferencias ni en los niveles de inmunoglobulinas en el suero de terneros ni en su coeficiente de absorción independientemente de que los terneros hubieran sido encalostrosados con calostro congelado o liofilizado, si ambos tenían la misma concentración.

### **Deshidratación**

La elaboración de concentrados de calostro mediante diversos métodos de deshidratación ha sido una práctica común en el ganado bovino. Chelack *et al.* (1993) testaron tres métodos de deshidratación, liofilizado, evaporación por microondas y evaporación por secado, encontrando que el de mayor eficacia y retención de anticuerpos, y con menor costo y gasto energético, era la evaporación por secado. No obstante observaron que la liofilización resultó muy efectiva para la conservación de la función de las inmunoglobulinas, pero que tenía la desventaja de que era un proceso lento y con alto consumo de energía.

### **Acidificación**

En lugares con clima cálido la acidificación del calostro con formaldehído es una alternativa viable cuando los métodos de refrigeración o deshidratación no están disponibles (Mbuthia *et al.*, 1997).

#### **1.10.- Acido Linoleico Conjugado (CLA)**

El ácido Linoleico conjugado, más conocido con el acrónimo CLA es un ácido graso derivado del ácido Linoleico. El ácido Linoleico (ácido 9,12-octadecadienoico) es un ácido graso esencial de 18 átomos de carbono con dos insaturaciones (dobles enlaces) situados en las posiciones 9 y 12 y en configuración *cis*.

De esta forma, ácido Linoleico conjugado es un término genérico que se usa para definir a un grupo de isómeros posicionales y estructurales del ácido Linoleico (Figura 6). De entre todos los isómeros hay que destacar el *trans*-10, *cis*-12 (t10,c12) y el *cis*-9, *trans*-11(c9,t11), siendo este último uno de los isómeros biológicamente más activo (Cook, 1999). Asimismo Martin y Valeille (2002) han descrito que los diferentes isómeros del CLA ejercen efectos fisiológicos diferentes.

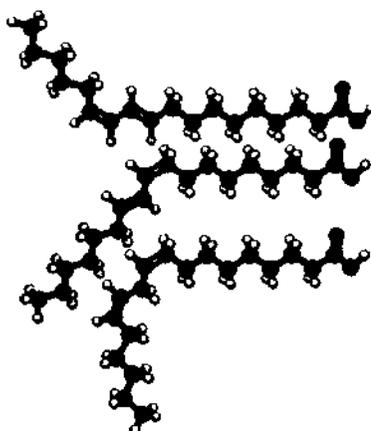


Figura 6.- C18:2 (t10,c12; c9,t11;c9,c12)

Kepler et al. (1966) observaron que el isómero c9,t11 era producido por *Butyrivibrio fibrisolvens*, de la flora gastrointestinal de los rumiantes, cuando esta bacteria era incubada con ácido Linoleico. De esta forma McGuire et al. (1997) propusieron que se denominara ácido Bovínico, nombre que no se consideró apropiado ya que este isómero también es sintetizado en el rumen de otras especies. Por ello, Kramer et al. (1998) sugirieron denominarlo ácido Ruménico, que es el nombre que tiene mayor aceptación e la actualidad.

Recientemente, en relación a la nomenclatura del CLA, Ellen y Elgersma (2004) han propuesto utilizar diferentes términos para denominar al CLA, y ya que, en leche, el principal isómero es el *cis*-9,*trans*-11, estos autores plantearon utilizar el término ácido Ruménico en lugar de CLA. Esto

fue planteado para evitar que erróneamente se asocie a los productos lácteos con consecuencias negativas sobre la salud debido al hallazgo de efectos perjudiciales sobre el hígado en animales de experimentación producidos por el isómero *trans*-10,*cis*-12 (De Dekere *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2003). De la misma forma, Ellen y Elgersma (2004) propusieron utilizar el nombre de ácido Vacénico para denominar al ácido graso C18:1 *trans*-11, con el fin de evitar que se asocie a éste con los efectos negativos de los ácidos grasos *trans* en general. En este sentido estos mismos autores afirmaron que los ácidos Ruménico y Vacénico producían unos efectos beneficiosos similares sobre la salud, porque ambos son omega-7, los cuales se encuentran presentes de forma natural casi exclusivamente en leche y carne de rumiantes.

La grasa y la leche de los rumiantes son la mayor fuente alimenticia de CLA. Parodi (1977) estableció que el isómero *c9,t11* estaba presente de forma abundante en la leche de vaca. No obstante, la mayor concentración de CLA en leche fue encontrada (Jahreis *et al.*, 1999) en la leche de oveja (1,2% del total de ácidos grasos metil ésteres) seguida de la de vaca (0,7%) y la de cabra (0,6%).

#### 1.10.1.- Actividades biológicas

Dentro de las múltiples actividades biológicas atribuibles al CLA (Pariza, 1999) son varios los autores que citan su efecto beneficioso frente, a la carcinogénesis (Ha *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1991; Pariza, 1991) y a la aterosclerosis (Lee *et al.*, 1994; Nicolosi *et al.*, 1997). También ha sido descrito el efecto del CLA sobre el metabolismo lipídico y la composición corporal (Pariza, 1997; Park *et al.*, 1997) así como su efecto inmunomodulador (Sugano *et al.*, 1998; Bassaganya *et al.*, 1999; Hayek *et al.*, 1999).

### Efecto anticarcinogénico

Los primeros estudios realizados acerca del efecto del CLA en la prevención del cáncer de mama en ratas, fueron realizados por Ip *et al.* (1991). En este sentido uno de los primeros hallazgos fue que el CLA suprimía la actividad proliferativa en la glándula mamaria de la rata (Ip *et al.*, 1994). Más recientemente, Banni *et al.* (1999) han publicado que el CLA en la dieta afectaba al metabolismo del retinol, encontrando así que tenía un claro efecto anticarcinogénico. Cesano *et al.* (1998) también han observado que el CLA en la dieta inhibía el crecimiento de células de carcinoma humano que fueron inyectadas a ratones inmunodeficientes. Aunque las evidencias entre la ingesta de CLA y la reducción del cáncer en humanos son aún limitadas. Knekt *et al.* (1996) encontraron una relación inversa entre el consumo de leche y el cáncer de mama en mujeres.

### Efecto antiaterogénico

Lee *et al.* (1994) trabajando con conejos que fueron alimentados con una dieta hipercolesterolémica con y sin la adición de CLA, observaron, al finalizar la experiencia, que el grupo de animales que tomó CLA presentó niveles inferiores de colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos que el grupo que sirvió de control. Además las aortas de los conejos que tomaron CLA presentaban en la necropsia menos aterosclerosis que las aortas del grupo control. En este mismo sentido Nicolosi *et al.* (1997) observaron que el CLA reducía las lipoproteínas plasmáticas y la aterosclerosis aórtica temprana en hámster.

### Efecto sobre la composición corporal

Son varios los autores que han descrito que el CLA en la dieta producía cambios en la composición corporal en varias especies animales

entre las que se incluyen ratones (Park *et al.*, 1997) ratas (Sisk *et al.*, 1998) y cerdos (Pariza, 1997). Estos cambios consistían en una reducción de grasa corporal y en un incremento de la masa libre de grasa. Al parecer el CLA ejerce un efecto directo sobre los adipocitos (lugar de almacenamiento de la grasa) y sobre las células del músculo esquelético (lugar de combustión de la grasa).

### Efecto sobre el sistema inmune

El efecto del CLA sobre el sistema inmune no está bien estudiado hasta el momento. Sin embargo Bassaganya-Riera *et al.* (2001) afirmaron que se trataba de un producto natural que incrementaba la función inmune mientras reducía los efectos negativos de la respuesta inflamatoria. Estos mismos autores afirmaron también que el efecto inmunomodulador del CLA no era inmediato. Otros autores también coinciden en que el CLA regula la función inmune. Así, Ha *et al.* (1987) trabajando con ratones y Sugano *et al.* (1998), en ratas, encontraron que en los animales, en cuya dieta se incluía CLA, se producía una reducción significativa de ácido Araquidónico que es precursor de la Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Esta prostaglandina es supresora de la inmunidad celular y disminuye la producción de Interleukina 2 (IL-2).

Cook *et al.* (1993) y Miller *et al.* (1994) trabajando con ratas observaron que los animales alimentados con CLA mostraban incrementada su función inmune y que el CLA servía como un factor de crecimiento en individuos jóvenes. Estas observaciones denotaban que el sistema inmune competía por la energía con otras funciones metabólicas, como el crecimiento o la regeneración tisular. También Hensler *et al.* (1997) encontraron que, tras un fuerte traumatismo, el sistema inmune estaba suprimido y esto podía ocurrir así porque la energía estaba dividida entre la función inmune y la regeneración del tejido. En el mismo sentido Cook *et al.* (1993) y Miller *et al.* (1994) afirmaron que el CLA en la dieta

incrementaba la función del sistema inmune y al mismo tiempo protegía frente a los efectos catabólicos de la respuesta inmune, por lo que estos autores sugirieron que se debe aplicar el potencial del CLA como favorecedor de la salud.

Sugano *et al.* (1999) evaluaron el efecto de la inclusión de CLA en la dieta de ratas sobre la producción de inmunoglobulinas de las mismas. En la experiencia estos autores trabajaron con tres grupos de animales: un grupo control (0% CLA) y otros dos que recibían la suplementación de CLA en un 0,5 y 1% respectivamente. Transcurridas tres semanas, observaron que la concentración de IgA e IgM de las ratas que tomaron CLA (1%) fue de tres a cincuenta veces mayor que la del grupo control. Asimismo la IgG no fue detectable en el grupo control. Sin embargo en los grupos que tomaron CLA sí se encontraron concentraciones de ésta, siendo nueve veces mayor en el grupo CLA 1% que en las ratas que tomaron 0,5% de CLA. Por el contrario observaron que en los animales que tomaron CLA se producía una disminución de la concentración de IgE siendo este descenso más notable en el grupo CLA 1%.

Resultados análogos fueron señalados por Corino *et al.* (2002), trabajando con cerdos destetados, quienes afirmaron que la suplementación de la dieta con CLA incrementaba los niveles de IgG de los animales de forma significativa.

Por otra parte, como ya se ha señalado, el CLA disminuye la producción de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) porque interfiere la síntesis de ácido Araquidónico (precursor de la PGE<sub>2</sub>) desde el ácido Linoleico (Belury y Kempa-Steczko, 1997). La citada prostaglandina es supresora de la inmunidad celular (Goldyne y Strobo, 1982) y disminuye la producción de Interleukina 2 (IL-2). En este sentido Cook *et al.* (1993) observaron que los

pollos que recibían una dieta con un 0,5% de CLA reducían de forma significativa sus niveles de ácido Araquidónico.

### 1.1.1.- Inmunidad celular medida por el óxido nítrico

El óxido nítrico es un compuesto inorgánico de corta vida, unos pocos segundos, que debido a su elevada solubilidad difunde a través de las membranas biológicas. La producción controlada del citado óxido nítrico juega un importante papel en el sistema inmune y vascular de los mamíferos. Se trata de una molécula nitrógeno reactiva que fue estudiada inicialmente en el sistema nervioso (Garthwaite, 1991).

La síntesis de óxido nítrico se realiza a partir de la L-arginina mediante una reacción dependiente de oxígeno y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH) produciendo óxido nítrico y L-citrulina de forma equimolar (Bush *et al.*, 1992). Asimismo la síntesis de óxido nítrico depende de la acción de la enzima óxido nítrico sintasa. Existen tres isoformas de la citada enzima que se han clasificado según sus propiedades funcionales y el tejido donde se originan. Así, las isoformas endotelial y neuronal de la óxido nítrico sintasa son constitutivas y parece que responsables, de la liberación continua de niveles basales de óxido nítrico. La tercera isoforma es inducible y es expresada en respuesta a citokinas y lipopolisacáridos inflamatorios (Morris y Billiar, 1994). Las tres isoformas han sido encontradas en tipos celulares variados entre los que se incluyen neuronas, epitelio gástrico y bronquial, músculo esquelético, macrófagos, cardiomiocitos, hepatocitos y condrocitos. La producción de óxido nítrico es por lo tanto casi ubicuitaria. En los mamíferos se ha descrito la presencia de esta isoforma denominada óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en los macrófagos y células endoteliales (Schmidt *et al.*, 1992).

El óxido nítrico una vez sintetizado puede difundir rápidamente a través de las membranas celulares (Lancaster, 1997). Una tasa elevada de óxido nítrico contribuye a la muerte celular por apoptosis o necrosis (en función del daño celular producido) de la misma (Murphy, 1999). Una de las causas de daño celular asociada a la presencia de niveles elevados de óxido nítrico es el estrés oxidativo (Gross y Wolin, 1995). No obstante el óxido nítrico también afecta a las mitocondrias de diferentes formas (Murphy, 1999).

Sin embargo, el óxido nítrico puede también producir efectos protectores, incrementando el flujo sanguíneo o inhibiendo la agregación plaquetaria (Iadecola, 1997), lo cual complica la interpretación de los efectos del compuesto en animales sanos. En este sentido Lacasse et al. (1996), trabajando con cabras de raza Saanen, sobre las que realizó una infusión intraarterial de óxido nítrico, observaron que la glándula mamaria respondía al óxido nítrico y fomentaba la posibilidad de que el epitelio pudiera controlar su suministro de sangre, secretando óxido nítrico.

Algunos autores que han estudiado la actividad del óxido nítrico frente a diversos patógenos, entre ellos *Escherichia coli*, Brunelli et al. (1995), observaron que era más sensible a otra molécula nitrógeno reactiva (peroxinitritos) que al óxido nítrico puro.

En el caso de infecciones víricas, Lechner et al. (1999), trabajando con ganado caprino, infectado con el virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV), observaron la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible sólo en aquellos animales que tenían una artritis clínica severa y no en las cabras que llevaban un corto periodo de tiempo infectadas, lo que hizo afirmar a estos autores que el virus que inducía esta patología podría desarrollarse en ausencia de pronunciados niveles de óxido nítrico sintasa inducible y que la expresión de ésta era una característica de inflamación crónica.

## BIBLIOGRAFÍA

## 2.- Bibliografía

- Abel Francisco, S.F., Quigley III, J.D., 1993. Serum immunoglobulin concentrations after feeding maternal colostrum plus colostrum supplement to dairy calves. *American Journal Veterinary Research* 54(7), 1051-1054.
- Akdogan, A., Bakirel, U., Cagtay, P., Tan, H., 2000. The effects of serum IgG and trace elements-cooper and zinc on the development of Kivircik lambs following colostrum intake. *Veteriner Fakultesi Dergisi Istanbul* 26(2), 475-481.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, D., Roberts, K., Watson, J.D., 1986. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega, Barcelona.
- Al-Jawad, A.B., Lees, J.L., 1985. Effects of ewe's colostrum and various substitutes on the serum immunoglobulin concentration, gut closure process and growth rate of lambs. *Animal Production* 40, 123-127.
- Argüello, A., 2000. *Lactancia artificial de cabritos, encalostrado, crecimiento, calidad de la canal y de la carne*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 356 pp.
- Argüello, A., Mayáns, S., López, J.L., 1998. *Lactancia Artificial en Cabritos*. Cabildo Insular de Tenerife, 26 pp.
- Argüello, A., Castro, N., Capote, J., Tyler, J.W., Holloway, N.M., 2004. Effect of colostrum administration practices on serum IgG in goat kids. *Livestock Production Science* 90, 235-239.
- Babiuk, L.A., Campos, M., Sordillo, L.M., Hughes, H., Rossi-Campos, A., Harland, R., 1990. Interaction of cytokines and leukocytes in infectious diseases. *Journal of Dairy Science* 73, Supplement 1, 235.
- Bainter, K., 1986. *Intestinal absorption of macromolecules and immune transmission from mother to young*. Boca Ratón, Fla. CRC Press Inc., 102.

- Balfour, W.E., Comline, R.S., 1959. The specificity of the intestinal absorption of large molecules by the newborn calf. *J. Physiol.*, London, 148, 77-78.
- Banni, S., Angioni, E., Carta, G., Casu, V., Deiana, M., Dessì, M.A., Lucchi, L., Melis, M.P., Rosa, A., Vargiolu, S., Corongiu, F.P., 1999. Influence of dietary conjugated Linoleic acid on lipid metabolism in relation to its anticarcinogenic activity. In *Advances in Conjugated linoleic acid Research*, Volume 1. (Yurawecz et al. Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 307-318.
- Barza, H., Marinescu, M., Blaga, L., 1993. Disorders of foals 0-10 days of age. Part I. *Revista Romana de Medicina Veterinaria* 3(1), 9-20.
- Bassaganya, J., Hontecillas, R., Bregendahl, K., Wannemuehler, M.J., Zimmerman, D.R., 1999. Dietary conjugated Linoleic acid increases CD8 T lymphocyte subpopulation in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 77(Suppl. 1), 119(Abstract).
- Bassaganya-Riera, J., Hontecillas-Magarzo, R., Bregendahl, K., Wannemuehler, M.J., Zimmerman, D.R., 2001. Effects of dietary conjugated Linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune competence. *Journal of Animal Science* 79, 714-721.
- Baumrucker, C.R., Blum, J.R., 1993. Secretion of insulin-like growth factors in milk and their effect on the neonate. *Livestock Production Science* 35, 49-72.
- Bekele, T., Otesile, E.B., Kasali, O.B., 1992. Influence of passively acquired colostral immunity on neonatal lamb mortality in Ethiopian Highland sheep. *Small Ruminant Research* 9, 209-215.
- Belury, M.A., Kempa-Steczko, A., 1997. Conjugated Linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 33, 199-204.
- Bernabé, A., Contreras, A., Gómez, M.A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Gómez, S., 1998. Polyarthrititis in kids associated with *Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Record* 142, 64-66.

- Bernier, G.M., Ballieux, R.E., Tominaga, K.T., Putnam, F.W., 1967. Heavy chain subclasses of human G-globulin. Serum distribution and cellular localization. *J. exp. Med.* 125, 303-318.
- Besser, T.E., Osborn, D., 1993. Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G<sub>1</sub> to newborn calve. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37, 321-327.
- Brambell, F.W.R., 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. *Frontiers of Biology, Volumen 18*, edited by Neuberger, A. Y Tatum, E.I., North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Bramford, D.R., 1966. Studies in vitro of the passage of serum proteins across the intestinal wall of young rats. *Proc. R. Soc. Ser. B.* 166, 30-45.
- Brandon, M.R., Lascelles, A.K., 1971. Relative efficiency of absorption of IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA and IgM in the newborn calf. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 49, 629-633.
- Brignole, T.J., Stott, G.H., 1980. Effect of suckling followed by bottle feeding colostrum on immunoglobulin absorption and calf survival. *Journal of Dairy Science* 63, 451-456.
- Brock, J.H., Arzabe, F.R., Pineiro, A., 1977. The effect of trypsin and chymotrypsin on the bactericidal activity and specific antibody activity of bovine colostrum. *Immunology* 32, 207.
- Brunelli, L., Crow, J.P., Beckman, J.S., 1995. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxy-nitrite to *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 327-334.
- Bush, L.J., Staley, T.E., 1980. Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. *Journal of Dairy Science* 63, 672-680.
- Bush, P.A., Gonzales, N.E., Griscavage, J.M., Ignarro, L.J., 1992. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyses the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 960-966.

- Butler, J.E., 1969. Bovine immunoglobulins: A review. *Journal of Dairy Science* 52, 1895-1909.
- Butler, J.E., Winter, A.J., Wagner, G.G., 1971. Symposium: Bovine immune system. *Journal of Dairy Science* 54, 1309-1339.
- Cabello, G., Levieux, M., 1981. Absorption of colostrum IgG<sub>1</sub> by the newborn lamb: influence of the length of gestation, the birthweight, and thyroid function. *Research Veterinary Science* 31, 190-194.
- Castro, N., 2000. Estudio de los principales factores de variación sobre la calidad del calostro de la Agrupación Caprina Canaria. Tesina de Licenciatura. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 91 pp.
- Cesano, A., Visonneau, S., Scimeca, J.A., Kritchevsky, D., Santoli, D., 1998. Opposite effects of Linoleic acid and conjugated Linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Research* 18, 1429-1434.
- Chelack, B.J., Morley, P.S., Haines, D.M., 1993. Evaluation of methods for dehydration of bovine colostrum for total replacement of normal colostrum in calves. *Canadian Veterinary Journal* 34, 407-412.
- Chen, J.C., Chang, C.J., Peh, H.C., Chen, S.Y., 1998. Total protein and globulin contents of mammary secretion during early postpartum period of Nubian goats in the Taiwan area. *Small Ruminant Research* 31, 67-73.
- Chen, J.C., Chang, C.J., Peh, H.C., Chen, S.Y., 1999a. Serum protein levels and neonatal growth rate of Nubian goat kids in Taiwan area. *Small Ruminant Research* 32, 153-160.
- Chen, J.C., Chang, C.J., Peh, H.C., Lee, S.L., 1999b. Perinatal adrenocortical function in relation to the growth rate and immunoglobulin acquisition of goat kids. *Small Ruminant Research* 33, 255-262.
- Ciupercescu, D.D., 1977. Dynamics of serum immunoglobulin concentration in sheep during pregnancy and lactation. *Research in Veterinary Science* 22, 23-27.

- Clark, S.L., 1959. The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. *J. biophys. Biochem. Cytol.* 5, 41-50.
- Collias, N.E., 1956. The analysis of socialization in sheep and goats. *Ecology* 37, 124-129.
- Constant, S.B., Leblanc, M.M., Klapstein, E.F., Beebe, D.E., Leneau, H.M., Nunier, C.J., 1994. Serum immunoglobulin G concentration in goats kids fed colostrum or a colostrum substitute. *Javma* 205(12), 1759-1762.
- Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., 2003. Epidemiología de la artritis encefalitis caprina. *Ovis* 87, 33-44.
- Cook, M.E., 1999. Conjugated Linoleic acid. *Proceedings of the 52nd Annual Reciprocal Meat Conference, Oklahoma, USA*, 52, 43-46.
- Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W., 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72, 1301-1305.
- Corino, C., Bontempo, V., Sciannimanico, D., 2002. Effects of dietary conjugated Linoleic acid on some specific immune parameters and acute phase protein in weaned piglets. *Canadian Journal Animal Science* 82, 115-117.
- Crawford, M.L., Quigley, J.D., Martin, K.R., 1995. Immunoglobulin concentrations in serum in response to injectable immunoglobulin in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science* 78, 1567-1572.
- Crowley, M.L., Fisher, L.J., Owen, B.D., 1994. Blood derived immunoglobulins in milk replacer, or by injection for improved performance of colostrum deprived neonatal calves. *Animal Feed Science and Technology* 47, 245-257.
- Csapo, J., Wolf, G., Csapo, Z., 1989. Composition of colostrum from goats and ewes dropping twins. *Acta Agronomica Hungarica* 38(3-4), 395-402.

- De Deckere, E.A.M., Van Amelsvoort, J.M.M., McNeill, G.P., Jones, P., 1999. Effects of conjugated Linoleic acid isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr. Dev.* 82, 309-317.
- Dos Santos, G.T., 1987. Quelques aspects physiologiques et nutritionnels de l'adaptation du ruminant nouveau-né à la naissance: Absorption des immunoglobulines extraites du colostrum bovin et perturbations digestives, métaboliques et hormonales provoquée par l'hypoxie. Tesis Doctoral, Universidad de Rennes I – Rennes, Francia, 207 pp.
- Dos Santos, G.T., Bertolini, D.A., Macedo, F., Prado, I., Martins, E., 1994. Variabilidade em imunoglobulina G (IgG) no colostro de cabra de primeira ordenha e absorcao intestinal de IgG pelos cabritos recém-nascidos. *Arquivos Biologicos y Tecnologicos* 37(2), 285-292.
- Eales, F.A., Gilmour, J.S., Barlow, R.M., Small, J., 1982. Causes of hypothermia in 89 lambs. *Veterinary Record* 110(6), 118-120.
- Ellen, G., Elgersma, A., 2004. Letter to the Editor: Plea for using the term n-7 Fatty acids in place of C18:2 *cis*-9,*trans*-11, and C18:1 *trans*-11 or their trivial names Rumenic acid and Vaccenic acid rather than the generic term conjugated Linoleic acids. *Journal of Dairy Science* 87, 1131.
- Fahey, J.L., McKelvey, E.M., 1965. Quantitative determination of serum immunoglobulin in antibody agar plates. *Journal Immunology* 94, 84.
- Fleet, I.R., Goode, J.A., Hamon, M.H., Laurie, M.S., Linzell, J.L., Peaker, M., 1975. Secretory activity of goat mammary glands during pregnancy and the onset of lactation. *Journal of Physiology* 251(3), 763-773.
- García de Jalón, J.A., De las Heras, M., Ferrer, L.M., Sancho, F., 1990. Síndrome de la boca mojada. *Medicina Veterinaria* 7(9), 505-509.
- García, S., Goddard, P.J., 1998. The provision of supplementary colostrum to newborn lambs: effects on postnatal lamb and ewe behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 61, 41-50.

- Garthwaite, J., 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS* 14, 60-67.
- Gawad, I.A., Mahfouz, M., Ali, A.A., Hewedi, M., Gawad, I.A., 1986. The electrophoretic pattern of goat's milk proteins during various periods of lactation. *Annals of Agricultural Science* 24(3), 1469-1475.
- Gay, C.C., 1983. Failure of passive transfer of colostral immunoglobulins and neonatal disease in calves: a review. 4<sup>th</sup> International Symposium Neonatal Diarrhea. *Vet. Infect. Dis. Organ.*, Saskatoon, SK, Canada, 346, in proceeding.
- Gitlin, D., Kumate, J., Urrusti, J., Morales, C., 1964. The selectivity of the human placenta in the transfer of plasma proteins from mother to fetus. *J. Clin. Invest.* 43, 1938-1951.
- Godfrey, R.W., Smith, S.D., Guthrie, M.J., Stanko, R.L., Neuendorff, D.A., Randel, R.D., 1991. Physiological responses of newborn *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* calves after exposure to cold. *Journal of Animal Science* 69, 258-263.
- Goldyne, M.E., Strobo, J.D., 1982. Human monocytes synthesize eicosanoids from T lymphocytes derived from Arachidonic acid. *Prostaglandins* 24, 623-631.
- Gonzalo, C., Vijil, E., Rodríguez, M., Fuentes, F.C., 1988. Contenido y tipos celulares del calostro ovino y su evolución en el tránsito de calostro a leche. *ITEA* 76, 15-25.
- Goyena, M., Ortiz, J.M., Alonso, F.D., 1997. Influence of different systems of feeding in the appearance of cryptosporidiosis in goat kids. *Journal Parasitology* 83(6), 1185-1186.
- Greenwood, P.L., 1993. Rearing systems for dairy goats. *Small Ruminant Research* 10, 189-199.
- Greenwood, P.L., North, R.N., Kirkland, P.D., 1995. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goats herds in New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 72(9), 341-345.

- Gross, S.S., Wolin, M.S., 1995. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 737-769.
- Guerrault, P., 1990. Apport de colostrum: plusieurs methodes. *La Chevre* 180, 30-31.
- Ha, W.K., Lim, J.W., Choi, C.K., 1986. A study on the immunoglobulin G concentration in milk and blood serum of Korean native goats. I. Changes of IgG concentration on the lactation period of Korean native goats. *Korean Journal of Animal Sciences* 28(10), 679-683.
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W., 1987. Anticarcinogens from Fried Ground beef: Heath-altered derivatives of Linoleic acid. *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.
- Ha, Y.L., Srokson, J., Pariza, M.W., 1990. Inhibition of benzopyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of Linoleic acid. *Cancer Research* 50, 1097-1101.
- Halliday, R., 1958. The absorption of antibody from immune sera and from mixtures of sera by the gut of the young rat. *Proc. R. Soc. Ser. B.* 148, 92-103.
- Halliday, R., 1959. The effect of steroid hormones on the absorption of antibody by the young rat. *J. Endocrinology* 18, 56-66.
- Halliday, R., 1971. Total protein and immunoglobulin concentrations in sera from 2-day-old Finnish Landrace x Dorset Horn Lambs. *Journal of Agricultural Science* 77, 209-211.
- Halliday, R., 1976. Variations in immunoglobulin concentration in Finnish x Dorset Horn lambs. *Research Veterinary Science* 21, 331-334.
- Halliday, R., 1978. Variation in immunoglobulin transfer from ewes to lambs. *Annales de Recherches Veterinaires* 9(2), 367-374.
- Hamadeh, S.K., Hatfield, P.G., Kott, R.W., Sowell, B.F., Robinson, B.L., Roth, N.J., 2000. Effects of breed, sex, birth type and colostrum intake on cold tolerance in newborn lambs. *Sheep and Goat Research Journal* 16(2), 46-51.

- Hayek, M.G., Han, S.N., Wu, D., Watkins, B.A., Meydani, M., Dorsey, J.L., Smith, D.E., Meydani, S.N., 1999. Dietary conjugated Linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *Journal of nutrition* 129, 32-38.
- Heath, S.E., 1985. Feeding bovine colostrum to lambs. *Veterinary Record* 116(24), 647.
- Hensler, T., Hecker, H., Heeg, K., Heidecke, C.L., Bartels, H., Barthlen, W., Wagner, H., Siewert, J.R., Holzmann, B., 1997. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect. Immun.* 65, 2283-2291.
- Hoerlein, A.B., Jones, D.L., 1977. Bovine immunoglobulins following induced parturition. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170(3), 325-326.
- Hough, R.L., McCarthy, F.D., Kent, H.D., Eversole, D.E., Wahlberg, M.L., 1990. Influence of nutritional restriction during late gestation on production measures and passive immunity in beef cattle. *Journal of Animal Science* 68, 2622-2627.
- Hunter, A.G., Reneau, J.K., Williams, J.B., 1977. Factors affecting IgG concentration in day old lambs. *Journal of Animal Science* 45, 1146-1151.
- Iadecola, C., 1997. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neuroscience* 20, 132-139.
- Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., Pariza, M.W., 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of Linoleic acid. *Cancer Research* 51, 6118-6124.
- Ip, C., Singh, M., Thompson, H.J., Scimeca, J.A., 1994. Conjugated Linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research* 54, 1212-1215.

- Jahreis, G., Fritsche, J., Kraft, J., 1999. Species-dependent, seasonal and dietary variation of conjugated Linoleic acid in milk. In *Advances in conjugated Linoleic acid Research, Volume 1.* (Yurawecz et al. Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 215-225.
- James, R.E., Polan, C.E., Cummins, K.A., 1981. Influence of administered indigenous microorganisms on uptake of I<sup>125</sup>  $\gamma$ -globulin in vivo by intestinal segments of neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 64, 52-61.
- Jeffcott, L.B., 1971. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly-born foal. *Veterinary Record* 88, 340-341.
- Jochims, K., Kaup, F.J., Drommer, W., Pickel, M., 1994. An immunoelectron microscopic investigation of colostral IgG absorption across the intestins of newborn calves. *Research in Veterinary Science* 57, 75-80.
- Kehoe, J.M., 1971. Subclass of bovine IgG. *Journal of Dairy Science* 54, 1317.
- Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J., Tove, S.B., 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of Linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241, 1350-1354.
- Kiddy, C.A., McCann, R., Maxwell, C., Rock, C., Pierce, C., Butler, J.E., 1971. Changes in levels of immunoglobulin in serum and other body fluid immediately before and after parturition. *Journal of Dairy Science* 54, 1325-1329.
- Klaus, G.G.B., Bennett, A., Jones, E.W., 1969. A quantitative study of the transfer of colostral immunoglobulins to the newborn calf. *Immunology* 16, 293-299.
- Klobasa, F., Goel, M.C., Werhahn, E., 1998. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. *Journal of Animal Science* 76, 923-926.

- Klopper, P.H., Adams, D.K., Klopper, M.S., 1964. Maternal "imprinting" in goats. *Zoology* 52, 911-914.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E., Aromaa, A., 1996. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br. J. Cancer* 73, 687-691.
- Krahenbuhl, J.P., Campiche, M.A., 1969. Early stages of intestinal absorption of specific antibodies in the newborn. *Journal of Cellulary Biology* 42, 345-365.
- Kramer, J.K.G., Parodi, P.W., Jensen, R.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Adlof, R.O., 1998. Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated Linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids* 33, 835.
- Kruse, V., 1970. Absorption of immunoglobulin from colostrum in newborn calves. *Animal Production* 12, 627-638.
- Labadía, A., Tovar, J., 1996. Parto y lactación. En: Buxadé, C. (Ed.). *Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo II. Reproducción y alimentación.* Mundiprensa. Madrid 63-79.
- Lacasse, P., Farr, V.C., Davis, S.R., Prosser, C.G., 1996. Local secretion of nitric and the control of mammary blood flow. *Journal of Dairy Science* 79(8), 1369-1374.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A., 1996. Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring. *American Journal of Veterinary Research* 57(12), 1776-1780.
- Lampert, L.M., 1975. *Modern dairy products.* Food trade Press, USA, third edition, 44-47.
- Lancaster, J.R., 1997. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1, 18-30.

- Larson, R.E., Ward, A.C.S., Frederiksen, K.R., Ardrey, W.B., Frank, F.W., 1974. Capability of lambs to absorb immunoproteins from freeze-dried bovine colostrum. *American Journal of Veterinary Research* 35(8), 1061-1063.
- Lascelles, A.K., Beh, K.J., Husband, A.K., 1980. Origin of antibody in mammary secretion with particular reference to the IgA system. *Advance Experimental Medical Biology* 137, 493-511.
- Laskowski, M., Laskowski, M., 1951. Crystalline trypsin inhibitor from colostrum. *J. biol. Chem.* 190, 563-573.
- Lecce, J.G., Morgan, D.O., 1962. Effect of dietary regimen on cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in the neonatal pig and lamb. *J. Nutr.* 78, 263-268.
- Lechner, F., Schütte, A., Von Bodungen, U., Bertoni, G., Pfister, H., Jungi, T.W., Peterhans, E., 1999. Inducible nitric oxide synthase is expressed in joints of goats in the late stage of infection with caprine arthritis encephalitis virus. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 70-75.
- Lee, C.S., Outteridge, P.M., 1981. Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte sub-populations. *Journal of Dairy Research* 48, 225-237.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W., 1994. Conjugated Linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108, 19-25.
- Levieux, D., 1984. Transmission de l'immunité passive colostrale: le point des connaissances, in: Jarrigue R. (Ed.), *Physiologie et pathologie périnatales chez les animaux de ferme*, INRA Paris, 345-369.
- Levieux, D., Morgan, F., Geneix, N., Masle, I., Bouvier, F., 2002. Caprine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research* 69(3), 391-399.

- Logan, E.F., 1977. The influence of husbandry on colostrum yield and immunoglobulin concentration in beef cows. *British Veterinary Journal* 133, 120-125.
- Logan, E.F., Penhale, W.J., Jones, R.A., 1972. Changes in the serum immunoglobulin levels of colostrum-fed. *Research in Veterinary Science* 14, 394-397.
- Logan, E.F., Pearson, G.R., 1978. The distribution of immunoglobulins in the intestine of the neonatal calf. *Annales de Recherches Veterinaires* 9(2), 319-326.
- Logan, E.F., Foster, W.H., Irwin, D., 1978a. A note on bovine colostrum as an alternative source of immunoglobulin for lambs. *Animal Production* 26(1), 93-96.
- Logan, E.F., McMurray, C.H., O'Neill, D.G., McParland, P.J., McRory, F.J., 1978b. Absorption of colostrum immunoglobulins by the neonatal calf. *British Veterinary Journal* 134(3), 258-262.
- Logan, E.F., Pearson, G.R., Acres, S.D., 1979. Colostral immunoglobulins in the small intestine of neonatal calves. *Proceeding, Second International Symposium on Neonatal Diarrhea, October, 3-5, University of Saskatchewan* 475-486.
- Logan, E.F., Mensely, D.J., Lindsay, A., 1981a. Colostrum and serum immunoglobulin levels in Jersey cattle. *Brit. Vet. J.* 137, 279-282.
- Logan, E.F., Muskett, B.D., Herron, R.J., 1981b. Colostrum feeding of dairy calves. *Veterinary Record* 108, 283-284.
- Losonczy, S., Pethes, G., Frenyo, V.L., Antal, T., Szabo, I., 1979. Quick physiological test to control optimal colostrum uptake by calves in large scale management. I. Pre- and postcolostral serum IgG concentration of calves. *Magyar Allatorvosok Lapja* 34, 371-375.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235.

- Martin, J.C., Valeille, K., 2002. Conjugated Linoleic acid: All the same or to everyone its own function?. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 525-536.
- Martín, N., 1998. Características químicas, físicas y nutricionales del calostro de la Agrupación Caprina Canaria. Trabajo fin carrera, Centro superior de Ciencias Agrarias, Universidad de La Laguna, España.
- Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., Kacskovics, I., 2002a. Redidtribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* 107(3), 288-296.
- Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., Kacskovics, I., Fossum, C., Wattrang, E., 2002b. Localization of the sheep FcRn in the mammary gland. 6<sup>th</sup> International Veterinary Immunology Symposium, Ultuna Campus, Swedish University of Agricultural Science, Upsala, Sweden, 87(3-4), 327-330.
- Mazzone, M.M., Holcombe, D.W., Ackerman, C.J., Balok, C.E., Mendoza-Reyes, A., Halford, D.M., 1999. Effect of short-term protein supplementation on clostrum characteristics and immunoglobulin G concentration in colostrum and ewe and lamb serum. *Sheep and Goat Research Journal* 15(2), 64-72.
- Mbuthia, E.W., Klobasa, F., Gachuiru, C.K., Abate, A., 1997. Effect of treatment with formaldehyde and formic acid on immunoglobulin content of stored bovine colostrum. *Animal Feed Science and Technology* 67, 291-298.
- McCarthy, E.F., McDougall, E.I., 1953. Absorption of immune globulin by the young lamb after ingestion of colostrum. *Biochem. J.* 55, 177-182.

- McEwan, A.D., Fisher, E.W., Selman, I.E., 1970a. An estimation of the efficiency of the absorption of immune globulins from colostrum by newborn calves. *Research Veterinary Science* 11, 239-243.
- McEwan, A.D., Fisher, E.W., Selman, I.E., 1970b. A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clin. Chim. Acta* 27, 155-163.
- McGuire, M.A., McGuire, M.K., McGuire, M.S., Grilnari, J.M., 1997. Bovinic acid: The natural CLA. Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for feed manufactures, Rochester, New York, Cornell University, USA, 217-226.
- McGuire, T.C., Pfeiffer, N.E., Weikel, J.M., Bartsch, R.C., 1976. Failure of colostral immunoglobulin transfer in calves dying from infectious disease. *Journal of American Veterinary Medical Association* 169, 713-718.
- Meckenzie, H.A., 1970. Milk protein. Academic Press, New York, USA, Vol.I 45-123.
- Meiron, R., Cohen, R., Barnea, A., Ratner, D., Trainin, Z., 1977. Immunoglobulin levels in colostrum and milk dairy cattle. *Refu. Vet.* 34,51.
- Michanek, P., Ventorp, M., Weström, B., 1989a. Intestinal transmission of colostral antibodies in newborn dairy calves-initiation of closure by feeding colostrum. *Sw. J. Agric. Res.* 19, 125-127.
- Michanek, P., Ventorp, M., Weström, B., 1989b. Intestinal transmission of macromolecules in newborn dairy calves of different ages at first feeding. *Res. Vet. Sci.* 46, 375-379.
- Michanek, P., Ventorp, M., Weström, B., 1990. Milk intake before first colostrum in newborn dairy calves. Effect on intestinal transmission of macromolecules. *Journal of Dairy Science* 73, 480-483.
- Micusan, V.V., Borduas, A.G., 1977. Biological properties of goat immunoglobulins G. *Immunology* 32(4), 373-381.

- Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W., Cook, M.E., 1994. Feeding conjugated Linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 1107-1112.
- Molina, J.M., Rodríguez-Ponce, E., Ferrer, O., Gutiérrez, A.C., Hernández, S., 1994. Biopathological data of goat kids with cryptosporidiosis. *Veterinary Record* 135, 67-68.
- Möllerberg, L., Ekman, L., Jacobsson, S.O., 1975. Plasma and blood volume in the calf from birth till 90 days of age. *Acta Vet. Scand.* 16, 178-185.
- Morand-Fehr, P., 1984. Influence of environment on mortality of kids. *Colloq. Instit. Natl. Rech. Agron.* 28, 31-46.
- Morand-Fehr, P., 1989. Management programs for the prevention of kid losses. *Curso de producción caprina. Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza*, 405-423.
- Morris, S.M., Billiar, T.R., 1994. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.* 266, E829-E839.
- Muller, L.D., Ellinger, D.K., 1979. Colostral and serum immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 62, 232.
- Muller, L.D., Ellinger, D.K., 1981. Colostral immunoglobulin concentration among breeds of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 64(8), 1727-1730.
- Muller, S., McCutcheon, S.N., 1991. Comparative aspects of resistance to body cooling in newborn lambs and kids. *Animal Production* 52, 301-309.
- Murphy, M.P., 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 401-414.
- Nandakumar, P., Rajagopalaraja, C.A., 1983. Growth and mortality in relation to serum immunoglobulin level in neonatal kids. *Kerala Journal of Veterinary Science* 14, 49-52.

- Napolitano, F., Marino, V., De Rosa, G., Capparelli, R., Bordi, A., 1995. Influence of artificial rearing on behavioral and immune response of lambs. *Applied Animal Behaviour Science* 45, 245-253.
- Neubauer, H.P., Schöne, H.H., 1979. Transfer of insulin-binding antibodies from nanny goats to kids. *American Journal Veterinary Research* 7(40), 962-965.
- Newstead, D.F., 1976. Carotene and immunoglobulin concentrations in the colostrum and milk of pasture-fed cows. *Journal of Dairy Science* 43(2), 229-237.
- Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., Huyh, P.J., 1997. Dietary conjugated Linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22, 266-277.
- Nightengale, G.T., 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves II, the rate of absorption. *Journal of Dairy Science* 62, 1766-1773.
- Nightengale, G.T., Stott, G.H., 1981. Adrenal response of the newborn calf to acute inanition and colostrum feeding. *Journal of Dairy Science* 64(2), 236-240.
- Nocek, J.E., Braund, D.G., Warner, R.G., 1984. Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin, and continued feeding of colostrum on calf gain, health and serum protein. *Journal of Dairy Science* 67, 319-333.
- Nord, K., Loken, T., Orten, A., 1998. Control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in three Norwegian goat herds. *Small Ruminant Research* 28, 109-114.
- Nowak, R., Poindron, P., Putu, I.G., 1990. Development of mother discrimination by single and multiple newborn lambs. *Dev. Psychobiol.* 22, 833-845.
- O'Brien, J.P., Sherman, D.M., 1993. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. *Small Ruminant Research* 11, 71-77.

- O'Doherty, J.V., Crosby, T.F., 1996. The effect of diet in late pregnancy on progesterone concentration and colostrum yield in ewes. *Theriogenology* 46, 233-241.
- O'Doherty, J.V., Maher, P.F., Crosby, T.F., 1997. The performance of pregnant ewes and their progeny when offered grass silage, maize silage or a maize silage/ensiled super pressed pulp mixture during late pregnancy. *Livestock Production Science* 52, 11-19.
- Odde, K.G., 1986. Neonatal calf survival. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 4, 501-508.
- Orsel, K., Amerongen, J.J., Zadoks, R.N., Doorn, D.C.K., Wensing, T., van Amerongen, J.J., van Doorn, D.C.K., 2000. Serum gamma-globulin concentration in goat kids after colostrum administration: effect of time of administration, and amount and type of colostrum. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 125, 709-712.
- Osame, S., Ichijo, S., Ohta, C., Watanabe, T., Benkele, W., Goto, H., 1991. Efficacy of colostrum immunoglobulins for therapeutic and preventive treatments of calf diarrhea. *Journal of Veterinary Medical Science* 53(1), 87-91.
- Outteridge, P.M., Lee, C.S., 1981. Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. In: *The Ruminant Immune System*. Ed. J.E. Butler. Plenum Publishing Corporation. USA., 513-534.
- Oyeniya, O.O., Hunter, A.G., 1978. Colostral constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. *Journal of Dairy Science* 61(1), 44-48.
- Pahud, J.J., Mach, J.P., 1970. Identification of secretory IgA, free secretory piece and serum IgA in the ovine and caprine species. *Immunochemistry* 7, 679-686.
- Pariza, M.W., 1991. A new cancer inhibitor in dairy products. *Bull. Int. Dairy Fed.* 257, 29-30.

- Pariza, M.W., 1997. Conjugated Linoleic acid, a newly recognized nutrient. *Chem. Ind.* 12, 464-466.
- Pariza, M.W., 1999. The biological activities of Conjugated Linoleic acid. In *Advances in conjugated Linoleic acid Research, Volume 1.* (Yurawecz et al. Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 12-20.
- Park, Y., Albright, K.J., Storkson, J.M., Cook, M.E., Pariza, M.W., 1997. Effect of conjugated Linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32, 853-858.
- Parmely, M.J., Beer, A.E., 1977. Colostral cell mediated immunity and the concept of a common secretory immune system. *Journal of Dairy Science* 60, 655-665.
- Parodi, P.W., 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *Journal of Dairy Science* 60, 1550-1553.
- Pattinson, S., Davies, D.A.R., Winter, A.C., 1991. Colostrum production by prolific ewes. *Animal Production* 52, 583.
- Payne, L.C., Marsh, C.L., 1962. Gamma globulin absorption in the baby pig: the nonselective absorption of heterologous globulins and factors influencing absorption time. *J. Nutr.* 76, 151-158.
- Peretz, G., 1992. Caprine arthritis-encephalitis control in France. *Veterinary Record* 131(21), 495-496.
- Perrin, G., Polack, B., Guerraud, J.M., Petet, M., 1995. Haemolytic anaemia in young goats given bovine colostrum. *Summa* 12(6), 71-72.
- Petrie, L., 1984. Maximising the absorption of colostral immunoglobulins in the newborn dairy calf. *Veterinary Record* 114(7), 157-163.
- Pierce, A.E., 1955. Electrophoretic and immunological studies on sera from calves from birth to weaning. *J. Hyg.* 53, 247-260.
- Pierce, A.E., 1961. Further studies on proteinuria in the new-born calf. *J. Physiol. London*, 156, 136-149.

- Quigley III, J.D., Martin, K.R., Dowlen, H.H., Lamar, K.C., 1995. Addition of soybean trypsin inhibitor to bovine colostrum: Effects on serum immunoglobulin concentrations in Jersey calves. *Journal of Dairy Science* 78, 886-892.
- Quigley III, J.D., Welborn, M.G., 1996. Influence of injectable immunoglobulin on serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. *Journal of Dairy Science* 79, 2032-2037.
- Quigley III, J.D., Dewdry, J.J., 1998. Symposium: practical considerations of transition cow and calf management. *Journal of Dairy Science* 81, 2779-2790.
- Quigley III, J.D., Dewdry, J.J., Martin, K.R., 1998. Estimation of plasma volume in Holstein and Jersey calves. *Journal of Dairy Science* 81, 1308-1312.
- Rabbani, S., Irfan, M., Muhammad, K., Ahmed, Z.Q., 1990. Studies on the transfer of maternal immunoglobulins in kids. *Archiva Veterinaria Bucuresti* 19, 53-59.
- Rajala, P., Castrén, H., 1995. Serum immunoglobulin concentrations and health of dairy calves in two management systems from birth to 12 weeks of age. *Journal of Dairy Science* 78, 2737-2744.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., Sotillo, F., Ramírez, M.C., 1996. Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of postpartum separation. *Small Ruminant Research* 23, 75-81.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., 1998. Comportamiento de los cabritos de raza Murciano-Granadina en su primera hora de vida. *Archivos de Zootecnia* 47, 639-647.
- Rowan, K.J., Englebright, R.K., Djajanegara, A., Sukmawati, A., 1994. Effect of colostrum consumption and the level of environmental pathogen load on the health and growth of kids from birth to weaning. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress* 2, 29-30.

- Roy, J.H.B., 1990. The Calf. 5<sup>a</sup> Edi., Vol.1 Management of Health. Butterworths, 258 pp.
- Sanz, M.R., Lara, L., Gil, F., Boza, J., 1995. Energy utilization for maintenance and growth in preruminant kid goats and lambs. *Small Ruminant Research* 17, 25-30.
- Sawyer, M., Willadsen, C.H., Osburn, B.I., McGuire, T.C., 1977. Passive transfer of colostral immunoglobulins from ewe to lamb and its influence on neonatal lamb mortality. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 171(12), 1255-1259.
- Schmidt, H.H.H.W., Smith, R.M., Nakane, M., Murad, F., 1992. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent NO synthase type 1: A biopteroflavoprotein with Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. *Biochem.* 31, 3243-3249.
- Shearer, J., Mohammed, H.O., Breneman, J.S., Tran, T.Q., 1992. Factors associated with concentrations of immunoglobulins in colostrum at the first milking postcalving. *Preventive Veterinary Medicine* 1-2(14), 143-154.
- Sherman, D.M., Arendt, T.D., Gay, J.M., Maefsky, V.A., 1990. Comparing the effects of four colostral preparations on serum Ig levels of newborn kids. *Veterinary Medicine* 85, 908-913.
- Sibalin, M., Björkman, N., 1966. On the fine structure and absorptive function of the porcine jejunal villi during the early suckling period. *Expl. Cell. Res.* 44, 165-174.
- Sisk, M., azain, M.J., Hausman, D.B., Jewel, D.E., 1998. Effect of conjugated Linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague-Dawley and Zucker rats. *FASEB J.* 12, A536.
- Smith, V.R., Larson, B.L., 1975. Nutrition and biochemistry of milk/Maintenance. In *Lactation Academic Press New York, USA*, Vol. III, 237-280.
- Smith, W.D., Dawson, A.McL., Wells, P.W., Burrells, C., 1975. Research in *Veterinary Science* 19, 189-194.

- Soares-Filho, P.M., Belem, P.A.D., Ribeiro-Junior, J.I., Salcedo, J.H.P., Oliveira, M.G., de A-Oliveira, M.G., 2002. Trypsin inhibitor and lactoferrin colostral levels in Holstein-zebu crossbred dairy cows. *Veterinaria noticias* 8(1), 83-89.
- Solanes, D., Such, X., Caja, G., 1995. Efecto de la utilización de un calostro concentrado comercial sobre el crecimiento y la supervivencia de corderos inmunodeprimidos. *ITEA Volumen Extra(16)*, 735-737.
- Staley, T.E., Bush, L.J., 1985. Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to Ig absorption and disease. *Journal of Dairy Science* 68, 184-205.
- Stott, G.H., 1980. Immunoglobulin absorption in calf neonates with special considerations of stress. *Journal of Dairy Science* 63(4), 681-688.
- Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E., Nightengale, G.T., 1979a. Colostral immunoglobulin transfer in calves II. The rate of absorption. *Journal of Dairy Science* 62, 1766-1773.
- Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E., Nightengale, G.T., 1979b. Colostral immunoglobulin transfer in calves III. The amount of absorption. *Journal of Dairy Science* 62, 1902-1907.
- Stott, G.H., Fleenor, W.A., Kleese, W.C., 1981. Colostral immunoglobulin concentration in two fractions of first milking postpartum and five additional milkings. *Journal of Dairy Science* 64(3), 459-465.
- Stott, G.H., Fellah, A., 1983. Colostral immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves. *Journal of Dairy Science* 66(6), 1319-1328.
- Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M., Yamada, K., 1998. Conjugated Linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulin in rats. *Lipids* 33, 521-527.

- Sugano, M., Yamasaki, M., Yamada, K., Huang, Y.S., 1999. Effect of conjugated Linoleic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and immune function. In *Advances in conjugated Linoleic acid Research*, Volume 1. (Yurawecz et al. Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 327-339.
- Tennant, B., Harrold, M., Reina-Guerra, M., Laben, C., 1969. Neonatal alteration in serum gamma globulin levels of Jersey and Holstein-Freisan calves. *American Journal Veterinary Research* 30, 345-354.
- Tizard, I., 1992. *Inmunología Veterinaria*, 4ª Ed. Interamericana McGraw-Hill. Mexico D.F., 558 pp.
- Ubertalle, A., Ladetto, G., Cauvin, E., Mazzocco, P., 1987. Colostro caprino: Caratteristiche del latte ottenuto nelle prime 24 ore post partum. *Summa* 4(4), 239-242.
- Vann, R.C., Holloway, J.W., Carstens, G.E., Boyd, M.E., Randel, R.D., 1995. Influence of calf genotype on colostral immunoglobulins in *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and serum immunoglobulins in their calves. *Journal of Animal Science* 73, 3044-3050.
- Vermorel, M., Dardillt, C., Vernet, J., Saïdo, S., Demigne, C., 1983. Energy metabolism and thermo regulation in the newborn calf. *Annales de Recherches Veterinaires* 14, 382-389.
- Vihan, V.S., 1988. Immunoglobulin levels and their effect on neonatal survival in sheep and goats. *Small Ruminant Research* 1, 135-144.
- Vihan, V.S., 1993. Use of *Escherichia coli* vaccine for passive protection against neonatal colibacillosis in goats. *Small Ruminant Research* 11, 179-185.
- Vijil, E., Gonzalo, C., Hurtado, E., Ruiz-Poveda, J., Ciudad, C., Prieto M.F., 1986. Evolución y características del calostro ovino (razas Manchega, Churra y Karakul). I. Variación de la composición química. *Revista Española de Lechería* 5, 9-19.
- Virella, G., Nunes, M.A.S., Tamagnini, G., 1972. Placental transfer of human IgG subclasses. *Clin. Exp. Immun.* 10, 475-478.

- Warren, J.M., Simon, V.A., Bartolini, G., Erickson, K.L., Mackey, B.E., Kelley, D.S., 2003. *Trans-10,cis-12* CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: Possible roles of specific lipid metabolism genes. *Lipids* 38, 497-504.
- Wereme, A., Strabel, M., Grongnet, J.F., Piot, M., 2001. Immunoglobulin G absorption from pooled maternal colostrum, commercial powder and freeze-dried colostrum by newborn calves. *Animal Research* 50, 315-323.
- Winter, A.C., 1990. Colostrum needs of lambs. *Veterinary Record* 554-555.
- Winter, A.C., Clarkson, M.J., 1992. Farm investigations of anaemia in lambs caused by feeding cow colostrum. *Veterinary Record* 131(10), 213-216.
- Yoffey, J.M., Courtice, F.C., 1970. *Lymphatics lymph and the lymphomyeloid complex*. Academic Press, London, 213 pp.
- Zadoks, R.N., Orsel, K., Verwer, C., Winter, A., Amerongen, J.J., Wensing, T., de Winter, A., van Amerongen, J.J., 2001. Serum gammaglobulin titre in goat kids after colostrum administration: effect of commercial colostrum replacers. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 126, 646-650.

**CAPÍTULO I.- USO DE CALOSTROS ALTERNATIVOS EN GANADO  
CAPRINO**

## Resumen

Para la realización del presente estudio se diseñaron cuatro experimentos diferentes. En el primero de ellos se utilizaron 45 cabritos de raza Majorera que fueron agrupados en tres lotes según el tipo de calostro que recibían (refrigerado, congelado o comercial). Tanto el calostro refrigerado como el congelado fueron proporcionados en dos tomas diarias durante dos días, recibiendo cada cabrito un volumen igual al 5% de su peso al nacimiento en cada toma. Ambos calostros (refrigerado y congelado) tenían la misma concentración de IgG. El calostro comercial fue proporcionado siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se tomaron muestras de sangre, desde el nacimiento hasta las 84 horas postparto, cada 12 horas y a continuación a los 15 y 30 días de vida. El pico de IgG fue detectado a las 24 horas en los cabritos encalostrados con calostro caprino congelado (25,47 mg/ml) y a las 36 horas para los que ingirieron calostro caprino refrigerado (15,84 mg/ml), mientras que los animales encalostrados con calostro comercial ovino mostraron la mayor concentración de IgG a los 30 días de vida (0,84 mg/ml).

Para el segundo experimento se utilizaron 40 cabritos que fueron divididos en dos lotes: uno de ellos (GL) recibió calostro liofilizado, 16,84 mg/ml IgG y el otro (GF) calostro congelado, 61,041 mg/ml IgG. Todos los cabritos recibieron la misma cantidad de IgG (3368 mg/kg de peso nacimiento) y el manejo seguido durante el encalostrado fue idéntico en ambos grupos. Se tomaron muestras de sangre desde el nacimiento hasta las 120 horas de vida cada 12 horas. La concentración de IgG del suero sanguíneo de los cabritos del lote GL fue estadísticamente mayor.

En el tercer experimento participaron 60 cabritos que fueron agrupados en tres lotes, cuyos individuos recibieron calostro liofilizado. Las cantidades de IgG aportadas fueron 3368, 1684 y 842 mg de IgG por Kg

de peso nacimiento en cuatro tomas durante dos días (lotes GLA, GLM y GLB respectivamente). Se tomaron muestras de sangre desde el nacimiento hasta las 120 horas de vida cada 12 horas. La concentración de IgG en el suero sanguíneo del lote GLA fue estadísticamente mayor que la de los otros dos lotes y no se observaron diferencias estadísticas en la cantidad de IgG del suero sanguíneo entre los lotes GLM y GLB.

Para el cuarto experimento se utilizaron 80 cabritos que fueron divididos en cuatro lotes y todos los animales recibieron calostro liofilizado. Dos de los lotes (GLA-1D y GLA-2D) recibieron 1684 mg de IgG por kg de peso nacimiento y los otros dos lotes (GLB-1D y GLB-2D) recibieron 842 mg de IgG por kg de peso nacimiento. Los grupos GLA-1D y GLB-1D recibieron dos tomas de calostro en un día y los otros dos lotes, GLA-2D y GLB-2D, recibieron cuatro tomas de calostro en dos días. Se tomaron muestras de sangre desde el nacimiento hasta las 120 horas de vida cada 12 horas. Los cabritos del lote GLA-1D presentaron una concentración de IgG en su suero sanguíneo estadísticamente mayor que los del lote GLA-2D y no se observaron diferencias estadísticas en la concentración de IgG entre los grupos GLB-1D y GLB-2D.

## Summary

Four different experiments were designed for this study. In the first of these 45 Majorera kids were allotted in three groups according to the type of colostrum fed. The refrigerated and frozen goat colostrum were administered twice daily for 2 days, each kid receiving 5% of the body weight per feed. Both refrigerated and frozen colostrum had the same IgG concentration before refrigerating or freezing. The commercial colostrum was administered according to the recommendations of the manufacturer. Blood samples were taken every 12 hours from birth to 84 hours postpartum and two additional samples were taken at 15 and 30 days of age. The peak IgG was at 24 hours with frozen goat colostrum fed kids (25.47 mg/ml), 36 hours for kids fed with refrigerated goat colostrum (15.84 mg/ml) while those fed commercial sheep colostrum peaked at 30 days (0.84 mg/ml).

In the second experiment 40 kids were allotted in two groups, a lyophilized colostrum group (LG) and a frozen colostrum group (FG). The kids (n=40) received the same management and IgG mass (3368 mg per kg of body weight-BW) during the colostrum feeding period. Blood samples were taken every twelve hours from the time of birth to 120 hours postpartum. The IgG blood serum from LG kids was statistically higher.

In the third experiment 60 kids were allotted into three groups, the kids (n=60) all receiving lyophilized colostrum. Three groups of animals received 3368, 1684 and 842 mg of IgG per kg of BW in 4 feeds during 2 days (H-IgG, M-IgG and L-IgG, respectively). Blood samples were taken every twelve hours from the time of birth to 120 hours postpartum. IgG blood serum in the H-IgG group was statistically higher than other two groups and no statistical differences were found for IgG blood serum between M-IgG and L-IgG kids.

In the fourth experiment 80 kids were allotted into four groups, and the kids (n=80) received lyophilized colostrum. Two groups received 1684 mg of IgG per kg of BW (HL-1D and HL-2D), and the other two received 842 mg of IgG per kg of BW (LL-1D and LL-2D). Two groups received two feeds in one day (HL-1D and LL-1D) and the other two groups received four feeds in two days (HL-2D and LL-2D). Blood samples were taken every twelve hours from birth to 120 hours postpartum. HL-1D kids presented statistically higher IgG blood serum concentration than HL-2D kids and no statistical differences were found between LL-1D and LL-2D kids.

## INTRODUCCIÓN

## 1.- Introducción

En los rumiantes las características tisulares de la placenta impiden la transferencia de inmunoglobulinas desde la madre al feto (Brambell, 1970). Por ello en estas especies las inmunoglobulinas proporcionadas con el calostro juegan un papel fundamental en la adquisición de inmunidad pasiva de las crías. En este sentido Abel Francisco y Quigley III (1993), empleando como técnica de cuantificación la inmunodifusión radial, encontraron que las concentraciones de inmunoglobulinas en el suero de terneros, antes de consumir calostro, estaban por debajo de los niveles de detección de la técnica (menor que 0,11-0,12 mg/ml de IgG). Asimismo son diversos los trabajos que avalan el hecho de que los cabritos son agammaglobulinémicos al nacimiento (Constant *et al.*, 1994; Argüello, 2000). Sin embargo otros autores han encontrado pequeñas concentraciones de inmunoglobulinas en el suero en el momento del nacimiento (Guerrault, 1990; Rabbani *et al.*, 1990; Sherman *et al.*, 1990).

El uso de calostros comerciales en el manejo de terneros y corderos se encuentra en la actualidad ampliamente distribuido (Solanes *et al.*, 1995). En general se trata de productos esterilizados que proceden de calostro bovino u ovino, sin embargo, su uso como única fuente de inmunoglobulinas no ha proporcionado resultados satisfactorios. Solanes *et al.* (1995) han observado tasas de mortalidad superiores en corderos encalostrados únicamente con calostro comercial y, asimismo, Bernabé *et al.* (1998) pudieron relacionar el uso del calostro comercial con la aparición de ciertas patologías (*Klebsiella pneumoniae*).

Constant *et al.* (1994), empleando un calostro comercial, observaron que los niveles de IgG en la sangre de los cabritos no eran superiores a los hallados en animales encalostrados con la madre. Esto podría deberse a que la absorción intestinal de las macromoléculas no es selectiva para la IgG con

lo cual la albúmina, presente en la mayor parte de estos productos, compite con las inmunoglobulinas (Besser y Osborn, 1993). De la misma forma Argüello (2000) no detectó presencia de IgG a los tres días de vida de los cabritos que habían ingerido exclusivamente calostro comercial como fuente de inmunidad.

En el manejo de la lactancia artificial no se recomienda realizar el enalostrado directamente de la madre, debido a que el vínculo materno-filial se establece en las primeras horas tras el parto (Ramírez *et al.*, 1996), lo que tendría como consecuencia una peor adaptación de los cabritos a las tetinas artificiales, produciéndose posteriormente un retraso en el crecimiento de los animales. Dada la necesidad de enalostrar a los cabritos fuera del entorno de la madre, podría estar justificado el uso de calostros comerciales. En segundo lugar, proporcionar el calostro de forma artificial minimizaría o eliminaría el contagio de enfermedades como la artritis encefalitis caprina, la paratuberculosis o la micoplasmosis, que se transmiten por vía calostrual. Esto resulta de especial interés en aquellos lugares donde existe la presencia de este tipo de enfermedades (Guerrault, 1990).

En este sentido Argüello (2000) encontró que era posible proporcionar a los cabritos el calostro en biberón, utilizando cantidades restringidas del mismo y reduciendo así el tiempo empleado en esta tarea. Otros trabajos han afirmado que el calostro liofilizado es un producto estable, de fácil manejo y adecuado para la transferencia de inmunidad pasiva en terneros (Husu *et al.*, 1993; Klobasa *et al.*, 1998).

Por otra parte Dos Santos *et al.* (1994) no encontraron relación entre la concentración de IgG presente en el calostro y la concentración de la citada inmunoglobulina en el suero de los cabritos al día de vida. Chen *et al.* (1999) observaron diferencias estadísticas en la concentración de IgG del suero sanguíneo entre cabritos que habían ingerido calostro con alta (20

mg/ml) o baja (10 mg/ml) concentración de IgG. En terneros se ha detectado que es más importante la concentración de IgG presente en el calostro que la cantidad del mismo (aportando la misma cantidad total de inmunoglobulinas). Así hay autores que han observado niveles mayores de IgG en suero sanguíneo de terneros que habían tomado un litro de calostro que contenía 60 mg/ml de IgG, que en los animales que ingirieron dos litros de calostro con un contenido en IgG de 30 mg/ml (Stott y Fellah, 1983). En este sentido en cabritos de raza Majorera la cantidad de IgG consumida mostró una elevada correlación positiva con la presente en sangre, lo que ocurría especialmente dentro de las 72 primeras horas de vida de los cabritos. No obstante, la citada correlación disminuía de forma significativa a las 84 horas postnacimiento (Argüello et al., 2004b).

Es por todo lo anteriormente expuesto que los objetivos planteados en el presente capítulo son:

- 1.- Evaluar la capacidad de transmisión de inmunidad pasiva de un calostro comercial de origen ovino en comparación con el calostro caprino refrigerado y calostro caprino congelado.
- 2.- Evaluar el efecto de la liofilización del calostro sobre la transferencia de inmunidad pasiva en cabritos.
- 3.- Examinar el efecto de la cantidad de IgG presente en el calostro sobre la obtención de inmunidad pasiva de los cabritos.
- 4.- Evaluar la influencia del número de tomas y tiempo de encalostrado sobre los niveles de inmunidad pasiva adquiridos por los cabritos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 2.- Material y métodos

El presente trabajo ha sido realizado en las instalaciones de la Unidad de Producción Animal, Pastos y Forrajes del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias ubicada en el municipio de La Laguna al norte de la isla de Tenerife (España), la cual se encuentra a 28° 28' latitud Norte y 16°20' longitud Oeste y a una altura sobre el nivel del mar de 653 m.

### 2.1.- Preparación del calostro

Para la realización de las experiencias que componen este capítulo fue necesario preparar los calostros refrigerado, congelado y liofilizado que se iban a proporcionar a los cabritos. El proceso de la preparación se describe a continuación y el calostro resultante se denominó *pool*.

#### Preparación del calostro para el experimento 1 (refrigerado y congelado)

Para elaborar el *pool* con el que se iba a encalotrar a los dos lotes de animales, incluidos en el experimento, se recogieron calostros caprinos procedentes del primer ordeño tras el parto. Con ellos se elaboró un *pool* que contenía 30,69 mg/ml de IgG. La mitad de este *pool* se conservó en refrigeración (4°C) y la otra parte fue congelada (-20°C) hasta el comienzo de la experiencia.

En el momento de suministrar el calostro a los cabritos, el que estaba conservado a -20°C se descongeló a temperatura ambiente y a continuación fue atemperado (40°C) en microondas (temperatura final 55°C). El calostro refrigerado fue atemperado de la misma forma.

### Preparación del calostro para los experimentos 2, 3 y 4 (lío­filizado)

Para la elaboración de este *pool* se recogieron calostros de cabra procedentes del primer ordeño tras el parto. Cuatro litros de este *pool* fueron congelados ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y 30 litros fueron liofilizados (Figura 1) en un liofilizador Telstar Cryodos 80. La concentración de IgG del calostro congelado fue de 16,84 mg/ml mientras que el calostro liofilizado tenía una concentración de 61,041mg de IgG/g de calostro.



Figura 1.- Liofilizador procesando el calostro

Para el proceso de liofilización del calostro, el *pool* inicialmente era congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y a continuación se colocaba en el liofilizador. Tras cinco días en el mismo, el calostro liofilizado era envasado al vacío hasta el momento de su uso. Una vez nacidos los animales que formaban el grupo experimental, el calostro liofilizado era reconstituido con agua atemperada ( $40^{\circ}\text{C}$ ). El calostro congelado era descongelado a temperatura ambiente y se atemperaba en microondas ( $55^{\circ}\text{C}$  temperatura final).

## 2.2.- Animales

En las cuatro experiencias que forman parte de este capítulo participaron un total de 225 cabritos machos y hembras de raza Majorera

que fueron criados en régimen de lactancia artificial. Estos animales procedían de partos vigilados de forma que eran separados de sus madres, justo tras el nacimiento y trasladados a una sala de lactancia. Tras la limpieza y secado del animal y posterior desinfección del cordón umbilical, los cabritos fueron pesados, identificados con una cadena numerada y posteriormente asignados a un lote experimental.

### Experimento 1

Para la primera experiencia que conforma este capítulo se establecieron tres lotes de 15 cabritos cada uno (8 machos y 7 hembras), tal y como se describe a continuación:

**Lote CR:** a los cabritos se les suministró en biberón, durante dos días, calostro caprino refrigerado (4°C), previamente atemperado (40°C). Todos los animales recibían dos tomas diarias ingiriendo un volumen igual al 5% de su peso nacimiento en cada una (Argüello, 2000).

**Lote CF:** a los cabritos se les proporcionó, en biberón, calostro caprino congelado (-20°C), previamente descongelado y atemperado (40°C). Cada animal recibía dos tomas diarias durante dos días, ingiriendo en cada toma un 5% de su peso al nacimiento (Argüello, 2000).

**Lote CC:** se suministró un calostro comercial de origen ovino cuya composición estaba formada por 32,88% de humedad, 6,62% de proteína bruta, 22,50% de grasa (hidrolizada), 0,15% de celulosa, 1,34% de materias minerales, 2,76% de sacarosa, 0,94% de cenizas, 0,79% de nitrógeno total, 0,14% de calcio, 0,11% de fósforo y 0,1% de sodio (datos suministrados por el fabricante). Cada animal recibía la cantidad de calostro recomendada por el fabricante, 20 g, divididos en dos dosis (al nacimiento y a las cinco horas de vida).

## Experimento 2

Para la segunda experiencia 40 cabritos (20 machos y 20 hembras) fueron distribuidos en dos lotes. En este experimento se valoró el efecto del uso de calostro liofilizado frente a calostro congelado sobre la concentración de IgG del suero sanguíneo de los cabritos. A todos los animales se les suministró el calostro en biberón.

**Lote GL:** A este grupo se le suministró calostro caprino liofilizado repartido en dos tomas diarias durante dos días, aportándosele en cada toma el 5% del peso al nacimiento. La pasta elaborada con el calostro liofilizado, una vez reconstituido, tenía una concentración de IgG de 22,88 mg/g. Cada cabrito recibía, por toma, 36,80 g de calostro reconstituido por kg de peso al nacimiento. Como consecuencia, los animales de este grupo experimental recibieron un total de 3368 mg de IgG en la fase de enalostroado por kg de peso nacimiento.

**Lote GF:** A estos animales se les suministró 50 ml por kg de peso al nacimiento en cada toma de calostro caprino congelado (16,84 mg/ml de IgG), previamente atemperado. En total recibieron dos tomas diarias durante dos días. La cantidad de IgG proporcionada fue de 3368 mg.

## Experimento 3

La tercera experiencia se diseñó para valorar el efecto que pudiera tener la cantidad de IgG ingerida por los cabritos, durante la fase de enalostroado, sobre la concentración de IgG en el suero sanguíneo de los mismos. Para ello se establecieron tres lotes de animales con 20 cabritos (10 machos y 10 hembras) cada uno. Todos los cabritos de esta experiencia recibieron dos tomas diarias (en biberón) de calostro liofilizado durante dos días. Los tres lotes fueron:

**Lote GLA:** El calostro reconstituido que se aportó a los animales de este lote tenía una concentración de IgG de 22,88 mg/g. Cada cabrito recibía 36,80 g de calostro liofilizado por kg de peso al nacimiento en cada toma, lo cual representó 842 mg de IgG por toma. La cantidad total de IgG que recibían los animales durante los dos días que duró su encalostado fue de 3368 mg/kg de peso al nacimiento.

**Lote GLM:** El calostro liofilizado reconstituido que se empleó para este grupo de animales tenía una concentración de IgG de 11,44 mg/g, lo que supuso la mitad de la cantidad ofertada al grupo anterior. Cada cabrito de este lote recibía 36,80 g de calostro por kg de peso al nacimiento en cada toma, lo cual representaba una cantidad de IgG de 421 mg por kg de peso al nacimiento y toma. De esta forma, la cantidad total de IgG recibida por los cabritos del lote era de 1684 mg por kg de peso al nacimiento.

**Lote GLB:** Los cabritos recibían 36,80 g de calostro reconstituido por toma y kg de peso al nacimiento. La concentración de IgG del calostro reconstituido utilizado con este grupo de animales era de 5,72 mg/g. Esto representaba 210,5 mg de IgG por toma y kg de peso nacimiento. Como a los animales se les suministraron cuatro tomas, recibieron un total de 842 mg de IgG por kg de peso nacimiento a lo largo de la experiencia.

#### Experimento 4

En este experimento se utilizó calostro liofilizado para evaluar el efecto del número de tomas y del tiempo en que los cabritos recibían calostro, sobre la concentración de IgG del suero sanguíneo de los mismos. La citada valoración se realizó aportando dos niveles de IgG (alto y bajo). En este caso se trabajó con cuatro lotes de 20 cabritos cada uno (10 machos y 10 hembras).

**Lote GLA-1D:** Este grupo de animales recibió calostro con elevada cantidad de IgG un solo día, suministrándose en dos tomas. La concentración de IgG en el calostro que se proporcionaba era de 22,88 mg/g. Así, cada cabrito del lote ingirió 36,80 g de calostro liofilizado reconstituido por kg de peso al nacimiento en cada toma, lo que representaba una cantidad de IgG de 842 mg por kg de peso nacimiento y toma. Por lo tanto la cantidad total de IgG que se ofertó a los cabritos GLA-1D fue de 1684 mg por kg de peso nacimiento.

**Lote GLA-2D:** Este lote de cabritos recibió un total de 1684 mg de IgG por kg de peso al nacimiento pero durante dos días. A cada animal se le suministraban dos tomas diarias de calostro, por lo que la fase de encalostrado de los cabritos de este lote constaba de 4 tomas. La concentración de IgG del calostro reconstituido que se aportaba era de 11,44 mg/g. Cada cabrito recibió 36,80 g de este calostro por kg de peso nacimiento, lo que representaba 421 mg de IgG por toma y kg de peso nacimiento.

**Lote GLB-1D:** Este lote recibió calostro liofilizado un día repartido en dos tomas. La cantidad total de IgG aportada a los cabritos fue de 842 mg/kg peso nacimiento. La concentración del calostro reconstituido proporcionado era de 11,44 mg de IgG/g. Cada cabrito recibía 36,80 g de calostro por kg de peso al nacimiento en cada toma, lo que representa 421 mg de IgG por toma y kg de peso al nacimiento.

**Lote GLB-2D:** A este grupo se le proporcionó calostro durante dos días, suministrándose en dos tomas diarias. La concentración de IgG del calostro liofilizado reconstituido era de 5,72 mg/g. Cada animal recibía 36,80 g de calostro por kg de peso al nacimiento en cada toma, lo que representaba 210,5 mg de IgG por toma y kg de peso nacimiento. De esta

forma, la cantidad de total de IgG proporcionada a los cabritos, de este grupo experimental, fue de 842 mg por kg de peso al nacimiento.

*Tabla 1.- Manejo empleado en los experimentos 2, 3 y 4*

	Experimento 2		Experimento 3			Experimento 4			
	GF	GL	GLA	GLM	GLB	GLA-1D	GLA-2D	GLB-1D	GLB-2D
Días de encalostrado	2	2	2	2	2	1	2	1	2
Tomas por día	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tomas totales	4	4	4	4	4	2	4	2	4
mg de IgG por toma y kg de PN	842	842	842	421	210,5	842	421	421	210,5
Total de IgG ingerida (mg/kg PN)	3368	3368	3368	1684	842	1684	1684	842	842

PN.- Peso nacimiento. GF.- Grupo calostro congelado. GL.- Grupo calostro liofilizado. GLA.- Alto nivel de IgG. GLM.- Nivel medio de IgG. GLB.- Bajo nivel de IgG. GLA-1D.- Alto nivel de IgG en 1 día. GLA-2D.- Alto nivel de IgG en 2 días. GLB-1D.- Nivel bajo de IgG en 1 día. GLB-2D.- Nivel bajo de IgG en 2 días.

Una vez finalizada la fase de encalostrado, que tal y como se describe anteriormente para unos cabritos fue de dos días y para otros fue de uno solo, todos los animales fueron alimentados con lactorreemplazante (4,5% humedad, 23,6% proteína, 22,7% grasa, 0,1% fibra y 3,3% almidón) preparado al 16% p/p en una nodriza automática (Mini Robot, Divasa Farmavic, S.A.), siguiendo lo propuesto por Argüello et al. (2004a), hasta finalizar cada experiencia.

### 2.3.- Toma de muestras

Se recogieron muestras de sangre de todos los cabritos incluidos en las cuatro experiencias. Estas muestras fueron obtenidas mediante punción de la vena yugular. A continuación la sangre se centrifugó (Figura 2) a 3500

r.p.m. durante cinco minutos en una centrífuga Kubota 5100. El suero obtenido tras la centrifugación era dividido en dos partes alícuotas que se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la cuantificación de IgG caprina.

Asimismo se testó la concentración de IgG ovina presente en el calostro comercial utilizado en el experimento 1.



*Figura 2.- Muestras de sangre de los cabritos en la centrífuga*

Todas las muestras se recogían desde el momento del nacimiento con una periodicidad de 12 horas, siempre antes de la ingesta. No obstante el tiempo de muestreo varió según la experiencia.

A los animales del primer experimento (Lotes CR, CF y CC) se les recogió sangre desde el nacimiento hasta las 84 horas de vida cada 12 horas y a continuación se obtuvieron dos muestras más los días 15 y 30 de vida. Los cabritos de los restantes lotes fueron muestreados desde el nacimiento hasta las 120 horas de vida cada 12 horas.

#### **2.4.- Cuantificación de IgG**

La técnica empleada para determinar la cantidad de IgG presente en las muestras de suero ha sido la inmunodifusión radial, que es actualmente la más aceptada y utilizada para la determinación y cuantificación de

inmunoglobulinas en suero sanguíneo y leche. Existen dos protocolos: la inmunodifusión radial cronometrada (Fahey y McKelvey, 1965) y la inmunodifusión radial limitada (Mancini *et al.*, 1965). En este trabajo se ha empleado esta última ya que, además de ofrecer una mayor facilidad para la lectura de los resultados, es la técnica de referencia actualmente.

Esta técnica consiste en distribuir de forma uniforme una determinada cantidad de antiinmunoglobulina G (antiIgG) en agar que se coloca en placas de Petry. Después de solidificarse se realizan en él una serie de pocillos en los que introducen las muestras patrón y problema. A medida que las muestras van difundiendo a través del agar se va produciendo una reacción antígeno-anticuerpo (la IgG presente en las muestras se va uniendo a la antiIgG colocada en el agar). Como resultado de esta reacción se produce la precipitación de la molécula resultante y así se forma un halo circular alrededor del pocillo cuya dimensión va a depender de la estequiometría antígeno-anticuerpo.

La técnica empleada en el presente trabajo y descrita por Mancini *et al.* (1965) tiene la dificultad derivada de que el anticuerpo difundido en el agar debe estar en bajas concentraciones para que se puedan determinar pequeños niveles de antígeno. No obstante, la concentración de anticuerpo difundida en el agar debe ser lo bastante elevada como para medir niveles altos de antígeno.

Asimismo las muestras patrón deben ser de amplio rango para que puedan englobar las diversas concentraciones de las muestras a determinar.

### Preparación de los reactivos

Para la puesta en marcha de la mencionada técnica ha sido necesaria la preparación de los siguientes reactivos:

- Anti-IgG caprina

Para su preparación se siguieron las indicaciones descritas por Harlow y Lane (1988). Se inocularon 14 conejos cruzados California x Neozelandés con una solución homogeneizada que contenía 1,2 ml de IgG, a una concentración de 0,67 mg/ml, y 2 ml de adyuvante de Freund completo.

En el momento de la inoculación se rasuró el lomo de los animales y se depositó el inóculo en 10 localizaciones subcutáneas a lo largo del mismo, teniendo especial cuidado de no inocular en músculo subcutáneo o bien en pared costal (Figura 3). Asimismo se evitaba que tras la retirada de la aguja se produjese reflujo del inóculo depositado. El objetivo de esta inoculación era que los conejos creasen un suero hiperinmune frente a la IgG caprina. El adyuvante de Freund (Harlow y Lane, 1988) ha sido considerado fundamental para obtener una respuesta de estimulación fuerte y prolongada por parte de los conejos.



*Figura 3.- Inoculación de los conejos*

A las cinco semanas postinoculación, los conejos fueron sangrados mediante punción en la vena marginal de la oreja. La sangre obtenida fue centrifugada durante tres minutos a 3500 r.p.m. para controlar el grado de reacción de los conejos frente al inóculo. Si bien el resultado de esta primera inoculación fue bueno, debió realizarse una reinoculación para mejorar el antisuero producido. A diferencia de la inoculación inicial en la

reinoculación, se empleó adyuvante de Freund incompleto con el fin de evitar los efectos indeseables del mismo.

Una vez transcurridos quince días de la reinoculación los conejos fueron anestesiados y sangrados mediante punción cardíaca hasta su muerte. La sangre obtenida de los 14 animales fue centrifugada durante quince minutos a 3500 r.p.m. y el suero resultante se dividió en partes alícuotas que fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

- EDTA 0,4M (ácido etilendiaminotetraacético)

A 900 ml de agua destilada se le añadieron 152 g de EDTA (sal tetrasódica) y 148,9 g de EDTA (sal disódica). Todo esto se mezcló en un agitador magnético aportándole calor para facilitar la disolución de las sales. Una vez disuelto se llevó a un litro ajustando el pH a 7,8.

- Tampón de Glicina

Por cada litro de buffer preparado se añadieron 7,5 g de glicina a 600 ml de agua destilada colocándose en un agitador con calor para facilitar la disolución. Posteriormente se agregaron 100 ml de EDTA 0,4M. La disolución se llevó a un litro ajustando el pH a 7.

- Agarosa al 2%

Para preparar un litro de agarosa al 2% se añadieron 20 g de agarosa a 150 ml de tampón de glicina frío y posteriormente se agregaron 850 ml de dicho tampón previamente calentado. Todo esto se mezcló en un agitador con aporte de calor (sin dejar que la agarosa hirviera) hasta que se obtuvo una solución clara (casi transparente).

### Preparación de las placas

Cuando estuvo preparada la agarosa al 2% se atemperó a 55°C y en ese momento se le añadió la anti-IgG caprina (la concentración se describe en el siguiente apartado). En cada placa de Petry se vertieron 20 ml de la mezcla resultante. A continuación las placas se dejaron enfriar y, cuando se solidificó el medio, se introdujeron 24 horas en refrigeración (4°C). Transcurridas las mismas se realizaron los diez pocillos en el agar, utilizando una plantilla. Los pocillos, estaban equidistantes entre sí 2 cm de forma que se impedía la interferencia entre los halos de cada uno. Los pocillos eran identificados con un número del uno al diez por la parte posterior de la placa. Asimismo las placas también se identificaban correlativamente.

### Puesta a punto de la técnica

En la puesta a punto de la técnica se determinó la concentración de anti-IgG necesaria. Para ello se tuvieron que realizar varios ensayos. En primer lugar se diluyeron 0,8, 0,6, 0,4 y 0,2 ml de anti-IgG a 55°C en 19,2, 19,4, 19,6 y 19,8 ml de agarosa al 2% a 55°C. A continuación estas diluciones fueron vertidas en varias placas de Petry que se identificaron con la concentración resultante de anti-IgG (0,004, 0,032, 0,02 y 0,01 mg/ml de anti-IgG). Posteriormente, y tras la maduración durante 24 horas a 4°C, se realizaron los pocillos en los que se introdujeron concentraciones conocidas de IgG caprina. Tras 24 horas de incubación a 37°C la concentración de anti-IgG que mejor resultado mostró fue la de 0,032 mg/ml, apreciándose una buena definición de los halos así como una discriminación entre las diferentes concentraciones de IgG.

### Realización de la técnica

Para la cuantificación de la concentración de IgG caprina de las muestras de suero sanguíneo de los cabritos de los lotes experimentales, se prepararon las placas siguiendo las indicaciones citadas con anterioridad.

Así, en cada placa se introducían 10 microlitros de cada una de las tres muestras patrón, cuya concentración en IgG caprina era conocida (50, 25 y 1 mg/ml), y la misma cantidad de las siete muestras problema. Los patrones ocupaban siempre distintas localizaciones en las placas.

Tras la colocación de todas las muestras, las placas se incubaron durante 24 horas en una estufa a 37°C en condiciones de máxima humedad (Figura 4). Transcurrida la incubación, el diámetro de los halos formados alrededor de cada pocillo fue medido empleando un calibre. Cuando los halos no eran circulares o mostraban una morfología irregular se repetía la muestra correspondiente. Si esto sucedía con una muestra patrón la placa era desechada y se repetía por completo.



*Figura 4.- Incubación en estufa a 37°C*

Una vez medidos todos los halos, con los valores obtenidos de las muestras patrón se calculaba una recta de regresión, de forma que

extrapolando las medidas de los diámetros de las muestras problema de cada placa en la citada recta se determinaban los resultados en concentración de IgG caprina.

## 2.5.- Tratamiento estadístico

Para el análisis estadístico de la primera experiencia, el efecto del tipo de calostro utilizado, se valoró empleando un modelo lineal general mediante análisis de medidas repetidas.

En la segunda experiencia, el efecto del uso de calostro liofilizado o calostro congelado, se analizó empleando un modelo lineal general con análisis de medidas repetidas.

El efecto de la cantidad de IgG recibida por los cabritos durante el enalostroado (tercera experiencia) se analizó empleando un modelo lineal general y haciendo una prueba post-hoc Tukey.

Por último el efecto del número de tomas se evaluó empleando un modelo lineal general con análisis de medidas repetidas entre los grupos de alto nivel de IgG (GLA-1D y GLA-2D) y de bajo nivel de IgG (GLB-1D y GLB-2D).

Para todos los análisis estadísticos se empleó el Programa estadístico SPSS (v. 11.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.- Resultados y discusión

#### 3.1.- Experimento 1: Uso de calostro refrigerado, congelado y comercial

Los cabritos de los lotes estudiados en este experimento no presentaron niveles detectables de IgG en el suero sanguíneo en el momento del nacimiento (Tabla 2 y Gráfica 1), lo cual coincide con lo ya descrito por Constant et al. (1994) en ganado caprino (sin especificar el genotipo), así como con lo encontrado por Argüello (2000) en cabritos de la misma raza. Este hecho puede explicarse debido a que las características histológicas de la placenta de las hembras ruminantes impiden la transferencia de inmunoglobulinas al feto a través de ella. En contra de lo descrito anteriormente Sherman et al. (1990), empleando como método de determinación el test de turbidez del sulfato de Zinc, encontraron niveles bajos de IgG en cabritos justo tras el nacimiento.

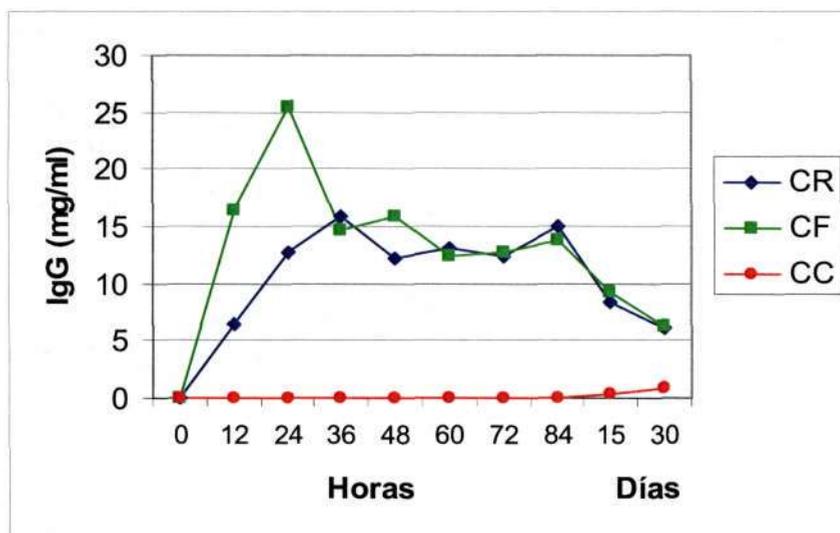
En la Tabla 2 y en la Gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos con el uso de calostro caprino refrigerado, congelado y calostro comercial. El pico de absorción de IgG se alcanzó a las 24 horas de vida en los cabritos encalostrados con el *pool* congelado ( $25,5 \pm 19,9$  mg/ml) mientras el lote de animales encalostrado con el *pool* refrigerado tuvo su máxima absorción a las 36 horas postnacimiento ( $15,8 \pm 5,9$  mg/ml).

Tabla 2.- Niveles de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de los cabritos

Tiempo	Lotes		
	CR	CF	CC
Nacimiento	ND	ND	ND
12 h	6,4±4,7	16,4±10,1	ND
24 h	12,8±4,6	25,5±19,9	ND
36 h	15,8±5,9	14,7±3,4	ND
48 h	12,2±4,7	15,8±4,9	ND
60 h	13,1±9,4	12,3±3,8	ND
72 h	12,4±5,3	12,8±3,5	ND
84 h	15,0±6,7	13,7±3,3	ND
15 días	8,3±4,6 <sup>a</sup>	9,3±3,4 <sup>a</sup>	0,4±0,4 <sup>b</sup>
30 días	6,1±2,7 <sup>a</sup>	6,2±1,5 <sup>a</sup>	0,8±0,6 <sup>b</sup>

Media±desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). CR.- Calostro refrigerado. CF.- Calostro congelado. CC. Calostro comercial. H.- horas de vida. ND.- No detectable.

Gráfica 1.- Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) del suero sanguíneo de los cabritos



CR.- Calostro refrigerado. CF.- Calostro congelado. CC.- Calostro comercial.

Por otra parte, y debido a la gran variabilidad que presentaron los resultados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres lotes en estudio (CR, CF y CC) tras las primeras 84 horas de vida de los cabritos, manifestándose éstas en las muestras tomadas a los 15 y 30 días de vida de los animales (Tabla 2 y Gráfica 1). La alta variabilidad en los niveles de inmunoglobulinas del suero sanguíneo de los cabritos coincidió con lo observado por Argüello (2000), quien trabajando con cabritos de raza Majorera había encontrado coeficientes de variación del 60, 50 y 20% en el suero sanguíneo de animales encastrados con la madre, en lactancia artificial *ad libitum* y suministrando calostro de forma restringida, respectivamente. Asimismo otros autores como Sherman et al. (1990), O'Brien y Sherman (1993) o Chen et al. (1999), han descrito coeficientes de variación similares en suero sanguíneo de cabritos encontrando porcentajes del 56, 62 y 51% respectivamente.

Los resultados observados en este trabajo, respecto al momento en que se produce el pico de absorción de IgG (24-36 horas de vida) fueron acordes con los hallados por Argüello et al. (1998) en cabritos que habían sido encastrados *ad libitum* durante tres días, fuera del ámbito de la madre. De la misma forma Logan et al. (1978) encontraron que el pico de IgG en sangre de terneros ( $21,5 \pm 2,6$  mg/ml) se producía entre las 16 y 48 horas postnacimiento, pero Ciupercescu (1977) observó la concentración más elevada de IgG<sub>1</sub> (22 mg/ml) en el suero sanguíneo de corderos Finnish x Dorset Horn a las 72 horas de vida. Este mismo autor describió como el nivel de la citada inmunoglobulina había decrecido en un 50% a lo largo de las dos primeras semanas encontrándose valores de 12 mg/ml que continuaban en descenso hasta el mes de vida (8 mg/ml).

En la presente experiencia se ha observado una evolución similar de la concentración en IgG del suero sanguíneo de los cabritos a lo largo del tiempo (Tabla 2 y Gráfica 1), apreciándose una reducción desde el pico de

absorción hasta el mes de vida del 62% en los animales del lote CR y del 72% en los del lote CF. En este sentido Lacetera et al. (1996) encontraron que la concentración de inmunoglobulinas en el plasma de terneros era mayor a las 48 horas que a los 28 días de vida. Sin embargo, estos mismos autores describieron un ligero incremento de las mismas desde los 28 a los 56 días de vida de los terneros. La reducción inicial fue considerada, por Logan et al. (1972), debida a la degradación fisiológica de las inmunoglobulinas en sangre y a que los animales aún son incapaces de producir sus propias inmunoglobulinas. El incremento posterior debe atribuirse al comienzo de la producción propia de inmunoglobulinas (Lacetera . et al., 1996).

Con respecto a los cabritos del lote CC, no se detectó presencia de IgG en suero sanguíneo en las primeras 84 horas de vida (Tabla 2 y Gráfica 1). A los quince y treinta días fue cuando comenzaron a observarse ligeros niveles de IgG en suero sanguíneo ( $0,4\pm 0,4$  y  $0,8\pm 0,6$  mg/ml, 15 y 30 días de vida respectivamente) posiblemente de producción propia. Resultados análogos han sido descritos por Argüello (2000) en cabritos de la misma raza a los que se les suministró calostro comercial. En este sentido, trabajando con terneros, Logan et al. (1972) apuntaron que la presencia de inmunoglobulinas en sangre, procedentes del calostro influía sobre el inicio de la producción endógena de las mismas. Los autores observaron que los terneros a los que se les aportaba calostro de buena calidad comenzaban la producción de inmunoglobulinas a las cuatro semanas de vida. Sin embargo aquellos animales a los que no se les proporcionaba calostro comenzaron a sintetizar sus propias inmunoglobulinas pocos días después de nacer. Así lo afirmaron Logan y Pearson (1978), quienes observaron que las placas de Peyer del intestino delgado de terneros, privados del consumo de calostro, sintetizaban inmunoglobulinas, mientras que la citada síntesis no ocurría en aquellos animales que habían ingerido calostro. Este hallazgo fue corroborado por Roy (1990) quien estableció como inicio de la síntesis endógena de

inmunoglobulinas en terneros que no habían consumido calostro los diez días de vida, aproximadamente.

Estos resultados sugieren que, en cabritos, debe estudiarse con detalle el comienzo de la producción endógena de inmunoglobulinas ya que hasta el momento sólo existen estimaciones del mismo, alrededor de los 15-30 días de vida en cabritos de raza Majorera (López *et al.*, 1999; Argüello, 2000).

Las tasas de mortalidad encontradas en el presente experimento fueron del 10, 0 y 50% en los lotes CR, CF y CC respectivamente. Como se puede observar en estos porcentajes, el lote de animales encalostrados con calostro comercial fue el que presentó un mayor número de animales muertos, lo cual fue consecuencia del fallo en la transferencia de inmunidad pasiva ya mencionada anteriormente (Tabla 2 y Gráfica 1). Esta relación entre los bajos niveles de inmunoglobulinas en sangre y la tasa de mortalidad de los cabritos, concuerda con lo descrito por otros autores. O'Brien y Sherman (1993) trabajando con cabritos French Alpine criados en Estados Unidos encontraron que los animales saludables presentaban niveles de IgG de 14,39 mg/ml frente a los 7,51 mg/ml de aquellos que morían. Dos Santos *et al.* (1994) encontraron también niveles inferiores de IgG en el suero sanguíneo de cabritos mestizos criados en Brasil que morían. La causa de esta mayor mortalidad era atribuida a la mayor susceptibilidad a las afecciones por microorganismos. Por su parte Argüello (2000) observó en cabritos de raza Majorera tasas más bajas de IgG en el suero sanguíneo de los animales que morían durante la experiencia que en la sangre de los supervivientes, llegando a ser estas diferencias estadísticamente significativas a las 12 horas de vida.

### 3.2.- Experimento 2: Uso de calostro caprino congelado y liofilizado

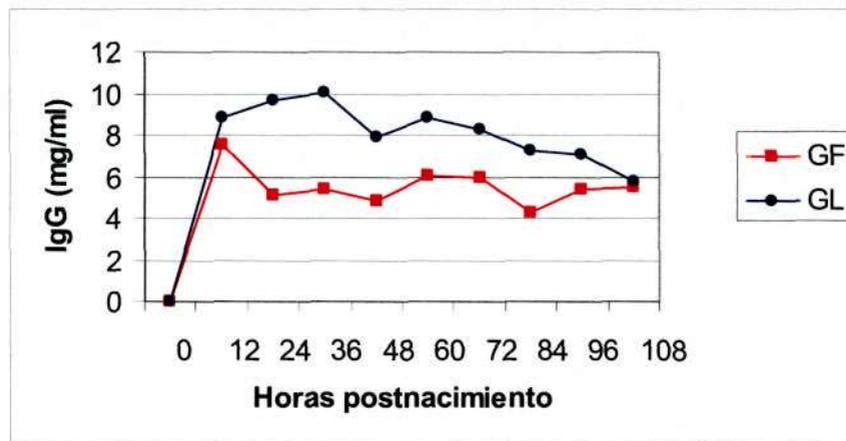
Los resultados obtenidos respecto al efecto del uso de calostro caprino congelado y calostro caprino liofilizado, sobre la concentración de IgG del suero sanguíneo de los cabritos, se muestran en la Tabla 3 y en la Gráfica 2. Si bien la concentración del calostro liofilizado era más elevada que la del calostro congelado, tanto la pauta de manejo para el suministro de calostro (2 tomas/día durante 2 días), como la cantidad de IgG proporcionada (842 mg/kg de peso nacimiento en cada toma) fueron idénticas para ambos lotes (GL y GF), tal y como se esquematizó en el apartado de material y métodos del presente capítulo (Tabla 1). Sin embargo la concentración de IgG en el suero sanguíneo mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $P=0,009$ ).

*Tabla 3.- Efecto del tipo de calostro utilizado sobre la concentración de IgG (mg/ml)*

Tiempo (horas)	Lote GF	Lote GL	Error Estándar	P
	Media			
0	ND	ND	—	0,009
12	7,52	8,82	0,83	
24	5,11	9,72	1,25	
36	5,44	10,07	1,09	
48	4,87	7,87	0,65	
60	6,09	8,85	0,95	
72	5,93	8,24	0,63	
84	4,32	7,30	0,66	
96	5,38	7,06	0,59	
108	5,46	5,79	0,59	

GF.- Calostro congelado. GL.- Calostro liofilizado. ND.- No detectable.

Gráfica 2.- Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de los cabritos según el tipo de calostro utilizado



GF.- Calostro congelado. GL.- Calostro liofilizado

De acuerdo con lo ya descrito en ganado caprino por otros autores (Constant et al., 1994; Argüello, 2000), en el momento del nacimiento, los cabritos del presente experimento no presentaron concentraciones detectables de IgG en el suero sanguíneo, lo que tiene su explicación en las características tisulares de la placenta de los rumiantes. La primera muestra con niveles detectables de IgG fue la recogida a las 12 horas postnacimiento. Ésta y la tomada a las 108 horas de vida, presentaron valores cercanos, entre ambos lotes, con respecto a la concentración de IgG. Sin embargo, a las 36 horas de vida los cabritos del lote GL presentaban un 85% más de IgG (10,07 mg/ml) que los animales del lote GF (5,44 mg/ml). En contra de lo observado en este trabajo, Klobasa et al. (1998), trabajando con terneros recién nacidos, encontraron que las inmunoglobulinas eran absorbidas con la misma eficiencia, independientemente de si el calostro usado era liofilizado o congelado. La diferencia fundamental entre ambos resultados puede explicarse por el hecho de que los calostros congelados y liofilizados empleados en la experiencia descrita por Klobasa et al. (1998) tenían la misma concentración de IgG, mientras en el presente trabajo el calostro liofilizado reconstituido, tenía una mayor concentración de IgG que el

congelado (16,84 y 22,88 mg/ml calostro congelado y liofilizado reconstituido respectivamente). Esta diferencia en la concentración puede ser la razón de la discrepancia hallada en los resultados de ambos trabajos. Asimismo y según los resultados obtenidos por Muller y Ellinger (1981) o Stott y Fellah (1983), siempre y cuando se aportase la misma cantidad de IgG, por animal, era la concentración de IgG y no la cantidad de calostro suministrada, la que tenía una mayor influencia sobre la absorción de la citada Inmunoglobulina.

### 3.3.- Experimento 3: Cantidad de IgG suministrada con el calostro

La tabla 4 y la Gráfica 3 muestran el efecto de la cantidad total de IgG consumida por los cabritos durante el encalostro sobre los niveles de la misma en el suero sanguíneo de los cabritos.

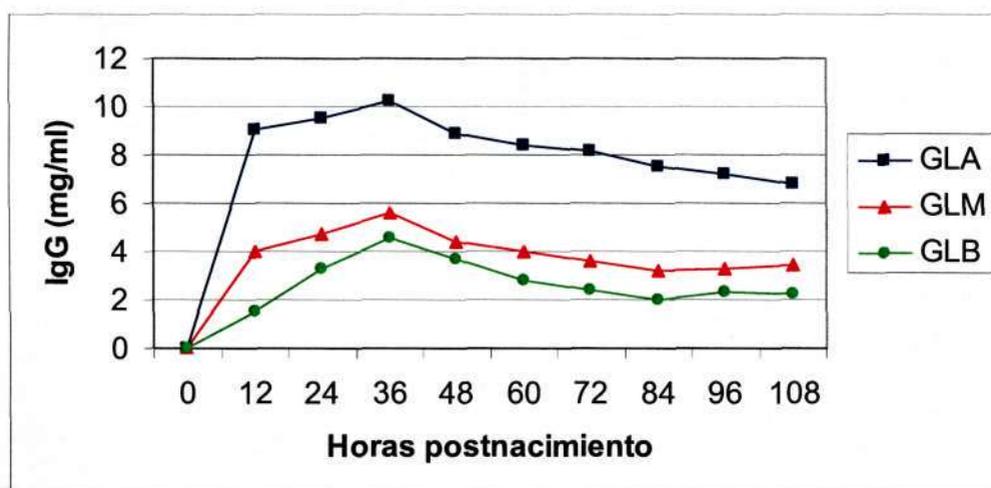
La concentración de IgG del suero sanguíneo de los cabritos del lote GLA fue estadísticamente mayor ( $P < 0,001$ ) que la de los lotes GLM y GLB. Estos resultados coinciden con lo descrito por Chen *et al.* (1999) quienes encontraron niveles superiores de inmunoglobulinas en el suero de cabritos Nubios que habían ingerido un calostro con más cantidad de las mismas que en los animales que ingirieron un calostro con menos. Sin embargo no hubo diferencias estadísticas en la concentración de IgG del suero sanguíneo entre los grupos GLM y GLB, si bien los cabritos del grupo GLB presentaron, en todas las muestras recogidas a lo largo del periodo de estudio, menor cantidad de IgG en su suero sanguíneo. El hecho de que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los lotes GLM y GLB puede deberse a que el error estándar fuera elevado.

Tabla 4.- Concentración de IgG (mg/ml) en suero sanguíneo de los lotes que recibieron alta, media y baja cantidad de IgG

Tiempo(horas)	GLA	GLM	GLB	Error Estándar	P
	Media				
0	ND	ND	ND	—	0,001
12	9,02	4,03	1,55	0,36	
24	9,53	4,69	3,26	0,36	
36	10,28	5,63	4,54	0,51	
48	8,85	4,42	3,65	0,34	
60	8,43	3,99	2,81	0,27	
72	8,14	3,63	2,39	0,23	
84	7,50	3,24	2,02	0,27	
96	7,23	3,26	2,34	0,27	
108	6,79	3,42	2,26	0,24	

GLA.- Alta cantidad de IgG. GLM.- Cantidad media de IgG. GLB.- Cantidad baja de IgG. ND.- No detectable.

Gráfica 3.- Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de los cabritos que recibieron alta, media y baja cantidad de IgG



GLA.- Alta cantidad de IgG. GLM.- Cantidad media de IgG. GLB.- Cantidad baja de IgG.

Los resultados observados en el presente experimento mostraron que los cabritos del grupo GLA tenían las concentraciones más altas de IgG en el suero sanguíneo, lo que coincide con lo descrito en terneros por Abel Francisco y Quigley III (1993) y en cabritos criados en Brasil por Dos Santos *et al.* (1994). En este sentido Abel Francisco y Quigley III (1993) apuntaron que la relación entre la concentración de inmunoglobulinas presentes en el suero y las inmunoglobulinas consumidas debía ser curvilínea. Sin embargo los resultados encontrados en el siguiente apartado del presente trabajo (Tabla 5) indican una relación lineal. Este hecho se debe probablemente a que la cantidad de IgG ingerida por los cabritos de la presente experiencia fue baja y sería necesario realizar más ensayos suministrando mayores cantidades de IgG.

#### **3.4.- Experimento 4: Tiempo de encalostrado y número de tomas**

En esta cuarta experiencia se valoró el efecto, sobre las concentraciones de IgG del suero de los cabritos (Tabla 5 y Gráfica 4), de la reducción del periodo de encalostrado de dos días a uno (2D vs 1D), aportando en ambos casos la misma cantidad de IgG, pero utilizando un calostro de mayor calidad inmunológica que el otro (GLA vs GLB).

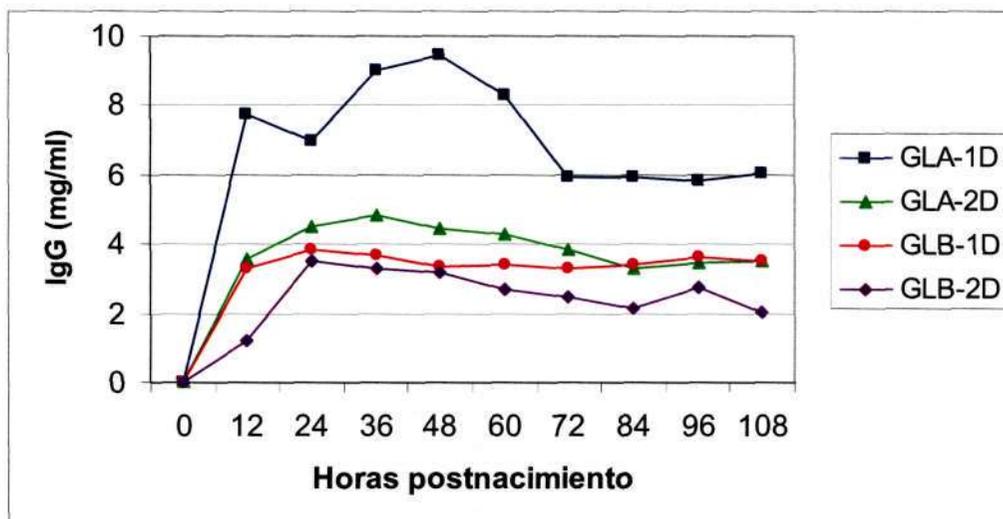
**Tabla 5.- Efecto de la reducción del tiempo de enalostrado a un día vs dos días, utilizando dos niveles concentraciones de IgG (mg/ml)**

Tiempo	IgG a Alta concentración		ES	P	IgG a baja concentración		ES	P
	GLA-1D	GLA-2D			GLB-1D	GLB-2D		
	Media				Media			
0 h	ND	ND	ND	0,011	ND	ND	ND	0,252
12 h	7,73	3,55	0,93		3,28	1,22	0,24	
24 h	6,96	4,49	0,85		3,86	3,49	0,38	
36 h	9,01	4,83	1,01		3,68	3,29	0,62	
48 h	9,43	4,43	1,21		3,37	3,17	0,36	
60 h	8,32	4,27	1,06		3,43	2,70	0,22	
72 h	5,93	3,84	0,41		3,30	2,49	0,20	
84 h	5,92	3,30	0,52		3,39	2,13	0,33	
96 h	5,82	3,45	0,49		3,62	2,74	0,34	
108 h	6,02	3,52	0,53		3,53	2,06	0,28	

GLA-1D.- Alta concentración de IgG un día. GLA-2D.- Alta concentración de IgG dos días. GLB-1D.- Baja concentración de IgG un día. GLB-2D.- Baja concentración de IgG dos días. ES.- Error estándar. h.- horas. ND.- No detectable.

Los cabritos del grupo GLA-1D presentaron durante la experiencia concentraciones de IgG estadísticamente mayores que el lote GLA-2D. Los animales de ambos lotes recibieron la misma cantidad de calostro liofilizado reconstituido por toma (36,80 g/kg peso nacimiento y toma) y la concentración total de IgG recibida por los cabritos de ambos lotes fue la misma (1684 mg/Kg peso nacimiento). La diferencia estaba en que los animales del lote GLA-1D recibieron dos tomas y los del lote GLA-2D cuatro tomas. Una vez más cuando se comparaba con la misma masa de IgG suministrada, la cantidad de calostro ingerido ejercía una menor influencia sobre la absorción de la citada inmunoglobulina que la concentración de la misma (Muller y Ellinger, 1981; Stott y Fellah, 1983).

Gráfica 4.- Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de los cabritos que recibieron calostro un día y dos días



GLA-1D.- Alta concentración de IgG un día. GLA-2D.- Alta concentración de IgG dos días. GLB-1D.- Baja concentración de IgG un día. GLB-2D.- Baja concentración de IgG dos días.

Por otra parte entre las concentraciones de IgG del suero sanguíneo de los cabritos de los lotes GLB-1D y GLB-2D no se detectaron diferencias estadísticas, si bien el grupo GLB-2D presentó valores inferiores en la concentración de IgG en todas las muestras testadas. Resultados similares fueron encontrados por Chen *et al.* (1999) trabajando con cabritos Nubios a los que les proporcionaba un calostro rico en inmunoglobulinas y otro pobre. En esta ocasión también los elevados valores de error estándar hallados han podido impedir que se detecten diferencias estadísticamente significativas. Elevados coeficientes de variación en los niveles de IgG del suero sanguíneo fueron encontrados también por Klobasa *et al.* (1998) en terneros y por Argüello (2000) trabajando con cabritos de raza Majorera.

En un trabajo realizado recientemente con terneros, Jaster (2005) observó que los animales a los que se les proporcionaba un calostro rico en IgG presentaban tasas de inmunidad superiores en su suero sanguíneo que aquellos terneros que consumían un calostro de peor calidad inmunológica.

De igual forma este mismo autor encontró que se producía una mayor absorción de IgG si el calostro era suministrado en dos tomas en vez de en una sola.

En sentido contrario a lo observado en el presente trabajo, Al-Jawad y Lees (1985) no encontraron diferencias estadísticas entre corderos que recibieron calostro comercial con alta (139 mg/ml) o baja (38 mg/ml) concentración de IgG. No obstante, estos resultados podrían tener su explicación en el hecho de que algunos calostros comerciales no permiten la transferencia pasiva de inmunoglobulinas (Argüello, 2000) como así lo muestran los resultados presentados anteriormente en este mismo texto. Pickel et al. (1989) relataron resultados análogos al hallar bajas concentraciones de inmunoglobulinas en el suero de terneros a los que se les había proporcionado calostro comercial con una alta concentración de las mismas.

## CONCLUSIONES

#### 4.- Conclusiones

1.- El uso exclusivo de calostros comerciales de origen ovino compromete la transferencia de inmunidad pasiva y por ende eleva la tasa de mortalidad. Sin embargo, suministrar dos tomas diarias del 5% del peso al nacimiento durante dos días es un método de encalostrado válido y que no presenta diferencias entre el calostro caprino refrigerado y congelado en el primer mes de vida de los cabritos de raza Majorera.

2.- La liofilización es un método adecuado de conservación del calostro caprino y su utilización muestra una tasa de inmunidad pasiva superior a la del calostro congelado.

3.- La cantidad de IgG presente en el calostro tiene mayor influencia sobre los niveles séricos de IgG en los cabritos que la cantidad de calostro suministrado.

4.- En relación al tiempo de encalostrado, proporcionando la misma cantidad de IgG, el encalostrado se puede reducir a dos tomas en un día, con la consecuente disminución de manejo y mano de obra que ello supone.

## BIBLIOGRAFÍA

## 5.- Bibliografía

- Abel Francisco, S.F., Quigley III, J.D., 1993. Serum immunoglobulin concentrations after feeding maternal colostrum plus colostrum supplement to dairy calves. *American Journal Veterinary Research* 54(7), 1051-1054.
- Al-Jawad, A.B., Lees, J.L., 1985. Effects of ewe's colostrum and various substitutes on the serum immunoglobulin concentration, gut closure process and growth rate of lambs. *Animal Production* 40, 123-127.
- Argüello, A., 2000. Lactancia artificial de cabritos, enalostroado, crecimiento, calidad de la canal y de la carne. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 356 pp.
- Argüello, A., Afonso, J.M., Capote, J., Ginés, R., Acosta, F., López, J.L., 1998. Primary results of the effects of materno-filial relationship absence in IgG concentrations of colostrum and kids serum, In: Guessous, F., Rihani, N., Ilham, A. (Eds.), *International Symposium on Livestock production and climatic uncertainty in the Mediterranean*. Agadir, Marruecos, 133-135.
- Argüello, A., Castro, N., Capote, J., 2004a. Growth of milk replacer kids fed under three different managements. *Journal Applied Animal Research* 25, 37-40.
- Argüello, A., Castro, N., Capote, J., Tyler, J.W., Holloway, N.M., 2004b. Effect of colostrum administration practices on serum IgG in goat kids. *Livestock Production Science* 90, 235-239.
- Bernabé, A., Contreras, A., Gómez, M.A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Gómez, S., 1998. Polyarthrititis in kids associated with *Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Record* 142, 64-66.
- Besser, T.E., Osborn, D., 1993. Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G<sub>1</sub> to newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37, 321-327.

- Brambell, F.W.R., 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. *Frontiers of Biology*, Volumen 18, edited by Neuberger, A.Y., Tatum, E.I., North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Chen, J.C., Chang, C.J., Peh, H.C., Chen, S.Y., 1999. Serum protein levels and neonatal growth rate of Nubian goat kids in Taiwan area. *Small Ruminant Research* 32, 153-160.
- Ciupercescu, D.D., 1977. Dynamics of serum immunoglobulin concentration in sheep during pregnancy and lactation. *Research in Veterinary Science* 22, 23-27.
- Constant, S.B., Leblanc, M.M., Klapstein, E.F., Beebe, D.E., Leneau, H.M., Nunier, C.J., 1994. Serum immunoglobulin G concentration in goats kids fed colostrum or a colostrum substitute. *Javma* 205(12), 1759-1762.
- Dos Santos, G.T., Bertolini, D.A., Macedo, F., Prado, I., Martins, E., 1994. Variabilidade em imunoglobulina G (IgG) no colostro de cabra de primeira ordenha e absorcao intestinal de IgG pelos cabritos recém-nascidos. *Arquivos Biologicos y Tecnologicos* 37(2), 285-292.
- Fahey, J.L., McKelvey, E.M., 1965. Quantitative determination of serum immunoglobulin in antibody agar plates. *Journal Immunology* 94, 84.
- Guerrault, P., 1990. Apport de colostrum: plusieurs methodes. *La Chevre* 180, 30-31.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 53-137.
- Husu, J., Syväoja, E.L., Ahola-Luttilla, H., Kalsta, H., Sivelä, S., Kosunen, T.U., 1993. Production of hyperimmune bovine colostrum against *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bact.* 74, 564-569.
- Jaster, E.H., 2005. Evaluation of quality, quantity and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G<sub>1</sub> absorption in Jersey calves. *Journal of Dairy Science* 88, 296-302.

- Klobasa, F., Goel, M.C., Werhahn, E., 1998. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. *Journal of Animal Science* 76, 923-926.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A., 1996. Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring. *American Journal of Veterinary Research* 57(12), 1776-1780.
- Logan, E.F., Penhale, W.J., Jones, R.A., 1972. Changes in the serum immunoglobulin levels of colostrum-fed. *Research in Veterinary Science* 14, 394-397.
- Logan, E.F., Pearson, G.R., 1978. The distribution of immunoglobulins in the intestine of the neonatal calf. *Annales de Recherches Veterinaires* 9(2), 319-326.
- Logan, E.F., McMurray, C.H., O'Neill, D.G., McParland, P.J., McRory, F.J., 1978. Absorption of colostrum immunoglobulins by the neonatal calf. *British Veterinary Journal* 134(3), 258-262.
- López, J.L., Matías, D., Ginés, R., Argüello, A., Capote, J., 1999. Eficacia del uso de un calostro comercial frente a calostro natural en la lactancia artificial de cabritos. *Actas de las XXIV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Soria, España*, 145-148.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235.
- Muller, L.D., Ellinger, D.K., 1981. Colostral immunoglobulin concentration among breeds of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 64(8), 1727-1730.
- O'Brien, J.P., Sherman, D.M., 1993. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. *Small Ruminant Research* 11, 71-77.

- Pickel, M., Beyer, C., Trautwein, G., Grunert, E., 1989. Immunoglobulin supply of newborn calves with the whey globulin concentrate Colostrx<sup>®</sup>. *Prakt Tierarzt* 70, 29-36.
- Rabbani, S., Irfan, M., Muhammad, K., Ahmed, Z.Q., 1990. Studies on the transfer of maternal immunoglobulins in kids. *Archiva Veterinaria Bucuresti* 19, 53-59.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., Sotillo, F., Ramírez, M.C., 1996. Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of postpartum separation. *Small Ruminant Research* 23, 75-81.
- Roy, J.H.B., 1990. *The Calf. 5ª Edi., Vol.1 Management of Health.* Butterworths, 258 pp.
- Sherman, D.M., Arendt, T.D., Gay, J.M., Maefsky, V.A., 1990. Comparing the effects of four colostrum preparations on serum Ig levels of newborn kids. *Veterinary Medicine* 85, 908-913.
- Solanes, D., Such, X., Caja, G., 1995. Efecto de la utilización de un colostro concentrado comercial sobre el crecimiento y la supervivencia de corderos inmunodeprimidos. *ITEA Volumen Extra(16)*, 735-737.
- Stott, G.H., Fella, A., 1983. Colostral immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves. *Journal of Dairy Science* 66(6), 1319-1328.

**CAPÍTULO II.- CONSERVACIÓN E HIGIENIZACIÓN DEL CALOSTRO  
CAPRINO**

## Resumen

Para el presente trabajo se diseñaron tres experimentos diferentes. En el primero de ellos se utilizaron 50 muestras de calostro caprino que fueron conservadas a 4°C durante tres meses. A lo largo de este periodo no se observaron diferencias estadísticas en la concentración de IgG del calostro, si bien se apreció una reducción de los niveles de la misma (32,98 y 25,11 mg/ml de IgG, al inicio y final de la experiencia respectivamente).

Para el segundo experimento fueron usadas 20 muestras de calostro caprino que se congelaron a -20°C y posteriormente fueron descongeladas empleando cuatro métodos diferentes de descongelación, agua caliente (60°C), refrigeración (4°C), temperatura ambiente (27°C) y microondas (55°C). El proceso de congelación y descongelación se repitió siete veces con cada uno de los métodos. El método de descongelación no afectó a la concentración de IgG del calostro. Sin embargo, el número de veces (ciclo) que la muestra era congelada y descongelada sí mostró una tendencia a la reducción de los niveles de IgG (15,50 y 10,73 mg/ml de IgG, primer y séptimo ciclo respectivamente).

En el tercer experimento se utilizaron 30 muestras de calostro caprino que fueron pasteurizadas mediante dos métodos de pasteurización diferentes, observándose una reducción de aproximadamente el 35% en la concentración de IgG del calostro tras la pasteurización.

## Summary

Three different experiments were designed for this study. In the first of them, 50 samples of goat colostrum were stored in a cold-storage room at a temperature of 4°C for a three-month period. No statistically significant effects were observed within this time, although there was a slight reduction in the above-mentioned IgG concentrations (32.98 and 25.11 mg/ml IgG at day 0 and 91 respectively).

In the second experiment, 20 samples of goat colostrum were frozen and subsequently thawed using four different methods; hot water (60°C), refrigeration (4°C), room temperature (27°C) and microwave (55°C). The process was carried out seven times for each of the four methods. The method of thawing did not affect the colostrum IgG concentration, while in contrast, the freezing-thawing cycle tended to reduce IgG concentrations, albeit to no significant degree (15.50 and 10.73 mg/ml IgG at cycle 0 and 7 respectively).

In the third experiment 30 goat colostrum samples were used and a reduction of approximately 35% of IgG concentration after pasteurization was observed.

## INTRODUCCIÓN

## 1.- Introducción

En el manejo de la lactancia artificial, y con el objetivo de minimizar los efectos negativos que supone el establecimiento del vínculo materno-filial en las primeras horas tras el parto (Ramírez *et al.*, 1996), los cabritos deben ser separados de sus madres justo tras el nacimiento. Esta práctica facilita la adaptación de los recién nacidos a las tetinas artificiales y por ende su mejor crianza. Todo lo anteriormente expuesto implica que el enalostrado debe realizarse fuera del entorno materno.

En aquellas áreas donde están presentes enfermedades como la artritis encefalitis caprina (CAEV), resulta especialmente interesante suministrar el calostro fuera del entorno materno, ya que la vía galactogénica (calostro y leche) es uno de los principales mecanismos de transmisión de este virus (Adams *et al.*, 1984; Guerrault, 1990; Contreras *et al.*, 2003). El calostro proporcionado a los cabritos en lactancia artificial puede ser fresco (obtenido de la madre) o conservado (refrigerado o congelado). En este sentido la pasteurización puede jugar un papel importante en la prevención de la citada transmisión. Así, autores como Adams *et al.* (1983) observaron que tras someter el calostro a un tratamiento de pasteurización a 56°C durante 60 minutos, el virus de la artritis encefalitis caprina parecía no tener capacidad infectante. Asimismo Moore *et al.* (1996) obtuvieron buenos resultados de inactivación del virus intersticial bovino pasteurizando a 47°C durante treinta minutos, mientras Meylan *et al.* (1996), trabajando con calostro bovino, observaron una reducción en los niveles de *Micobacterium paratuberculosis* tras un tratamiento de pasteurización de 62°C durante treinta minutos.

El uso de la temperatura también se realiza en la práctica, así, en algunas granjas caprinas de Canadá, calientan el calostro a 57°C durante diez minutos y posteriormente lo transfieren a un termo precalentado con agua hirviendo durante una hora más (Kafidi, 2000).

Tanto Meylan *et al.* (1996) como Tyler *et al.* (2000) han estudiado el efecto de la pasteurización del calostro bovino sobre la concentración de inmunoglobulina G (IgG). En ese caso se observó una reducción significativa en los niveles de IgG del calostro pasteurizado, hecho que se corresponde con el efecto sobre la transferencia de inmunidad pasiva en terneros descrito por Lakritz *et al.* (2000). Sin embargo y en contraste con lo anteriormente descrito, Steinbach *et al.* (1981) no observaron diferencias en la concentración de IgG del calostro bovino tras pasteurizarlo a 55°C durante treinta minutos.

Con respecto a los métodos de conservación del calostro, los citados en la bibliografía de forma habitual son la congelación (Voigtlander, 1981; Skrivanova *et al.*, 1984; Morand-Fehr, 1989; Holloway *et al.*, 2001), la refrigeración (Valenta, 1982), la liofilización (Chelack *et al.*, 1993; Klobasa *et al.*, 1998), la adición de sustancias acidificantes (Muller y Shyre, 1975) y la inclusión de sustancias con capacidad tamponante (Jenny *et al.*, 1984). Asimismo, Foley y Otterby (1978) han recomendado los métodos de conservación química para almacenar el calostro a temperatura ambiente (cuando no sea posible congelar).

A la vista de lo anteriormente expuesto, los objetivos que se plantearon para la realización del presente trabajo fueron:

- 1.- Determinar el efecto de la refrigeración del calostro caprino a largo plazo sobre la concentración de IgG del mismo.
- 2.- Evaluar el efecto de diferentes métodos de descongelación del calostro caprino.
- 3.- Valorar la concentración de IgG del calostro caprino tras someterlo a dos tratamientos de pasteurización diferentes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 2.- Material y Métodos

El presente estudio ha sido realizado en las instalaciones de la Granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ubicada en Montaña Cardones, al noroeste de la isla de Gran Canaria (España), la cual se encuentra a 28° latitud Norte y 15° 35' longitud Oeste y a una altura sobre el nivel del mar de 100 m.

### 2.1.- Toma de muestras y metodología empelada

Para realizar las tres experiencias que componen este capítulo se emplearon un total de 100 muestras de calostro procedente de cabras de raza Majorera.

#### Experimento 1

Para la realización de este experimento se utilizaron 50 muestras de calostro, de 500 ml cada una, obtenidas de dos rebaños diferentes de cabras de raza Majorera. Todas las muestras fueron recogidas dentro de las 24 horas siguientes al parto y fueron conservadas en refrigeración (4°C) durante 91 días.

Sobre cada muestra se cuantificó la concentración de IgG justo tras la recogida y a continuación a los 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63 y 91 días de refrigeración. La técnica empleada para la determinación de la concentración de IgG se realizó según el método descrito por Mancini *et al.* (1965).

#### Experimento 2

En esta experiencia se tomaron 20 muestras de calostro, de 200 ml cada una, de dos rebaños diferentes de cabras de raza Majorera. Estas

muestras fueron recogidas justo después del parto y cada una de ellas fue dividida en cuatro partes alícuotas que se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 1).



Figura 1.- Calostro congelado

Posteriormente, cada una de estas partes alícuotas fue descongelada con un método de descongelación diferente, tal y como se describe a continuación:

- En agua caliente ( $60^{\circ}\text{C}$ )
- A temperatura ambiente ( $27^{\circ}\text{C}$ )
- En una cámara de refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ )
- En microondas ( $55^{\circ}\text{C}$  temperatura final)

Después de la descongelación, las muestras se volvían a congelar nuevamente y este proceso de congelación-descongelación se repitió de forma idéntica siete veces.

La concentración de IgG se valoró inmediatamente después de la recogida de cada muestra y posteriormente tras cada ciclo de congelación-descongelación. Todas estas determinaciones de IgG se realizaron siguiendo el método descrito por Mancini *et al.* (1965).

### Experimento 3

En este experimento se emplearon 30 muestras de calostro recogidas tras el parto de cabras de raza Majorera pertenecientes a dos rebaños diferentes. Los 200 ml de cada muestra fueron divididos en dos partes alícuotas que fueron posteriormente pasteurizados empleando dos métodos distintos.

El primer tratamiento de pasteurización consistió en calentar el calostro a 56°C durante 60 minutos. Las muestras pasteurizadas con el segundo tratamiento fueron sometidas a 57°C durante diez minutos y a continuación se introdujeron durante una hora en un termo que había sido calentado, previamente, con agua hirviendo.

La concentración de IgG de cada muestra se determinó antes y después de ser sometidas al tratamiento de pasteurización, siguiendo el método descrito por Mancini *et al.* (1965). Asimismo se evaluó el número de unidades formadoras de colonias presentes en el calostro antes y después de ser pasteurizado según el método descrito por Beerens y Luquet (1987).

#### 2.2.- Cuantificación de la concentración de inmunoglobulina G

Las múltiples determinaciones de la concentración de IgG realizadas para el presente trabajo se realizaron según el método descrito por Mancini *et al.* (1965). Las características de la técnica y preparación de la misma fueron análogas a las descritas en el apartado de material y métodos del Capítulo 1.

### 2.3.- Valoración de las unidades formadoras de colonias

Para contar el número de unidades formadoras de colonias se utilizó el método descrito por Beerens y Luquet (1987). Se trata de una técnica de diluciones sucesivas, que como su nombre indica, está basada en la dilución sucesiva de la muestra en solución salina.

Para cada muestra a analizar se preparaban ocho tubos, con 9 ml cada uno, de solución salina estéril. Así, al primero de los tubos se le añadía 1 ml de la muestra original y se agitaba por rotación en un vortex. A continuación se tomaba de este tubo 1 ml que era pasado al segundo de los tubos con solución salina, repitiendo la misma operación anterior y así sucesivamente hasta el octavo de los tubos.

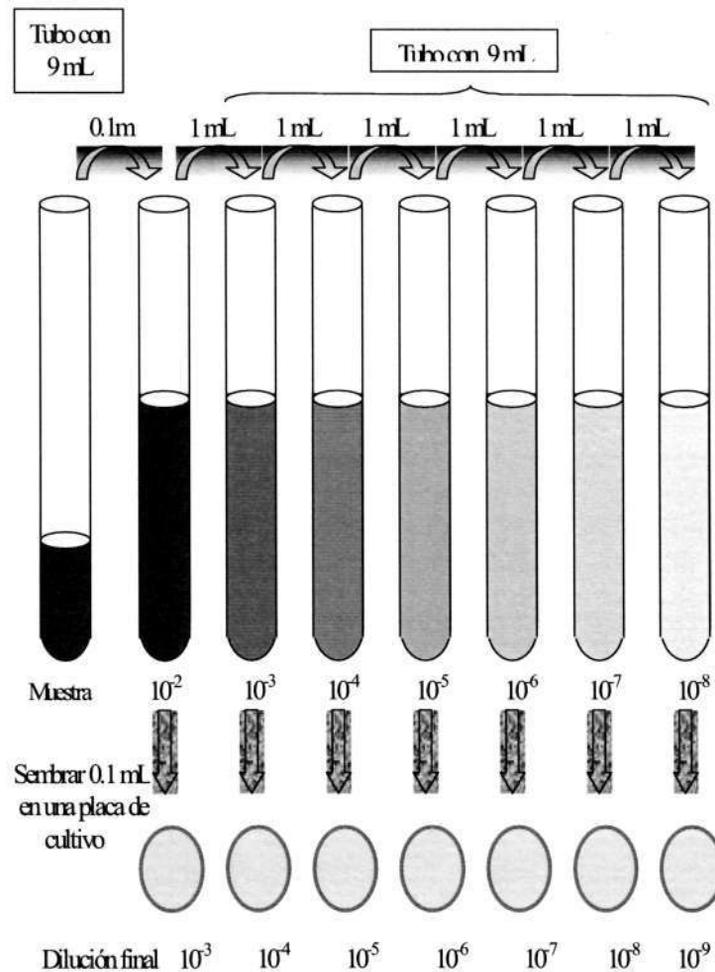


Figura 2.- Esquema de las diluciones sucesivas

Una vez realizadas las diluciones sucesivas descritas anteriormente, de cada tubo se vertían 0,1 ml en una placa de petry (esta operación se realizaba por triplicado), realizando una siembra en césped (Figura 2).

Una vez preparadas todas las placas de petry se incubaban durante 24 horas a 37°C y tras la incubación se utilizaban aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias para realizar la cuantificación. El número de colonias bacterianas contado en la placa se multiplicaba por el factor de dilución correspondiente para obtener así la cifra real presente en la muestra.

#### 2.4.- Tratamiento estadístico

En la primera experiencia la metodología estadística empleada fue un modelo lineal general con medidas repetidas para valorar el efecto del tiempo sobre la concentración de IgG.

En el segundo experimento se utilizó un modelo lineal general con medidas repetidas incluyendo el ciclo y el método de descongelación como efectos fijos.

Por último, en la tercera experiencia el efecto de la pasteurización sobre la concentración de IgG se valoró mediante un análisis lineal general, analizando las diferencias entre medias mediante la prueba de la t de Tukey.

Todos los análisis estadísticos descritos anteriormente se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS (v. 11.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.- Resultados y discusión

#### 3.1.- Experimento 1: Conservación del calostro en refrigeración

Los resultados obtenidos respecto a la evolución de la concentración de IgG en el calostro conservado en refrigeración (4°C) durante 91 días se muestran en la Tabla 1 y en la Gráfica 1.

*Tabla 1.- Concentración de IgG (mg/ml) en calostro caprino durante el periodo de refrigeración (4°C)*

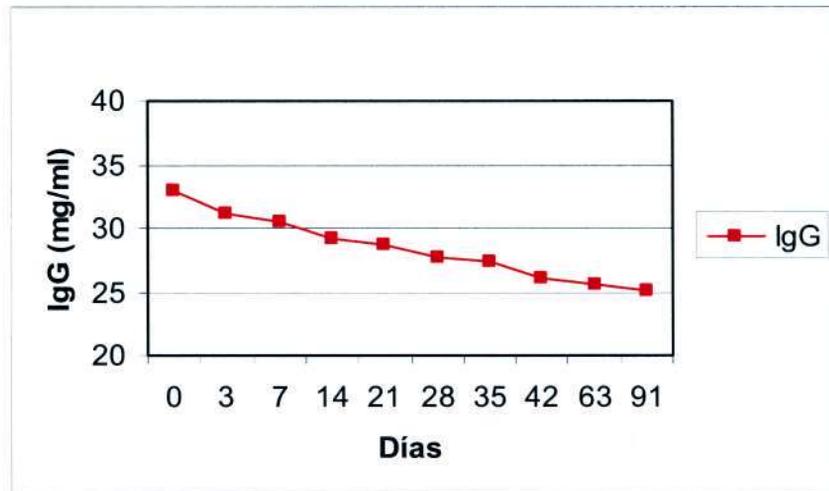
Días	IgG	P
0	32,98±14,39	0,579
3	31,08±14,01	
7	30,44±15,16	
14	29,23±14,48	
21	28,75±12,67	
28	27,70±10,25	
35	27,36±10,41	
42	26,13±14,32	
63	25,53±10,07	
91	25,11±9,35	

Media ± desviación estándar

Tal y como se puede observar (Tabla 1 y Gráfica 1) no se encontró efecto estadísticamente significativo del tiempo de refrigeración sobre la concentración de IgG del calostro sometido a tratamiento durante el periodo de estudio ( $P=0,579$ ), si bien se advierte una tendencia a la disminución en los niveles de la inmunoglobulina al final de la experiencia (24%). No obstante, la principal reducción (17%) se produjo durante el primer mes.

Este hecho se debió probablemente a que los fenómenos de fermentación natural se produjeron durante ese periodo de tiempo.

Gráfica 1.- Evolución de la concentración de IgG (mg/ml) en el calostro durante el periodo de refrigeración (4°C)



Los resultados hallados en el presente trabajo coinciden con lo descrito por Valenta (1982), quien trabajando con calostro bovino conservado en refrigeración (-2 a +2°C), durante catorce días, observó sólo una ligera variación en la concentración de IgG. Por el contrario Mbutia et al. (1997) al almacenar calostro bovino a 28°C sí encontraron una significativa disminución en la concentración de IgG del mismo.

### 3.2.- Experimento 2: Congelación y descongelación del calostro

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la evolución de la concentración de IgG durante los siete ciclos de congelación-descongelación a que fue sometido el calostro para los cuatro métodos de descongelación ensayados (agua a 60°C, temperatura ambiente a 27°C, refrigeración a 4°C y microondas a 55°C de temperatura final).

En el presente trabajo se observó que el número de veces que el calostro fue congelado y descongelado (ciclo) mostraba una tendencia a la reducción de la concentración de IgG del calostro (Tabla2) ya que la disminución advertida tras los siete ciclos de congelación-descongelación fue del 27, 33, 34 y 30% (descongelando en agua caliente, refrigeración, temperatura ambiente y microondas respectivamente).

La reducción en los niveles de IgG, tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación, observados en este estudio, han podido deberse probablemente al efecto de los cambios de temperatura sufridos por el calostro, aunque en ningún caso se superó los 60°C que es la temperatura a partir de la cual las inmunoglobulinas empiezan a desnaturalizarse tal y como ya ha sido demostrado por Anema (2000).

Tabla 2.- Concentración de IgG en el calostro (mg/ml) según los diferentes métodos de descongelación

Ciclo	Método de descongelación				Efectos*	
	AC	TR	TA	MO	Ciclo	Método
0	15,50±8,36	15,50±8,36	15,50±8,36	15,50±8,36	0,069	0,959
1	15,25±7,77	15,05±4,34	14,34±5,39	14,39±2,84		
2	14,40±8,54	14,96±10,01	14,16±6,00	14,38±5,09		
3	13,65±5,30	14,29±8,67	14,11±6,35	14,38±3,61		
4	12,96±2,98	12,82±3,60	13,04±5,14	14,37±7,48		
5	12,28±3,89	10,92±4,37	12,61±7,12	12,45±6,33		
6	11,84±7,69	10,70±2,82	10,97±1,84	11,84±4,18		
7	11,38±2,85	10,40±2,89	10,23±0,93	10,91±5,69		

Media±desviación estándar. AC.- Agua caliente (60°C), TR.- Refrigeración (4°C), TA.- Temperatura ambiente (27°C), MO.- Microondas (55°C temperatura final).  
\* Valor de P.

Por otra parte, no hubo efecto del método de descongelación usado sobre la concentración de IgG ( $P=0,959$ ). Resultados similares han sido descritos por Jones et al. (1987) quienes encontraron que las concentraciones de caseína, IgM e IgG del calostro bovino, descongelado en microondas, no se vieron afectadas de forma significativa respecto a los niveles de los citados componentes hallados en el calostro descongelado en agua a 25°C durante 45 minutos. Asimismo, en el presente trabajo tampoco se observó interacción estadística entre los dos efectos estudiados (ciclo y método de descongelación).

Diversos autores han señalado la congelación como un método adecuado de conservación del calostro. En este sentido Morand-Fehr (1989) observó que las inmunoglobulinas presentes en el calostro caprino congelado no se alteraban durante al menos un periodo de dos años. Asimismo Bilbao et al. (2001) afirmaron que el periodo de conservación de las inmunoglobulinas en calostro bovino congelado era superior a los quince años.

### 3.3.- Experimento 3: Pasteurización del calostro

Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto al efecto de los dos tratamientos de pasteurización ensayados (56°C una hora y 57°C diez minutos y una hora en termo precalentado con agua hirviendo) sobre la concentración de IgG en el calostro y las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes en el mismo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.- Concentración de IgG (mg/ml) antes y después de la pasteurización

	Antes	Tratamiento 1	Tratamiento 2
IgG	33,59±11,91 <sup>a</sup>	21,19±5,70 <sup>b</sup>	20,87±7,24 <sup>b</sup>
ufc	39.300±54340 <sup>a</sup>	100±316 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>

Media±desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). Tratamiento 1.- 56°C, 60 minutos. Tratamiento 2.- 57°C, 10 minutos y termo precalentado 60 minutos.

Los niveles resultantes manifestaron el efecto negativo de la pasteurización sobre la concentración de IgG, observándose una reducción en la citada concentración del 36,92% y 37,84% en el tratamiento 1 (56°, 60 minutos) y tratamiento 2 (57°C, 10 minutos+60 minutos en termo) respectivamente. Tal y como se desprende de estos resultados se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IgG antes y después de la pasteurización si bien no se apreciaron estas diferencias entre los dos tratamientos de pasteurización ensayados (21,19±5,70 y 20,87±7,24 mg/ml de IgG, tratamiento 1 y 2 respectivamente).

La disminución en la concentración de IgG encontrada en el presente trabajo tras la pasteurización fue mayor que la descrita por Meylan et al. (1996) en calostro bovino. Estos autores observaron una reducción del 12,3% en la concentración de IgG del calostro sometido a 63°C, si bien la duración del tratamiento (30 minutos) fue inferior a la utilizada en este trabajo. También en calostro bovino y empleando el mismo tratamiento de pasteurización (63°C, 30 minutos) Godden et al. (2003) encontraron una reducción del 26,2% en la concentración de IgG. La diferencia entre los resultados descritos por los autores citados anteriormente con respecto a los observados en el presente trabajo podría deberse a la menor duración del proceso de pasteurización al que fue sometido el calostro bovino. Sin embargo, Steinbach et al. (1981), trabajando con calostro bovino no hallaron reducción alguna en la concentración de IgG del calostro tras el

proceso de pasteurización, si bien el tratamiento aplicado por estos autores fue de 55°C durante 30 minutos.

Por último en este trabajo se observó como los dos tratamientos de pasteurización ensayados producían una brusca reducción de las unidades formadoras de colonias presentes en el calostro (Tabla 3).

**CONCLUSIONES**

#### 4.- Conclusiones

1.- La refrigeración (4°C) es un buen método de conservación de la calidad inmunológica del calostro caprino durante al menos tres meses, aunque los niveles de IgG disminuyen en un 25%. No obstante, lo aconsejable sería no almacenarlo a esta temperatura durante más de un mes tras la recogida.

2.- El método de descongelación (agua 60°C, refrigeración, temperatura ambiente o microondas) del calostro caprino no afecta a la concentración de IgG del mismo. Sin embargo el número de veces que el calostro es congelado y descongelado sí reduce los niveles de IgG.

3.- La pasteurización del calostro (56°,60 minutos o 57°C, 10 minutos y una hora en termo precalentado) tiene un efecto negativo sobre la concentración de IgG, produciendo una reducción en los niveles de la citada inmunoglobulina.

## BIBLIOGRAFÍA

## 5.- Bibliografía

- Adams, D.S., Klevjer-Anderson, P., Carlson, J.L., McGuire, T.C., Gorham, J.R., 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1670-1675.
- Adams, D.S., Oliver, R.E., Ameghino, E., Demartini, J.C., Verwoerd, D.J., Houwers, D.J., Waghela, S., Gorham, J.R., Hyllseth, B., Dawson, M., Trigo, F.J., McGuire, T.C., 1984. Global survey of serological evidence of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Veterinary Record* 10, 493-495.
- Anema, S.G., 2000. Effects of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4168-4175.
- Beerens, H., Luquet, F.M., 1987. *Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et des produits laitiers. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris, 151 pp.*
- Bilbao, G.N., Landi, H.G., Guarrochena, V., 2001. Calostro fermentado: una alternativa en la dieta líquida para terneros. *Nuestra Cabaña* 305, 18-23.
- Chelack, B.J., Morley, P.S., Haines, D.M., 1993. Evaluation of methods for dehydration of bovine colostrum for total replacement of normal colostrum in calves. *Canadian Veterinary Journal* 34, 407-412.
- Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., 2003. Epidemiología de la artritis encefalitis caprina. *Ovis* 87, 33-44.
- Foley, J.A., Otterby, D.E., 1978. Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: a review. *Journal of Dairy Science* 61, 1033-1060.
- Godden, S.M., Smith, S., Feirtag, J.M., Green, L.R., Wells, S.J., Fetrow, J.P., 2003. Effect of farm commercial batch pasteurization of colostrum on colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. *Journal of Dairy Science* 86, 1503-1512.

- Guerrault, P., 1990. Apport de colostrum: plusieurs methodes. *La Chevre* 180, 30-31.
- Holloway, N.M., Tyler, J.W., Lakritz, J., Carlson, S., Holle, J., 2001. Serum immunoglobulins G concentrations in calves fed fresh and frozen colostrum. *JAVMA* 219, 357-359.
- Jenny, B.F., Hodge, S.E., O`Dell, G.D., Ellers, J.E., 1984. Influence of colostrum preservation and sodium bicarbonate on performance of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 67, 313-318.
- Jones, L.R., Taylor, A.W., Hines, H.C., 1987. Characteristics of frozen colostrum thawed in a microwave oven. *Journal of Dairy Science* 70, 1941-1945.
- Kafidi, 2000. Comunicación personal.
- Klobasa, F., Goel, M.C., Werhahn, E., 1998. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. *Journal of Animal Science* 76, 923-926.
- Lakritz, J., Tyler, J.W., Hostetler, D.E., Marsh, A.E., Weaver, D.M., Holle, J.M., Steevens, B.J., Denbigh, J.L., 2000. Effects of pasteurization of colostrum on subsequent serum lactoferrin concentration and neutrophil superoxide production in calves. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1021-1025.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235.
- Mbuthia, E.W., Klobasa, F., Gachuri, C.K., Abate, A., 1997. Effect of treatment with formaldehyde and formic acid on immunoglobulin content of stored bovine colostrum. *Animal Feed Science and Technology* 67, 291-298.

- Meylan, M., Rings, D.M., Shulaw, W.P., Kowalski, J.J., Bech-Nielsen, B., Hoffsis, G.F., 1996. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1580-1585.
- Moore, E.C., Keil, D., Coats, K., 1996. Thermal inactivation of bovine immunodeficiency virus. *Appl. Env. Micro.* 62, 4280-4283.
- Morand-Fehr, P., 1989. Influence of environment on mortality of kids. *Colloq. Institut. Natl. Rech. Agron.* 28, 31-46.
- Muller, L.D., Syhre, D.R., 1975. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. *Journal of Dairy Science* 58, 957-961.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., Sotillo, F., Ramírez, M.C., 1996. Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of postpartum separation. *Small Ruminant Research* 23, 75-81.
- Skrivanova, V., Skrivan, M., Dobsinsky, O., 1984. Frozen colostrum as a source of immunoglobulins for calves in the first days of life. *Zivocisna Vyroba* 29, 131-136.
- Steinbach, G., Kreuzer, B., Meyer, H., 1981. Zum einfluss der erwarmung auf den immunbiologischen wert des rinderkolostrums. *Monatshefte fur Veterinarmedizin* 36, 29-31.
- Tyler, J.W., Lakritz, J., Hostetler, D.E., Douglas, V., Weaver, D.M., Steevens, B.J., Holle, J., Denbigh, J., 2000. Effect of pasteurization at 76 and 63°C on the absorption of colostral IgG in calves. *Journal Dairy Research* 67, 619-623.
- Valenta, J., 1982. Short term preserved colostrum in the rearing of calves. *Veterinarstvi* 32, 410-411.
- Voigtlander, K.H., 1981. Experiments on preserving and storing colostrum. *Archiv fur Tierzucht* 24, 297-303.

**CAPÍTULO III.- ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO E INMUNIDAD  
HUMORAL Y CELULAR EN GANADO CAPRINO**

## Resumen

Para la realización del presente trabajo se diseñaron tres experimentos. En el primero de ellos participaron 20 cabras gestantes de raza Majorera que fueron divididas en dos grupos. El lote CLA recibió 20g/kg de materia seca de CLA-60 y el grupo control 0g/kg de CLA-60, desde el tercer mes de gestación hasta el parto. Se recogieron muestras de sangre, cada quince días, desde un día antes a la inclusión de CLA hasta el momento del parto. Desde el parto hasta las 96 horas postparto se recogió sangre y calostro cada 24 horas. Antes del parto los niveles de IgG del suero sanguíneo fueron de 15,56 y 9,42 mg/ml (lotes CLA y control respectivamente), observándose efecto estadístico en función del tiempo pero no del CLA. A las 96 horas postparto la concentración de IgG del suero sanguíneo fue de 15,49 y 10,56 mg/ml (CLA y control respectivamente), habiendo sido el efecto del CLA estadísticamente significativo.

Para el segundo experimento se utilizaron 30 cabritos machos que fueron agrupados en dos lotes. El lote control fue enalostado con calostro caprino congelado el lote CLA recibió 20g/l de calostro de CLA-60. Se recogieron muestras de sangre desde el nacimiento hasta las 120 horas de vida de los animales, no habiéndose encontrado efecto estadístico de la inclusión de CLA en el calostro sobre la concentración de IgG del suero sanguíneo de los cabritos.

En el tercer experimento participaron 40 cabritos machos que fueron divididos en dos lotes. El lote control no recibió suplementación de CLA-60 y el lote CLA recibió 20g/l de calostro de CLA-60 durante el enalostado (48 horas) y a continuación 20g/kg de materia seca de CLA-60 con el lactorreemplazante hasta el mes de vida. Las muestras de sangre fueron tomadas los días 1, 8, 15, 22 y 29 de vida. Los niveles de los metabolitos de óxido nítrico (nitrito/nitrato) en el suero sanguíneo oscilaron desde

21,93 a 26,15 y 34,90 a 40,59  $\mu\text{mol}$ , lote control y CLA respectivamente. La L-citrulina presentó unos valores que variaron desde 0,30 a 0,40 y 15,54 a 19,81  $\mu\text{mol}$  (control y CLA respectivamente). Los niveles observados para el óxido nítrico y la L-citrulina fueron estadísticamente mayores en el lote CLA.

## Summary

Two experiments were designed for the present study. In the first experiment, 20 Majorera goats were allotted in two groups. The CLA group received 20g/kg of dry matter of CLA-60 and the control group received 0 g/kg of CLA-60 from the third month of gestation until partum. Blood samples were taken every fortnight from one day before CLA inclusion to partum. Blood and colostrum samples were taken every 24 hours from partum until 96 hours. Before partum IgG serum blood levels were 15.56 and 9.42 mg/ml (CLA and control respectively), the time effects were statistically significant, but no CLA effect was observed. After partum (96 hours) IgG serum blood levels were 15.49 and 10.56 mg/ml (CLA and control), the effect of CLA dietary inclusion was statistically significant.

In the second experiment 30 male new born kids were allotted in two groups, control group were fed with frozen goat colostrum and CLA group received CLA, 20g/l of colostrum of CLA-60. Blood samples were taken from birth to 120 hours postpartum every 12 hours. No statistical effect of CLA colostrum inclusion was found.

In the third experiment 40 male new born kids were allotted in two groups. The control group received no supplement CLA-60 and treatment groups received 20g/l of colostrum of CLA-60 from birth to the second day of age and 20g/kg DM of CLA-60 from the third day to one month of age. Kids were fed colostrum for two days and milk replacer from day 3 to 29. Blood samples (n= 40) were taken at 1, 8, 15, 22 and 29 days of age. NO metabolite (nitrite + nitrate) values in serum ranged from 21.93 to 26.15 and 34.90 to 40.59  $\mu\text{mol}$  in 0 and 20 g/kg DM CLA-60 kids respectively, being statistically higher in 20 g/kg CLA-60 kids. L-Citrulline values ranged from 0.30 to 0.40 and 15.54 to 19.81  $\mu\text{mol}$  in 0 and 20 g/kg DM CLA-60 kids respectively, being statistically higher in 20 g/kg CLA-60 kids.

## INTRODUCCIÓN

## 1.- Introducción

Cuando se realiza lactancia artificial con ganado caprino no es recomendable que los cabritos tomen el calostro directamente de sus madres debido a que el vínculo materno-filial se establece rápidamente (Ramírez et al., 1996), lo cual dificulta la posterior adaptación de los animales a las tetinas artificiales produciéndose un retraso en su crecimiento (Argüello, 2000). Asimismo este manejo es particularmente importante en aquellas áreas en las que existe la presencia del virus causante de la artritis encefalitis caprina (CAEV), ya que el calostro es una de las vías de transmisión del mismo (Contreras et al., 2002).

El ácido Linoleico conjugado (CLA) está formado por un conjunto de isómeros geométricos (*cis* o *trans*) y posicionales (9,11; 10,12; 11,13) derivados del ácido Linoleico. Al CLA se le supone una amplia actividad biológica y se considera que el principal de los isómeros con esta capacidad es el *cis*-9,*trans*-11 (c9,t11). Debido a esto, en los últimos años el CLA ha suscitado una especial atención debido a las múltiples propiedades beneficiosas para la salud que se le han atribuido.

En este sentido, dentro de las diversas actividades del CLA, su faceta beneficiosa frente al cáncer (Ha et al., 1990) o frente a la diabetes (Houseknecht et al., 1998), así como su papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, han sido las más estudiadas (Ha et al., 1987).

Igualmente existen algunos estudios que sugieren que el CLA puede regular la función inmune (Sugano et al., 1998) y aunque el efecto del CLA sobre el sistema inmune no ha sido bien estudiado, Bassaganya et al. (1999) afirmaron que se trata de un producto natural que incrementa la función inmune mientras reduce los efectos negativos de la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, el óxido nítrico es un compuesto inorgánico de corta vida (pocos segundos) que debido a su alta solubilidad difunde libremente a través de las membranas. El citado compuesto es sintetizado a partir de la L-arginina mediante una reacción dependiente del oxígeno y la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH) cuyos productos resultantes son óxido nítrico y L-citrulina (Bush et al., 1992).

El óxido nítrico está envuelto en un amplio rango de funciones, entre las que cabe destacar que favorece la vasodilatación, inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, reduce la proliferación y migración de las células de músculo liso, controla la apoptosis, sostiene la función de barrera del endotelio (Rosselli et al., 1998) y actúa como antimicrobiano.

Debido a la escasez, o inexistencia en algunos casos, de información respecto a la relación entre la inclusión de CLA en la dieta y los niveles de inmunoglobulina G y producción de óxido nítrico en ganado caprino, en el momento de realizar el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Evaluar el efecto de la inclusión de ácido Linoleico conjugado en la dieta de cabras gestantes sobre la concentración de Inmunoglobulina G del calostro.
- 2.- Valorar el efecto de la inclusión de CLA en la dieta de cabras gestantes sobre la concentración de Inmunoglobulina G en el suero sanguíneo antes y después del parto.
- 3.- Evaluar el efecto de la inclusión de CLA en el calostro sobre la transferencia de inmunidad pasiva a los cabritos.

4.- Estimar el efecto de la adición de CLA al calostro y factorreemplazante de los cabritos sobre la síntesis de óxido nítrico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 2.- Material y Métodos

Este trabajo se ha realizado en las instalaciones de la Granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, situada en Montaña Cardones, al noroeste de la isla de Gran Canaria (España), que se encuentra a 28° latitud Norte y 15° 35' longitud Oeste y a una altura de 100 m sobre el nivel del mar.

### 2.1.- Animales y metodología

#### Experimento 1

En esta experiencia participaron veinte cabras gestantes de raza Majorera que se dividieron en dos lotes de diez animales cada uno según el tratamiento (inclusión o no de CLA en la dieta). Todas las cabras estaban en su tercer mes de gestación al comienzo del experimento y fueron alimentadas con maíz, soja 66, alfalfa deshidratada, remolacha deshidratada, paja de trigo y corrector vitamínico-mineral, todo ello racionado de acuerdo con lo establecido por el INRA (Jarrigue, 1990). La preparación comercial de ácido Linoleico conjugado (CLA-60) con la que se suplementaba la ración contenía un 60% de isómeros de CLA.

El primer lote, denominado lote CLA, estaba formado por diez cabras que recibieron la dieta descrita anteriormente a la que se añadieron 20 g/kg de materia seca de CLA-60, lo que suponía una cantidad de CLA de 12 g/Kg de materia seca. Este CLA fue adicionado desde el tercer mes de gestación hasta el momento del parto (Figura 1).



Figura 1.- Suministrando CLA a la cabra

Las otras diez cabras formaron el lote control (0 g/kg CLA) al que se proporcionó la misma dieta sin la adición de CLA.

## Experimento 2

Para la realización de este experimento se utilizaron 30 cabritos machos de raza Majorera. Estos animales fueron separados de sus madres inmediatamente después del nacimiento y, tras secarlos, desinfectarles el cordón umbilical, pesarlos e identificarlos, fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos lotes que conformaron esta experiencia.

Tras realizar las tareas descritas anteriormente, los cabritos fueron enalostrados con calostro caprino congelado (8,95% de proteína bruta, 8,66% de grasa, 3,91% de lactosa y 30,69 mg/ml de IgG). Este calostro fue obtenido después de mezclar varios calostros frescos de cabra (*pool*) y congelar la citada mezcla a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de usarla. Todos los animales recibieron la primera toma de calostro dentro de la primera hora de vida. En el momento de proporcionar el calostro a los cabritos, éste era descongelado en microondas ( $55^{\circ}\text{C}$  temperatura final). El calostro se suplementaba con una preparación comercial de ácido Linoleico conjugado (CLA-60) que contenía un 60% de isómeros de CLA (Figura 2).



Figura 2.- Preparación comercial de CLA

Quince cabritos fueron asignados al lote CLA en el que a los animales se les suministró el calostro anteriormente descrito durante dos días, con la adición de 20 g/l de calostro de CLA-60, lo que suponía 12 g/l de CLA. Cada cabrito recibía dos tomas diarias ingiriendo un volumen igual al 5% de su peso nacimiento (Argüello, 2000). El CLA fue adicionado desde el nacimiento hasta el segundo día de vida, una vez que los animales comenzaron la ingesta de lactorreemplazante dejaron de recibir CLA.

Los otros quince cabritos formaron el grupo control (0 g/l CLA). Estos animales recibieron dos tomas diarias de calostro, consumiendo un 5% de su peso nacimiento en cada toma durante dos días (Argüello, 2000), sin la adición de CLA.

Tras los dos días que duró la fase de enalostro, los cabritos de ambos lotes (CLA y control) fueron alimentados con lactorreemplazante (4,5% humedad, 23,6% proteína, 22,7% grasa, 0,1% fibra y 3,3% almidón sobre materia seca) preparado a 16% p/p en una nodriza automática (Mini Robot, Divasa Farmavic, S.A.), hasta el final de la experiencia, de acuerdo con lo propuesto por Argüello *et al.* (2004).

### Experimento 3

Para la realización de esta experiencia se utilizaron 40 cabritos machos recién nacidos. Estos animales fueron separados de sus madres inmediatamente después del parto y a continuación fueron secados, se les desinfectó el cordón umbilical, se pesaron e identificaron y se asignaron aleatoriamente a uno de los dos lotes experimentales con los que se trabajó.

Tras realizar las tareas descritas anteriormente todos los cabritos recibieron calostro caprino congelado (8,95% de proteína bruta, 8,66% de grasa, 3,91% de lactosa y 30,69 mg/ml de IgG). Este calostro (*pool*) se obtuvo a partir de la mezcla de varios calostros frescos de cabra, congelándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En el momento de proporcionar el calostro a los cabritos, éste fue descongelado en microondas ( $55^{\circ}\text{C}$  temperatura final). Asimismo en la presente experiencia se utilizó una preparación comercial de ácido Linoleico conjugado (CLA-60) que contenía un 60% de isómeros de CLA.

Veinte de los cabritos empleados en este experimento formaron el denominado lote CLA. Estos animales fueron enalostrosados durante dos días, recibiendo dos tomas diarias, ingiriendo un volumen igual al 5% de su peso nacimiento en cada una (Argüello, 2000). A partir de las 48 horas de vida los cabritos recibieron lactorreemplazante (4,5% humedad, 23,6% proteína, 22,7% grasa, 0,1% fibra y 3,3% almidón sobre materia seca) preparado a 16% p/p en una nodriza automática (Mini Robot, Divasa Farmavic, S.A.), según lo propuesto por Argüello *et al.* (2004), hasta finalizar la experiencia (al mes de vida de los cabritos). Tanto al calostro como al lactorreemplazante consumido por estos animales se adicionó CLA-60. Al calostro fueron añadidos 20 g/l de CLA-60 lo cual supuso 12 g/l de CLA y al lactorreemplazante se le adicionaron 20 g/kg de materia seca de CLA-60 con lo que se proporcionaban 12 g/kg de materia seca de CLA.

Los otros veinte cabritos formaron el lote control (no recibieron CLA ni con el calostro ni con el lactorreemplazante). Estos animales fueron encalostrados con el pool descrito anteriormente, recibiendo dos tomas diarias del 5% de su peso nacimiento cada una durante dos días (Argüello, 2000). A partir de este momento fueron alimentados con un lactorreemplazante (4,5% humedad, 23,6% proteína, 22,7% grasa, 0,1% fibra y 3,3% almidón sobre materia seca) preparado a 16% p/p en una nodriza automática (Mini Robot, Divasa Farmavíc, S.A.) según lo propuesto por Argüello *et al.* (2004) hasta el mes de vida, momento en que concluyó la experiencia.

## 2.2.- Toma de muestras y análisis realizados

Para la elaboración del presente trabajo se recogieron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular de todos los animales (cabras y cabritos) que formaron parte de los diferentes grupos experimentales. Los muestreos se realizaron tal y como se describe a continuación.

### Experimento 1

Antes de la inclusión del CLA en la dieta se recogió una muestra de sangre de cada cabra y a partir de ese momento se tomaron tres muestras más, cada quince días, hasta el momento del parto. Posteriormente, desde el nacimiento de las crías hasta las 96 horas postparto, se recogió calostro y sangre cada 24 horas.

Sobre las muestras de calostro (inmediatamente después de la recogida) se determinó la concentración de IgG, de acuerdo con la técnica descrita por Mancini *et al.* (1965).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. durante cinco minutos en una centrífuga Kubota 5100. El suero obtenido tras la centrifugación se dividió en dos partes alícuotas que se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la cuantificación de IgG de acuerdo con el método de Mancini *et al.* (1965).

### Experimento 2

Se recogieron un total de once muestras de cada cabrito. La primera de ellas fue tomada justo tras el nacimiento y las siguientes cada doce horas hasta las 120 horas de vida.

Tras su obtención, la sangre era centrifugada a 3500 r.p.m. durante cinco minutos en una centrífuga Kubota 5100 y el suero resultante fue dividido en dos partes alícuotas que se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de la concentración de IgG, la cual fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Mancini *et al.* (1965).

### Experimento 3

Para este experimento se recogieron cinco muestras de sangre de cada cabrito, la primera se tomó 24 horas después del nacimiento de los animales y a continuación se recogió una muestra cada semana hasta el mes de vida de los cabritos, o sea a los 8, 15, 22 y 29 días.

Tras la toma de sangre las muestras fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. durante cinco minutos en una centrífuga Kubota 5100 (Figura 3). El suero resultante se dividió en dos partes alícuotas que fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

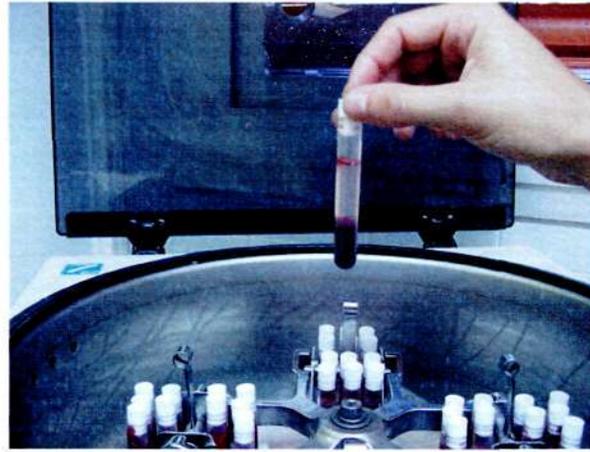


Figura 3.- Muestras de sangre tras centrifugación

Sobre cada una de las muestras se determinó la cantidad de óxido nítrico (nitritos y nitratos) mediante el método de la nitrato reductasa descrito por Schmidt *et al.* (1989). Asimismo se realizó la cuantificación de L-citrulina (coproducto de la biosíntesis del óxido nítrico) mediante un ensayo colorimétrico estándar (Boyde y Rahmatullah, 1980).

### 2.3.- Cuantificación de la concentración de IgG

La determinación de la concentración de IgG de las múltiples muestras analizadas (sangre y calostro) se realizó mediante la técnica descrita por Mancini *et al.* (1965). Las características de la citada técnica y la preparación de la misma son las ya descritas en el apartado de Material y métodos del Capítulo 1 del presente trabajo.

### 2.4.- Determinación de la concentración de óxido nítrico y L-citrulina

#### Óxido Nítrico (nitritos/nitratos)

Los nitritos presentes en el suero sanguíneo se combinan con mucha facilidad con el oxígeno formando nitratos. Por esta razón, el suero fue

tratado previamente con el fin de convertir todos los radicales en nitritos, facilitando de esta forma su cuantificación.

El método empleado para la determinación de los nitratos/nitritos fue el de la nitrato reductasa descrito por Schmidt *et al.* (1989). El procedimiento seguido es el que se detalla a continuación.

El suero sanguíneo de los cabritos fue descongelado en frío y se diluyó en tampón fosfato salino (PBS) en una proporción 1:20. A continuación se colocaron 100  $\mu$ l de este suero en cada uno de los pocillos de una placa de 96. Con el objetivo de transformar los posibles nitratos en nitritos, a los pocillos de la placa se le añadieron 3  $\mu$ l de una solución elaborada con los siguientes reactivos:

- 1,5  $\mu$ g de nitrato reductasa
- 3,3 mg de nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH)
- 0,13 mg de dinucleótido flavina adenina
- 1 ml de agua destilada

Posteriormente las muestras fueron incubadas a 27°C durante una hora.

Como es necesario inducir la oxidación de la NADPH añadida, ya que ésta interfiere en el cálculo de los nitritos, se adicionó 1,5  $\mu$ l de una solución de  $\iota$ -Lactic deshidrogenasa Tipo 1 (25mg/ml) y 10  $\mu$ l de una solución 100 mM de piruvato sódico. A continuación se realizó una incubación de una hora a 37°C.

Una vez concluidas estas reacciones los nitratos fueron totalmente reducidos a nitritos y entonces se realizó la cuantificación.

### Realización de la técnica

Para comenzar el cálculo de la concentración de nitritos se añadieron 100  $\mu$ l de reactivo de Griess en cada pocillo de la placa. La función de este reactivo es convertir los nitritos en compuestos Azo ya que éstos se pueden medir fácilmente en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 540 nm. El citado reactivo de Griess está formado por dos componentes (componente 1: 1 g de sulfanilamida en 100 ml de una solución de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) al 5% y componente 2: 0,1 g de Naftil-etilenediamina en 100 ml de agua destilada). Es necesario mezclar volúmenes iguales de ambos componentes.

Para la cuantificación se utilizó un lector de placas PerkinElmer Victor<sup>3</sup> (Figura 4) y la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 540 nm.



*Figura 4.- Espectrofotómetro*

La curva patrón fue elaborada a partir de soluciones seriadas de nitrato sódico, tal y como se muestra en la Tabla 1. Estas diluciones permitieron conocer con exactitud la cantidad de nitritos presentes en el suero sanguíneo mediante la extrapolación de la absorbancia medida con respecto a la curva patrón. Para ello se preparó una solución madre que tenía una concentración 1 mM de nitrato sódico en medio mínimo esencial.

Finalmente se hicieron partes alícuotas de 500  $\mu$ l que fueron conservadas a – 20°C.

Tabla 1.- Diluciones seriadas de la curva patrón de nitrato sódico

Concentración	Volumen a pasar	Volumen de medio
100 $\mu$ M	250 $\mu$ l de SM	2250 $\mu$ l
80 $\mu$ M	1600 $\mu$ l	400 $\mu$ l
60 $\mu$ M	1200 $\mu$ l	400 $\mu$ l
40 $\mu$ M	800 $\mu$ l	400 $\mu$ l
20 $\mu$ M	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
10 $\mu$ M	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
5 $\mu$ M	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
2,5 $\mu$ M	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Blanco (Medio)		800 $\mu$ l

SM.- Solución Madre.

### L-citrulina

La determinación de este coproducto de la biosíntesis del óxido nítrico se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Boyde y Rahmatullah (1980).

Para ello se utilizaron 400  $\mu$ l de suero sanguíneo de cada una de las muestras. A este volumen de suero se le añadió ureasa tipo III a una concentración final de 45 UI/ml.

Tras incubar durante treinta minutos a 37°C, la mezcla fue desproteinizada con la adición de una solución fría de ácido tricloroacético. A continuación se realizó una centrifugación a 5000 r.p.m. durante quince

minutos en una centrífuga Kubota 5100, recogándose posteriormente el sobrenadante (400  $\mu$ l).

El volumen obtenido del citado sobrenadante fue mezclado con 3 ml de solución cromogénica (una parte de solución I y dos partes de solución II). Esta solución cromogénica estaba a su vez formada por dos soluciones, la solución I (0,5% diacetilmonoxime, 0,01% tiosemicarbacide en agua destilada) y la solución II (0,025%  $\text{FeCl}_3$  en una solución al 25% de ácido sulfúrico y al 20% de ácido fosfórico en agua destilada).

La mezcla resultante del sobrenadante y la solución cromogénica fue calentada hasta 96°C durante cinco minutos y a continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Finalmente se midió la absorbancia empleando una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer Víctor<sup>3</sup> (Figura 4).

Para realizar la curva patrón se elaboraron diluciones conocidas de L-citrulina (2,5-100  $\mu$ M). En este caso se preparó una solución madre 1 mM de L-citrulina de la cual se hicieron partes alícuotas de 2000  $\mu$ l cada una que se conservaron a -20°C.

*Tabla 2.- Diluciones seriadas de la curva patrón de L-citrulina*

Concentración	Volumen a pasar	Volumen de medio
100 $\mu$ M	1000 $\mu$ l de SM	9000 $\mu$ l
80 $\mu$ M	6400 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
60 $\mu$ M	4800 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
40 $\mu$ M	3200 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
20 $\mu$ M	2400 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
10 $\mu$ M	2400 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
5 $\mu$ M	2400 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
2,5 $\mu$ M	2400 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
Blanco (Medio)		2000 $\mu$ l

SM.- Solución Madre.

## 2.5.- Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico realizado para los tres experimentos descritos anteriormente consistió en un modelo lineal general mediante análisis de medidas repetidas. Para ello se utilizó el programa estadístico SPSS (v. 11.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.- Resultados y discusión

#### Experimento 1: Concentración de IgG en suero sanguíneo y calostro

La evolución de la concentración de la IgG del suero sanguíneo de las cabras, desde el tercer mes de gestación hasta quince días antes del parto, se muestra en la Tabla 3 y Gráfica 1. Tal y como se puede apreciar, se encontró un efecto estadísticamente significativo ( $P=0,021$ ) del tiempo sobre la concentración de la mencionada inmunoglobulina. Estos resultados coincidieron con lo descrito por Ha *et al.* (1986), quienes trabajando con cabras nativas coreanas, observaron que la IgG del calostro es transportada selectivamente desde el suero sanguíneo.

Tabla 3.- Evolución de la concentración de IgG (mg/ml) del suero sanguíneo antes del parto

Tiempo	IgG		Efectos*	
	Control	CLA	Tiempo	Tratamiento
3 m	15,36±5,55	16,60±2,25	0,021	0,062
3,5 m	13,22±3,81	11,85±4,85		
4 m	11,32±4,37	15,26±9,44		
4,5 m	9,42±1,73	15,56±6,08		

m.- mes de gestación. \*Valor de P.

Sin embargo en el presente trabajo no se encontró variación estadística, debida al tratamiento (inclusión de CLA en la dieta), en la concentración de IgG del suero sanguíneo durante el periodo antes del parto estudiado. No obstante sí se observó una tendencia a la significación ( $P=0,062$ ) debida a que la reducción de la concentración de IgG en el suero sanguíneo antes del parto fue más acusada en los animales que no recibieron CLA en su dieta. Así, las cabras que tomaron CLA en la dieta

mostraron niveles de IgG superiores en su suero sanguíneo, en el último mes de gestación, que los animales del lote control ( $15,26 \pm 9,44$  y  $11,32 \pm 4,37$  mg/ml de IgG a los cuatro meses de gestación, lote CLA y control respectivamente). Estas diferencias en la concentración de IgG del suero sanguíneo fueron aún más marcadas cuando sólo faltaban quince días para el parto ( $15,56 \pm 6,08$  y  $9,42 \pm 1,73$  mg/ml de IgG, lote CLA y control respectivamente).

La concentración de IgG del suero sanguíneo disminuyó un 6,26% en el lote CLA y un 38,67% en el lote control durante el periodo de estudio antes del parto. En este sentido Sugano *et al.* (1999), trabajando con ratas, ya habían observado que la inclusión de CLA en la dieta producía un incremento en los niveles de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de estos animales, lo cual coincide con lo hallado en el presente trabajo (Tabla 3 y Gráfica 1).

No obstante, el efecto de la inclusión de CLA en la dieta sobre la concentración de IgG sérica podía haber sido mayor si la experiencia hubiese durado más tiempo, ya que el efecto del CLA sobre la modulación de la función inmune no es inmediato. Relacionado con esto Bassaganya-Riera *et al.* (2001), en un experimento de mayor duración, habían descrito los efectos producidos por la inclusión de CLA en la dieta sobre la inmunocompetencia en lechones. Sin embargo, habría que tener en cuenta que el presente trabajo ha sido realizado con cabras adultas y el CLA puede no tener mucha influencia sobre el sistema inmune cuando éste se encuentra completamente desarrollado. Este hecho fue descrito por Corino *et al.* (2002) quienes al estudiar el efecto del CLA sobre el sistema inmune de cerdos destetados, concluyeron que el citado ácido graso produce un incremento en la respuesta inmune de animales jóvenes que aún no tienen desarrollado el repertorio de respuesta inmune específica.

Resultados análogos a los señalados anteriormente fueron encontrados en ratones por Hayek *et al.* (1999) al observar que el CLA producía un efecto menor sobre el sistema inmune en los ratones viejos que en los jóvenes.

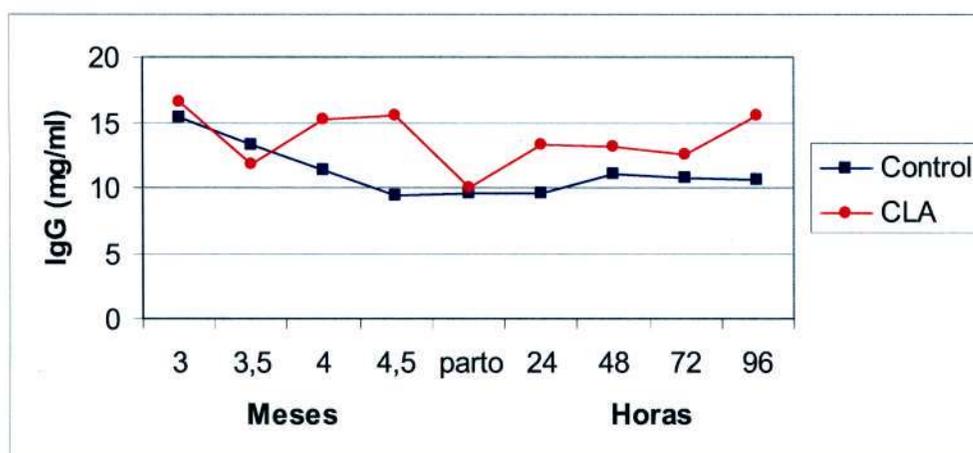
Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a la evolución de la concentración de IgG en el suero sanguíneo de las cabras desde el parto hasta las 96 horas postparto se muestran en la Tabla 4 y en la Gráfica 1.

Tabla 4.- Evolución de la concentración de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de las cabras tras el parto

Tiempo	IgG		Efectos*	
	Control	CLA	Tiempo	Tratamiento
0 h	9,53 ± 2,42	10,04 ± 2,89	0,430	0,014
24 h	9,53 ± 3,04	13,31 ± 4,34		
48 h	10,99 ± 5,41	13,15 ± 6,22		
72 h	10,81 ± 2,48	12,48 ± 2,20		
96 h	10,56 ± 3,67	15,49 ± 8,25		

h.- horas postparto. \*Valor de P.

Gráfica 1.- Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de las cabras desde el tercer mes de gestación hasta las 96 horas postparto



No se observó efecto estadístico del tiempo sobre la concentración de IgG sérica, lo cual puede deberse a la gran variabilidad de los resultados, así como a la estabilidad mostrada por la evolución de los niveles de IgG en el suero sanguíneo de los animales que recibieron la dieta control (0 g/kg CLA) a lo largo del periodo de estudio.

Sin embargo la inclusión de CLA en la dieta sí tuvo efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de la IgG sérica de las cabras después del parto. De esta forma los animales que recibieron CLA durante la experiencia mostraron una recuperación más rápida de su estado inmune tras el parto que las cabras del lote control, observándose valores de  $10,04 \pm 2,89$  y  $9,53 \pm 2,42$  mg/ml en el momento del parto y  $15,49 \pm 8,25$  y  $10,56 \pm 3,67$  mg/ml a las 96 horas postparto (lotes CLA y control respectivamente).

Hay que tener cuenta que después del parto cesa el transporte selectivo de IgG de la sangre al calostro, incrementándose los valores de IgG en el suero sanguíneo (Meiron et al., 1977; Logan et al., 1981). La rápida recuperación del sistema inmune, descrita anteriormente en las cabras que tomaron CLA, podría deberse a que ya había transcurrido el tiempo suficiente como para que el ácido Linoleico conjugado (CLA) activara los linfocitos, así como a que, después del parto, se haya producido una movilización de altas cantidades de CLA desde el tejido adiposo en los animales que lo habían ingerido durante la experiencia.

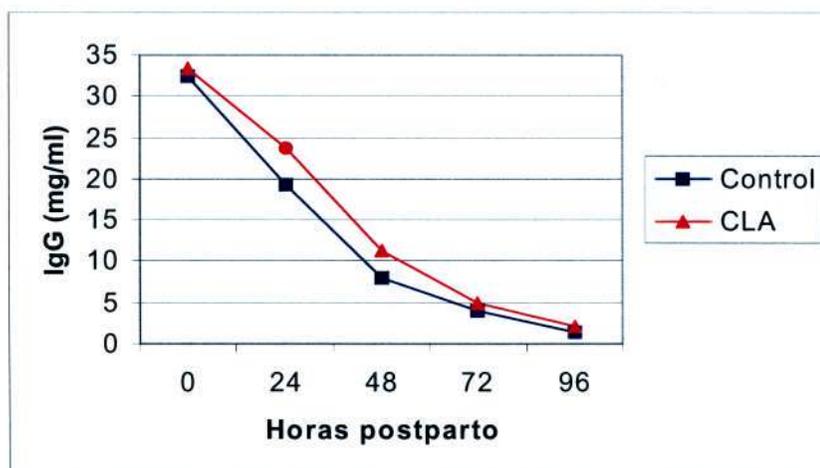
Con respecto a la concentración de IgG en el calostro, la Tabla 5 y la Gráfica 2 muestran la evolución seguida por la misma desde el momento del parto hasta las 96 horas postparto.

Tabla 5.- Evolución de la concentración de IgG (mg/ml) en el calostro

Tiempo	IgG		Efectos*	
	Control	CLA	Tiempo	Tratamiento
0 h	32,44±8,98	33,41±20,22	0,001	0,344
24 h	19,26±9,02	23,73±16,20		
48 h	7,88±4,87	11,31±6,94		
72 h	3,94±3,83	4,88±4,44		
96 h	1,50±1,45	2,21±1,91		

h.- horas postparto. \*Valor de P.

Gráfica 2.- Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) en el calostro



En este caso se observó un efecto estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ ) del tiempo sobre la concentración de IgG del calostro de los animales en estudio. La evolución en los niveles de la citada inmunoglobulina a lo largo de la experiencia fue descendente, fundamentalmente dentro de las primeras 48 horas después del parto. Este hallazgo coincide con lo ya descrito por Argüello (2000) en cabras de la misma raza.

Sin embargo, la concentración de IgG del calostro no se vio afectada por la inclusión de CLA en la dieta, encontrándose valores de IgG similares en ambos lotes (CLA y control) durante el periodo de estudio

(33,41±20,22 y 32,44±8,98 mg/ml de IgG tras el parto, lote CLA y control respectivamente). Estos resultados podrían deberse a una saturación del transporte selectivo de IgG desde la sangre al calostro, aunque, sería necesario realizar más experimentos al respecto.

### Experimento 2: Concentración de IgG en suero sanguíneo de cabritos

En la Tabla 6 y en la Gráfica 3 se pueden observar los resultados obtenidos respecto al efecto de la inclusión de CLA en el calostro sobre la transferencia de inmunidad pasiva en los cabritos.

Tabla 6.- Concentración de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de los cabritos

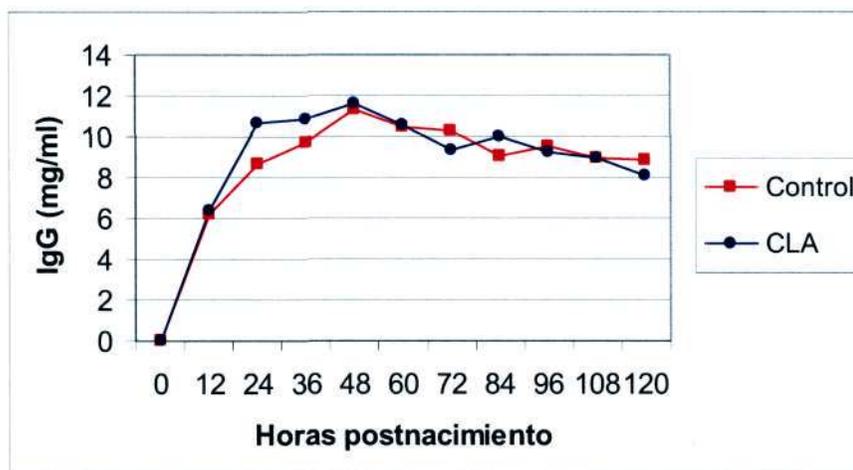
Tiempo	IgG		Efectos*	
	Control	CLA	Tiempo	Tratamiento
0 h	0	0	0,001	0,778
12 h	6,22±2,65	6,39±3,56		
24 h	8,69±2,93	10,65±6,88		
36 h	9,67±2,85	10,89±5,13		
48 h	11,31±4,15	11,65±4,68		
60 h	10,44±2,23	10,54±3,01		
72 h	10,28±3,87	9,36±2,73		
84 h	9,04±1,50	9,99±2,64		
96 h	9,49±2,40	9,26±4,61		
108 h	8,98±1,64	8,95±2,39		
120 h	8,89±1,44	8,08±1,40		

h.- horas de vida. \*Valor de P.

No se observó efecto estadístico de la inclusión de CLA en el calostro sobre la concentración de IgG en el suero sanguíneo de los cabritos en las primeras 120 horas de vida de los animales, y por otra parte tampoco se han

encontrado referencias en la bibliografía respecto al efecto de la adición de CLA en el calostro sobre la transferencia de inmunidad pasiva.

Gráfica 3.-Evolución de los niveles de IgG (mg/ml) en el suero sanguíneo de los cabritos



Yamasaki *et al.* (2000) en una experiencia realizada con ratas de cuatro semanas cuya dieta estaba suplementada con CLA, observaron un aumento en la producción de inmunoglobulinas debida a un incremento en la actividad de los linfocitos. No obstante, y aunque no ha sido estudiado con detalle, el comienzo de la producción endógena de IgG en los cabritos fue estimado por López *et al.* (1999) en animales de raza Majorera, aproximadamente entre los quince o treinta días de vida, así que tal vez éste pudo haber sido el motivo por el que no se han hallado diferencias entre ambos grupos experimentales (CLA y control) en el presente trabajo.

Por otra parte el tiempo, tal y como cabía esperar, sí tuvo efecto estadístico sobre la concentración de IgG a lo largo del periodo de estudio. Se observó que los cabritos eran agammaglobulinémicos al nacimiento coincidiendo con lo descrito por Constant *et al.* (1994) y Argüello (2000), este último trabajando con animales de raza Majorera. Asimismo la evolución

de la concentración de IgG encontrada en este estudio ha sido análoga a los resultados observados por Argüello (2000) en cabritos de la misma raza.

**Experimento 3: Concentración de óxido nítrico en el suero sanguíneo de los cabritos**

Los resultados obtenidos respecto al efecto de la inclusión de CLA en el calostro y lactorreemplazante de los cabritos sobre las concentraciones de óxido nítrico y L-citrulina del lote CLA y control, se muestran en la Tabla 7 y en la Gráfica 4.

*Tabla 7.- Concentraciones de óxido nítrico ( $\mu\text{mol}$ ) y L-citrulina ( $\mu\text{mol}$ ) en el suero sanguíneo de los cabritos*

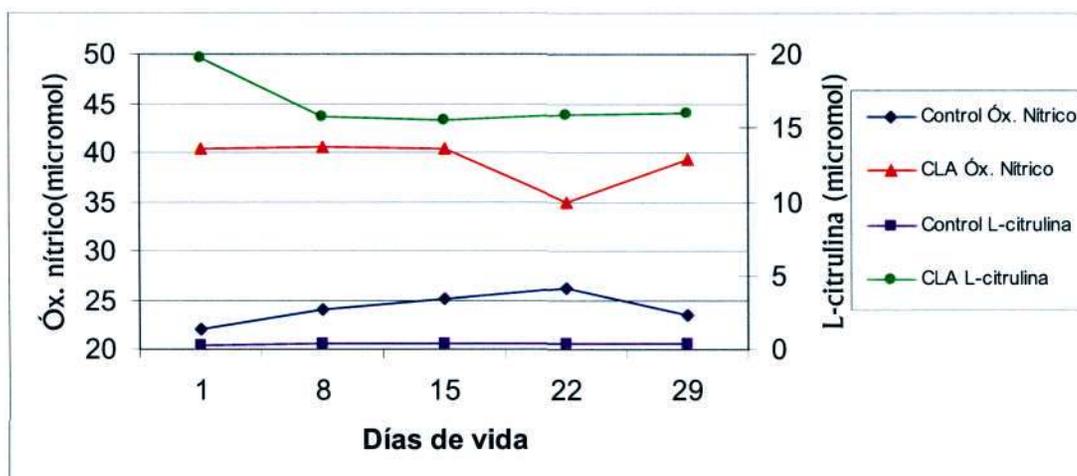
	Control	CLA	P
	Media	Error estándar	
<b>Óxido nítrico</b>			<b>0,001</b>
1 d	21,93	40,32	0,79
8 d	24,04	40,59	1,02
15 d	25,04	40,30	0,85
22 d	26,15	34,90	1,04
29 d	23,38	39,22	0,87
<b>L- citrulina</b>			<b>0,001</b>
1 d	0,30	19,81	0,51
8 d	0,35	15,71	0,40
15 d	0,40	15,54	0,46
22 d	0,31	15,91	0,36
29 d	0,32	15,97	0,51

d.- Días de vida.

Los metabolitos del óxido nítrico (nitrito/nitrato) presentaron unos valores que iban desde 21,93 a 26,15  $\mu\text{mol}$  para el lote control y 34,90 a 40,59  $\mu\text{mol}$  para el lote CLA, observándose una cantidad estadísticamente mayor de los citados metabolitos en los cabritos que habían consumido CLA.

Por su parte la L-citrulina presentó unos valores que fueron desde 0,30 a 0,40  $\mu\text{mol}$  y desde 15,54 a 19,81  $\mu\text{mol}$  para el lote control y CLA respectivamente, resultando también estadísticamente mayores las cantidades de la misma observadas en los animales del lote CLA.

Gráfica 4.- Evolución de las concentraciones de óxido nítrico ( $\mu\text{mol}$ ) y L-citrulina ( $\mu\text{mol}$ ) en el suero sanguíneo de los cabritos



Teniendo en cuenta los resultados de todas las muestras, los metabolitos del óxido nítrico incrementaron en 14,96  $\mu\text{mol}$  y la L-citrulina en 16,25  $\mu\text{mol}$ . El aumento de ambos compuestos fue prácticamente equimolar lo cual coincide con lo descrito por Acosta *et al.* (2004).

No hay referencias bibliográficas acerca del efecto del CLA sobre la producción de óxido nítrico en experiencias realizadas *in vivo*. Sí ha sido observado (Bassaganya-Riera *et al.*, 2001) que en ganado porcino, criado en ambientes sucios y limpios, la inclusión en la dieta de ácido Linoleico

conjugado incrementaba los linfocitos periféricos CD8+ (estos linfocitos en ganado porcino representan la subpoblación más numerosa) y además aumentaba la proliferación de células sanguíneas de la serie blanca, lo cual incluía linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, en ambos ambientes (limpio y sucio). Por tanto podría considerarse que, el CLA utilizado como nutracéutico incrementa la inmunidad celular.

Asimismo, Belury y Kempa-Steczko (1997) observaron, en ratones, que el CLA disminuía la producción de Prostaglandina E<sub>2</sub> porque interfiere en la síntesis del ácido Araquidónico (precursor de la misma) y la citada prostaglandina es supresora de la inmunidad celular (Goldyne y Strobo, 1982).

Yu et al. (2002) observaron la actuación del CLA como antiinflamatorio, en una experiencia *in vitro*, encontrando que el citado ácido graso reducía los niveles de expresión de la forma inducible, tras la estimulación con Interferón Gamma (IFN<sub>γ</sub>), con una cinética lineal. Esto es, a una mayor concentración de CLA se detectaba mayor reducción en los niveles de óxido nítrico.

En el presente trabajo la presencia de niveles superiores de óxido nítrico y L-citrulina en el suero sanguíneo de los cabritos que recibieron CLA, pudo no ser producida por la iNOS pero sí por las otras isoformas de la óxido nítrico sintasa, la endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS). El incremento de óxido nítrico y L-citrulina podrían ser mecanismos de protección efectivos frente a las infecciones, aunque sería necesario realizar más experimentos para conocer tanto el origen como las funciones del incremento de los niveles de los citados compuestos.

## CONCLUSIONES

#### 4.- Conclusiones

1.- La inclusión de ácido Linoleico conjugado en la dieta de cabras gestantes no afectó a la concentración de Inmunoglobulina G del calostro.

2.- El CLA, si bien no tuvo efecto sobre la concentración de Inmunoglobulina G en el suero sanguíneo de las cabras antes del parto, favoreció la recuperación del estado inmune de las mismas tras el mismo.

3.- La inclusión de ácido Linoleico conjugado en el calostro no afectó a la transferencia de inmunidad pasiva en los cabritos.

4.- La inclusión de CLA en el calostro y lactorreemplazante de los cabritos incrementó los niveles de óxido nítrico y L-citrulina en el suero sanguíneo de los mismos.

## BIBLIOGRAFÍA

## 5.- Bibliografía

- Acosta, F., Ruiz de Galarreta, C.M., Ellis, A.E., Díaz, R., Gómez, V., Padilla, D., Real, F., 2004. Activation of the nitric-oxide response in gilthead seabream after experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 581-588.
- Argüello, A., 2000. Lactancia artificial de cabritos, encalostrado, crecimiento, calidad de la canal y de la carne. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 356 pp.
- Argüello, A., Castro, N., Capote, J., 2004. Growth of milk replacer kids fed under three different managements. *Journal Applied Animal Research* 25, 37-40.
- Bassaganya, J., Hontecillas, R., Bregendahl, K., Wannemuehler, M.J., Zimmerman, D.R., 1999. Dietary conjugated Linoleic acid increases CD8 T lymphocyte subpopulation in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 77(Suppl. 1), 119(Abstract).
- Bassaganya-Riera, J., Hontecillas-Magarzo, R., Bregendahl, K., Wannemuehler, M.J., Zimmerman, D.R., 2001. Effects of dietary conjugated Linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune competence. *Journal of Animal Science* 79, 714-721.
- Belury, M.A., Kempa-Steczko, A., 1997. Conjugated Linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 33, 199-204.
- Boyde, T.R., Rahmatullah, M., 1980. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* 15, 424-431.
- Bush, P.A., Gonzales, N.E., Griscavage, J.M., Ignarro, L.J., 1992. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyses the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 960-966.

- Constant, S.B., Leblanc, M.M., Klapstein, E.F., Beebe, D.E., Leneau, H.M., Nunier, C.J., 1994. Serum immunoglobulin G concentration in goats kids fed colostrum or a colostrum substitute. *Javma* 205(12), 1759-1762.
- Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., 2002. Implicaciones de la sanidad animal en los programas de mejora genética en ganado caprino. V Congreso de Sociedad Española para los recursos genéticos animales y III Congreso Ibérico sobre recursos genéticos animales. *Proceedings, Madrid*, 175-180.
- Corino, C., Bontempo, V., Sciannimanico, D., 2002. Effects of dietary conjugated Linoleic acid on some aspecific immune parameters and acute phase protein in weaned piglets. *Canadian Journal Animal Science* 82, 115-117.
- Goldyne, M.E., Strobo, J.D., 1982. Human monocytes synthesize eicosanoids from T lymphocytes derived from Arachidonic acid. *Prostaglandins* 24, 623-631.
- Ha, W.K., Lim, J.W., Choi, C.K., 1986. A study on the immunoglobulin G concentration in milk and blood serum of Korean native goats. I. Changes os IgG concentration on the lactation period of Korean native goats. *Korean Journal of Animal Sciences* 28(10), 679-683.
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W., 1987. Anticarcinogens from Fried Ground beef: Heath-altered derivatives of Linoleic acid. *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.
- Ha, Y.L., Srokson, J., Pariza, M.W., 1990. Inhibition of benzopyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of Linoleic acid. *Cancer Research* 50, 1097-1101.
- Hayek, M.G., Han, S.N., Wu, D., Watkins, B.A., Meydani, M., Dorsey, J.L., Smith, D.E., Meydani, S.N., 1999. Dietary conjugated Linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *Journal of nutrition* 129, 32-38.

- Houseknecht, K.L., Vanden Heuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W., Nickel, K.P., Belury, M.A., 1998. Dietary conjugated Linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the zucker diabetic fatty *fa/fa* rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 678-682.
- Jarrige, J., 1990. Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Mundi Prensa, Madrid, España.
- Logan, E.F., Mensely, D.J., Lindsay, A., 1981. Colostrum and serum immunoglobulin levels in Jersey cattle. *Brit. Vet. J.* 137, 279-282.
- López, J.L., Matías, D., Gínés, R., Argüello, A., Capote, J., 1999. Eficacia del uso de un calostro comercial frente a calostro natural en la lactancia artificial de cabritos. *Actas de las XXIV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Soria, España, 145-148.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235.
- Meiron, R., Cohen, R., Barnea, A., Ratner, D., Trainin, Z., 1977. Immunoglobulin levels in colostrum and milk dairy cattle. *Refu. Vet.* 34, 51.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., Sotillo, F., Ramírez, M.C., 1996. Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of postpartum separation. *Small Ruminant Research* 23, 75-81.
- Rosselli, M., Keller, P.J., Dubey, R.K., 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update* 4,3-24.
- Schmidt, H.H.H.W., Seifert, R., Bohme, E.J.N., 1989. Formation and release of nitric-oxide from human-neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene-B4. *FEBS Letters* 244, 357.

- Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M., Yamada, K., 1998. Conjugated Linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulin in rats. *Lipids* 33, 521-527.
- Sugano, M., Yamasaki, M., Yamada, K., Huang, Y.S., 1999. Effect of conjugated Linoleic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and immune function. In *Advances in Conjugated Linoleic acid Research, Volume 1.* (Yurawecz et al. Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 327-339.
- Yamasaki, M., Kishihara, K., Mansho, K., Ogino, Y., Kasai, M., Sugano, M., Tachibana, H., Yamada, K., 2000. Dietary conjugated Linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(10), 2159-2164.
- Yu, Y., Correll, P.H., Van den Heuvel, J.P., 2002. Conjugated Linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1581, 89-99.

**Publicado en Small Ruminant Research**

**ANEXOS**

Technical note

## Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum

A. Argüello<sup>a,\*</sup>, N. Castro<sup>a</sup>, M.J. Zamorano<sup>a</sup>, A. Castroalonso<sup>a</sup>, J. Capote<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Animal Production Unit, Las Palmas de Gran Canaria University, Transmontaña s/n, 35416 Arucas, Spain

<sup>b</sup> ICIA, Apdo. 60, La Laguna, Tenerife, Spain

Received 4 June 2003; received in revised form 30 October 2003; accepted 17 November 2003

### Abstract

The aim of the present work was to evaluate the effectiveness of the use of refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum in kids. Forty-five Canary Caprine Group kids were distributed in three groups ( $n = 15$ ) according to the type of colostrum fed. The refrigerated and frozen colostrum were administered twice daily for 2 days, each kid receiving 5% of the body weight per feed. Both the refrigerated and frozen colostrum had the same IgG concentration before refrigerating or freezing. The commercial colostrum was administered according to the recommendations of the manufacturer. Blood samples were obtained from the kids (by jugular extraction) every 12 h from birth to the third day post-partum and two additional samples were taken at 15 and 30 days of life. The IgG concentration in the blood was measured by radial immunodiffusion on agarose gel. At birth the kids were agammaglobulinemic.

The peak IgG was at 24 h with frozen goat colostrum fed kids ( $25.47 \pm 19.89$  mg/ml), 36 h for kids fed with refrigerated goat colostrum ( $15.84 \pm 5.91$  mg/ml) while those fed commercial sheep colostrum peaked at 30 days ( $0.84 \pm 0.65$  mg/ml). The birth weight is of great significance with regard to these results. In conclusion, kids fed only with commercial colostrum do not acquire the necessary immunity to protect them during the first month of life.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Refrigerated goat colostrum; Frozen goat colostrum; Commercial sheep colostrum; Kid; Serum IgG

### 1. Introduction

Artificial colostrum feed is found widely distributed in calf and lamb management (Solanes et al., 1995). They are usually concentrated and sterilized products originating from cattle or sheep colostrum, but their use as an only source of Ig has not had totally satisfactory results. In this sense, authors as Solanes et al. (1995), found the highest mortality rates in lambs fed only with artificial colostrum (60 g per animal) com-

pared with that in lambs where it has been used as complement to sheep colostrum. Indeed, some authors (Bernabé et al., 1998) associate the use of artificial colostrum in kids with a certain pathology appearance (*Klebsiella pneumoniae*).

Using artificial colostrum, Constant et al. (1994) does not achieve blood concentrations of immunoglobulin G (IgG) in kids higher than those found in kids fed with goat colostrum. This may possibly be explained by the fact that the macromolecule absorption mechanism for the intestine is not selective to Ig, therefore a greater proportion of albumen in the artificial colostrum could compete with IgG absorption. This occurs with calves, where the albumen added

\* Corresponding author. Tel.: +34-928-451093;

fax: +34-928-451142.

E-mail address: aarguello@dpat.uipgc.es (A. Argüello).

to colostrum reduces the IgG1 absorption from 59 to 36% (Besser and Osborn, 1993).

When artificially rearing goats it is not recommended to feed the colostrum directly from the mother because the rapid maternal–filial bond (Ramírez et al., 1996) will make their subsequent adjustment to the artificial teats more difficult, causing a delay in their growth. Therefore as the use of artificial colostrum in kids intended for artificial rearing remains thoroughly justified, as it reduces the period of fed colostrum, the kids adapt more easily to the rearing techniques, learning to suck or to drink more quickly. The aim of the present work is to evaluate the capacity of artificial colostrum to passively transfer immunity in comparison with refrigerated or frozen goat colostrum.

## 2. Material and methods

Forty-five Canary Caprine Group kids were used. Immediately after birth they were separated from their mothers and then dried, their umbilical cords were disinfected, they were weighed and identified and randomly distributed into three groups. The kids were fed with goat refrigerated colostrum (RC), goat frozen colostrum (FC) and commercial sheep colostrum (CC) being the first fed within the first hour of life.

The colostrum fed as RC and FC (8.95% gross protein, 8.66% fat, 3.91% lactose, 30.69 mg/ml IgG), was pooled from fresh goat colostrum, half was frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) and the other half refrigerated ( $4^{\circ}\text{C}$ ). The RC and FC groups were fed to kids twice per day for 2 days, each kid receiving 5% of the body weight per feed. The frozen colostrum was defrosted at room temperature and after that was warmed to  $40^{\circ}\text{C}$  (internal temperature) in microwave ovens (rotary microwave). Refrigerated goat colostrum was warmed in a same way. From day 3 until 45 the kids were fed by milk replacer machine (Mini Robot, Divasa Farmavic, S.A.) in accordance with Argüello (2000). In CC kids, two doses of 10 g of artificial colostrum were administered, one at birth and the other 5 h later (as recommended by the manufacturer) and subsequently milk replacer was fed in accordance with Argüello (2000). The composition of the artificial colostrum (Colostorm<sup>®</sup>, Vetoquinol) administered was 32.88% humidity, 6.62% of gross protein, 22.50% fat (hydrolyzed), 0.15% cellulose, 1.34% mineral matters,

2.76% saccharose, 0.94% ash, 0.79% total nitrogen, 0.14% calcium, 0.11% phosphorus and 0.1% sodium (according to data supplied by the manufacturer).

To determine the levels of IgG in the kids' blood, samples from the jugular vein were taken every 12 h from birth to 84 h post-partum (every 12 h) and at 15 and at 30 days of life. The blood was centrifuged immediately and the serum obtained was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until its analysis. The IgG quantification was made according to Mancini et al. (1965). The standard curve was prepared according to Catty and Raykundalia (1988) using a goat IgG solution (30 mg/ml) To demonstrate the affinity of the goat-antiserum for the IgG sheep molecules present in the artificial colostrum, several artificial colostrum aliquots were diluted to one-tenth, rainfall halos being obtained.

The effect of treatment was analyzed using the GLM procedure, repeated measures analysis (SPSS V. 8.0 Programme) including birth weight as co-variables. The effect of birth weight was analyzed using the GLM procedure between three weight groups ( $-2.5$ ,  $2.5-3.5$  and  $+3.5$  kg).

## 3. Results and discussion

The kids did not present blood IgG at birth (Table 1), according to Constant et al. (1994). This is because the placenta structure in ruminants does not permit Ig transportation from mother to fetus. The birth weight

Table 1  
IgG blood levels (mg/ml)

Time	Groups		
	RC	FC	CC
Birth	ND	ND	ND
12 h	6.4 $\pm$ 4.7	16.4 $\pm$ 10.1	ND
24 h	12.8 $\pm$ 4.6	25.5 $\pm$ 19.9	ND
36 h	15.8 $\pm$ 5.9	14.7 $\pm$ 3.4	ND
48 h	12.2 $\pm$ 4.7	15.8 $\pm$ 4.9	ND
60 h	13.1 $\pm$ 9.4	12.3 $\pm$ 3.8	ND
72 h	12.4 $\pm$ 5.3	12.8 $\pm$ 3.5	ND
84 h	15.0 $\pm$ 6.7	13.7 $\pm$ 3.3	ND
15 days	8.3 $\pm$ 4.6 a	9.3 $\pm$ 3.4 a	0.4 $\pm$ 0.4 b
30 days	6.1 $\pm$ 2.7 a	6.2 $\pm$ 1.5 a	0.8 $\pm$ 0.6 b

RC: goat refrigerated colostrum, FC: goat frozen colostrum, CC: commercial sheep colostrum, ND: not detectable. Data shown in the row with different letters (a and c) has a significant difference ( $P < 0.001$ ). Minimum level of detection 0.2 mg/ml.

of the three kids group was  $3.78 \pm 0.46$ ,  $3.86 \pm 0.59$  and  $3.60 \pm 0.57$  kg, RC, FC and CC kids, respectively, therefore there were statistical differences at the beginning.

The IgG absorption peak was reached at 24 h in the FC kids and 36 h in RC kids, but no statistical differences were observed due to high standard deviation in serum IgG concentration values. These results are in accordance with those described by Martín (1998) for the Canary Caprine Group kids who were reared with their dams. The results, observed in reference to IgG blood peak time, are very similar to those provided by Argüello et al. (1998) in kids reared separated from the mother and with colostrum fed ad libitum for 3 days. This evolution is in accordance with observations made by Logan et al. (1978) in calves, where the maximum levels of IgG were reached between 16 and 48 h

( $21.5 \pm 2.6$  mg/ml). Ciupercescu (1977) when working with Finnish  $\times$  Dorset Horn lambs, observed that the maximum concentration of IgG1 is reached at the third day of life (22 mg/ml). The level descended by almost 50% in the first 2 weeks (12 mg/ml), this decrease continuing for first month (8 mg/ml). A similar evolution has been observed in the present experimental kids, the concentration of IgG in blood being reduced by 62 and 72 % from the peak until 30 days of life (RC and FC, respectively) and observing (Table 1) statistical differences trough time. At 28 days post-partum Lacetera et al. (1996) found concentrations of Ig smaller than those found at 2 days post-partum. This is explained by the physiological IgG degradation in the blood and because the animals are unable to produce their own immunoglobulins (Logan et al., 1972). From days 28 to 56 post-partum, Lacetera et al.

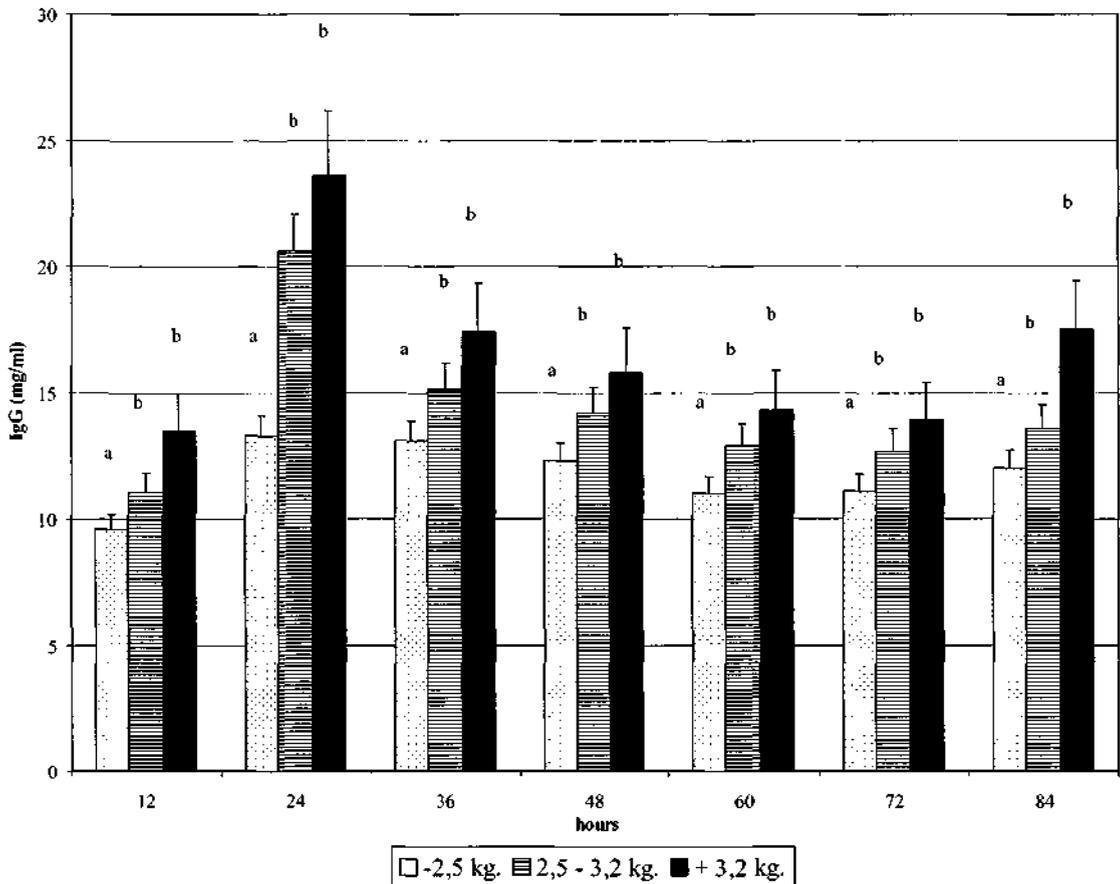


Fig. 1. Serum IgG concentration by birth weight.

(1996) found a light IgG concentration increase in calf blood, possibly attributable to endogenous production of Ig.

In CC kids, IgG transmission from artificial colostrum to the kid's blood was not observed. At 15 days of life IgG level in CC kids blood appeared, possibly being due to immunoglobulins produced by the kids themselves. Logan et al. (1972) working with calves, affirms the influence of the presence of colostrum immunoglobulins in the blood on the initiating endogenous production. Thus, for calves fed with colostrum of good quality, this synthesis starts at 4 weeks, while in agammaglobulinemic calves it commences a few days after birth. This fact was demonstrated by Logan and Pearson (1978) when Ig synthesis in Peyer's patches of calves fed no colostrum feed calf was found, while in calves fed with colostrum, such synthesis was not appearing in the early stages of life.

The IgG level reached at the end of the experiment is greatly inferior (50%) to that found by Martín (1998) in adult goats of the Canary Caprine Group ( $14.01 \pm 4.05$  mg/ml). This may be due to the fact that at only a month of age, the endogenous capacity for Ig production has not been completed.

Fig. 1 shows the relation between birth weight and serum IgG level. Kids with birth weights less than 2.5 kg, had lower IgG concentrations at each sampling time from 12 to 84 h. No statistical differences were found between 2.5 and 3.2 kg birth weight kids and +3.2 kg birth weight kids in any test, although +3.2 birth weight kids tended to present higher serum IgG concentrations. Halliday (1976) and Bekele et al. (1992) observed an effect of birth weight on serum IgG concentrations in lambs from ewes with low colostrum production, while Argüello (2000) did not find birth weight effects with kids fed colostrum ad libitum.

The mortality rate in RC, FC and CC kids was 10, 0, and 50%. The CC group presented failure in passive transfer and showed the highest death rate. O'Brien and Sherman (1993) found similar results in French Alpine kids raised in USA, kids presented as healthy showed a 143.9 mg/ml IgG (measured by turbidity assay) and dead kids 75.1 mg/ml. The importance of the relationship between blood IgG concentration and mortality rate is that the latter is raised due to a higher susceptibility to diseases in kids with low blood IgG concentration.

In conclusion, it may be commented that the exclusive use of the artificial colostrum of sheep origin tested does not provide sufficient IgG blood levels necessary for the satisfactory development of the animal. The method of colostrum feed used (10% of the daily live weight), with refrigerated or frozen goat colostrum does not present differences at 30 days of life.

### Acknowledgements

The authors thank Ms. Heater R. Briggs for review English paper grammar.

### References

- Argüello, A., 2000. Lactancia artificial de cabritos: importancia de la lactancia, crecimiento, calidad de la canal y de la carne. Ph.D. Doctoral Thesis. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Argüello, A., Afonso, A., Capote, J., Ginés, R., Acosta, F., López, J.L., 1998. Primary results of the effects of materno-filial relationship absence in IgG concentrations of colostrum and kids serum. In: Guessous, F., Rihani, N., Ilham, A. (Eds.), Proceedings of the International Symposium on Livestock Production and Climatic Uncertainty in the Mediterranean, Agadir, Marruecos, pp. 133–135.
- Bekele, T., Otesile, E.B., Kasali, O.B., 1992. Influence of passively acquired colostrum immunity on neonatal lamb mortality in Ethiopian highland sheep. *Small Rumin. Res.* 9, 209–215.
- Bernabé, A., Contreras, A., Gomez, M.A., Sanchez, A., Corrales, J.C., Gomez, S., 1998. Polyarthritis in kids associated with *Klebsiella pneumoniae*. *Vet. Rec.* 142, 64–66.
- Besser, T.E., Osborn, D., 1993. Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G1 to new-born calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37, 321–327.
- Catty, D., Raykundalia, C., 1988. Gel immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining methods. In: Catty, D. (Ed.), *Antibodies*. IRL Press, Oxford, UK, pp. 137–167.
- Ciupercescu, D.D., 1977. Dynamics of serum immunoglobulin concentrations in sheep during pregnancy and lactation. *Res. Vet. Sci.* 22, 23–27.
- Constant, S.B., Leblanc, M.M., Klapein, E.F., Beebe, D.E., Leneau, H.M., Nunier, C.J., 1994. Serum immunoglobulin G concentration in goat kids fed colostrum or a colostrum substitute. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 1759–1762.
- Halliday, R., 1976. Variations in immunoglobulin concentration in Finnish x Dorset Horn lambs. *Res. Vet. Sci.* 21, 331–334.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A., 1996. Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1776–1780.

- Logan, E.F., Penhale, W.J., Jones, R.A., 1972. Changes in the serum immunoglobulin levels of colostrum-fed calves during the first 12 weeks postpartum. *Res. Vet. Sci.* 14, 394–397.
- Logan, E.F., McMurray, C.H., O'Neill, D.G., McParland, P.J., McRoy, F.J., 1978. Absorption of colostrum immunoglobulins by the neonatal calf. *Br. Vet. J.* 134, 258–262.
- Logan, E.F., Pearson, G.R., 1978. The distribution of immunoglobulins in the intestine of the neonatal calf. *Ann. Rec. Vet.* 9, 319–326.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235–254.
- Martín, N., 1998. Características químicas, físicas y nutricionales del calostro de la Agrupación Caprina Canaria. Trabajo Fin Carrera, Centro superior de Ciencias Agrarias, Universidad de La Laguna, Spain.
- O'Brien, J.P., Sherman, D.M., 1993. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. *Small Rumin. Res.* 11, 71–77.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., Sotillo, F., Ramírez, M.C., 1996. Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of post-partum separation. *Small Rumin. Res.* 23, 75–81.
- Solanes, D., Such, X., Caja, G., 1995. Efecto de la utilización de un calostro concentrado comercial sobre el crecimiento y la supervivencia de corderos inmunodeprimidos. *ITEA* 16, 735–737.

**Enviado a Journal of Dairy Science**

1 **Interpretative summary.**

2 Powdered colostrum fed to kids, a new alternative.

3 Castro, Capote, Argüello

4 It is necessary to feed colostrum to goats for the transfer of defences  
5 from the dam to the kids. However, some diseases are transmitted by  
6 colostrum and for artificial suckling management it is recommended to  
7 feed colostrum by hand. By the use of powdered colostrum it possible to  
8 improve the defenses transferred from colostrum to newborn kids in the  
9 same way as using frozen colostrum. Work hours can be reduced from  
10 two to just one day using powdered colostrum. In conclusion, powdered  
11 colostrum is easy to transport, requires no special conditions for  
12 prolonged storage, and could be used to provide defenses to newborn  
13 kids.

14

15 **Running head**

16 LYOPHILIZED COLOSTRUM USE IN NEW BORN KIDS

17 **Title**

18 **Effects of Lyophilized Colostrum Use on IgG Blood Serum Kids.**

19 N. Castro<sup>1</sup>, J. Capote<sup>2</sup>, A. Argüello<sup>1\*</sup>

20 <sup>1</sup>Department of Animal Science, Las Palmas de Gran Canaria  
21 University, Arucas 35416, Spain

22 <sup>2</sup>Canary Agronomic Science Institute, La Laguna, Tenerife, Spain

23 \*Corresponding Author (A. Argüello): Fac. Veterinaria, Transmontaña

24 s/n, 35416-Arucas, Spain. Phone: 34+928451093, Fax: 34+928451142,

25 e-mail: aarguello@dpac.ulpgc.es

## ABSTRACT

180 Majorera kids took part in three experiments. In the first experiment the effect of use lyophilized (LG) us frozen colostrum (FG) on IgG blood serum concentration was evaluated. Kids (n=40) received the same management and IgG mass (3368 mg per kg of body weight-BW) during colostrum feed period. IgG blood serum from LG kids was statistically higher. The second experiment evaluated the effect of total IgG feed by kids (n=60) on it IgG blood serum during colostrum feed period. Three groups of animals received 3368, 1684 and 842 mg of IgG per kg of BW in 4 feeds during 2 days (H-IgG, M-IgG and L-IgG, respectively). IgG blood serum in H-IgG group was statistically higher than other two groups and no statistical differences were found for IgG blood serum between M-IgG and L-IgG kids. The third experiment evaluated the effect of number of lyophilized colostrum feeds on IgG blood serum concentration. Four groups of kids (n=80) were used. Two groups received 1684 mg of IgG per kg of BW (HL-1D and HL-2D), and the other two 2 received 842 mg of IgG per kg of BW (LL-1D and LL-2D). Two groups receive two feeds in one day and the other two groups received four feeds in two days. HL-1D kids presented statistical higher IgG blood serum concentration than HL-2D kids and no statistical differences were found between LL-1D and LL2D kids.

22

**Key words:** goat kid, colostrum, lyophilized, immunoglobulin G.

**Abbreviation key:** BW= body weight, IgG= immunoglobulin G.

25

## INTRODUCTION

1  
2 In order to minimize or even annul the mother-kid link, which is  
3 established in the first hours after birth (Ramirez et al., 1996), in  
4 artificial rearing management, the kids must be removed after  
5 parturition. This practice facilitates the acceptance of artificial teats by  
6 the kid, thus improving the adoption of artificial rearing. This also  
7 involves the kids being fed colostrum in an artificial manner. The latter  
8 system is of particular interest in areas where diseases such as CAEV  
9 are present, since colostrum is 1 of the direct means of transmission  
10 (Gerrault, 1990). In ruminants, the placenta impedes the transfer of  
11 immunoglobulin from the dam to the fetus. Consequently, the  
12 consumption of colostrum by the progeny of these species holds a  
13 fundamental role in the acquisition of immunity. Some studies found  
14 lyophilized colostrum to be stable, easy to handle, and suitable for  
15 passive immunization on calves (Husu et al., 1993; Klobasa et al.,  
16 1998). Dos Santos *et al.* (1994) found no relationship between colostral  
17 IgG concentration and serum IgG concentrations in 1 day old kids.  
18 Chen *et al.* (1999) observed significant differences in serum IgG  
19 concentrations between kids fed with high and low protein  
20 concentration colostrum (20g/dl and 10g/dl). In calves, IgG colostrum  
21 concentration is more important than amount of colostrum feed. Stott  
22 and Fellah (1983) observed that IgG serum was higher in calves fed with  
23 1 liter with 60 mg/ml of IgG than in calf fed with 2 litters of colostrum  
24 with 30 mg/ml of IgG. The relation between IgG feed and IgG in calf was  
25 linear according to Stott and Fellah (1983). In kids of the Majorera

1 breed the quantity of IgG consumed presented a high positive  
2 correlation with IgG blood concentrations, particularly in the first 72  
3 hours of the animal's life, but this correlation diminished significantly  
4 at 84 hours (Argüello et al., accepted).

5

6 The objectives of present article were to determine the effect of  
7 lyophilized colostrum feed, the effect of total IgG feed by kids and the  
8 effect of number of lyophilized colostrum feeds on it IgG blood serum  
9 during colostrum feed period.

10

11

## **MATERIAL AND METHODS**

12 Three different experiments were designed. A colostrum pool was  
13 made from fresh goat colostrum (16.84 mg IgG/ml colostrum), 4 liters of  
14 pool were frozen (-20°C) and 30 liters were lyophilized, producing a  
15 colostrum powder with an IgG concentration of 61.041 mg IgG/g. This  
16 pool was used to feed the kids in the 3 experiments. Lyophilized  
17 colostrum pastes were prepared mixing lyophilized colostrum powder  
18 plus sterilized hot water (40°C). The management of the kids before  
19 commencing experiments was the same. Immediately after birth they  
20 were separated from their mothers and then dried, their umbilical cords  
21 were disinfected, they were weighed and identified and randomly  
22 distributed in groups. Frozen colostrum or lyophilized colostrum paste  
23 feeds were at 2, 14, 26 and 38 hours post partum depending  
24 experiments.

25

1           In the first experiment, the effect of lyophilized colostrum *vs* frozen  
2 colostrum feed on IgG kid serum was evaluated. 40 Majorera kids (20  
3 males and 20 females) were randomly assigned into 2 groups. The control  
4 group (CG) and the lyophilized group (LG) were fed with frozen colostrum  
5 and lyophilized colostrum paste twice per day for 2 days; Each feed in  
6 both groups represented 842 mg of IgG according management  
7 proposed by Argüello et al. (2004a). Total IgG received by CG and LG  
8 kids was 3368 mg of IgG per kg of BW. Each CG kid received 50 ml of  
9 thawed colostrum per kg of BW per feed. The frozen colostrum was  
10 defrosted at room temperature and after that was warmed to 40°C  
11 (internal temperature) in microwave ovens (rotary microwave) according  
12 Argüello et al., (2003). The IgG concentration on lyophilized colostrum  
13 paste was 22.88 mg IgG/mg. Each LG kid received 36.80 g of  
14 lyophilized colostrum paste per kg of BW per feed.

15  
16           In the second experiment, the effect of total IgG received per kg of  
17 BW on IgG kid serum was evaluated. 60 Majorera kids (30 males and 30  
18 females) were randomly assigned into 3 groups. All groups were fed with  
19 lyophilized colostrum paste twice per day for 2 days. First group (H-IgG)  
20 were fed using a lyophilized colostrum paste with an IgG concentration  
21 of 22.88 mg IgG/mg. Each H-IgG kid received 36.80 g of lyophilized  
22 colostrum paste per kg of BW per feed, representing 842 mg of IgG per  
23 feed. Total IgG received by H-IgG kids was 3368 mg per kg of BW.  
24 Medium IgG group (M-IgG) was fed using lyophilized colostrum paste with  
25 an IgG concentration of 11.44 mg IgG/mg. Each M-IgG kid received

1 36.80 g of lyophilized colostrum paste per kg of BW per feed,  
2 representing 421 mg of IgG per feed per kg of BW. Total IgG received by  
3 M-IgG kids was 1684 mg per kg of BW. Low IgG group (L-IgG) was fed  
4 using lyophilized colostrum paste twice with an IgG concentration of 5.72  
5 mg IgG/mg. Each L-IgG kid received 36.80 g of lyophilized colostrum  
6 paste per kg of BW per feed, representing 210.5 mg of IgG per feed per  
7 kg of BW. Total IgG received by L-IgG kids was 842 mg per kg of BW.

8

9 In the third experiment, the effect of number of feeds per day on  
10 IgG kid serum was evaluated at 2 levels of IgG per kg of BW. 80 Majorera  
11 kids (40 males and 40 females) were randomly assigned into 4 groups.  
12 The first group (high IgG level) received lyophilized colostrum paste twice  
13 per day during 1 day; this group was assigned like HL-1D (high level, 1  
14 day). The IgG concentration on lyophilized colostrum paste was 22.88  
15 mg IgG/mg. Each HL-1D kid received 36.80 g of lyophilized colostrum  
16 paste per kg of BW per feed, representing 842 mg of IgG per feed per kg  
17 of BW. Total IgG received by HL-1D kids was 1684 mg per kg of BW.  
18 The second group (high IgG level) received lyophilized colostrum paste  
19 twice per day during 2 days; this group was assigned like HL-2D (high  
20 level, 2 days). The IgG concentration on lyophilized colostrum paste was  
21 11.44 mg IgG/mg. Each HL-2D kid received 36.80 g of lyophilized  
22 colostrum paste per kg of BW per feed, representing 421 mg of IgG per  
23 feed per kg of BW. Total IgG received by HL-2D kids was 1684 mg per  
24 kg of BW. The third group (low IgG level) received lyophilized colostrum  
25 paste twice per day during 1 days; this group was assigned like LL-1D

1 (low level, 1 day). The IgG concentration on lyophilized colostrum paste  
2 was 11.44 mg IgG/mg. Each LL-1D kid received 36.80 g of lyophilized  
3 colostrum paste per kg of BW per feed, representing 421 mg of IgG per  
4 feed. Total IgG received by LL-1D kids was 842 mg per kg of BW. The  
5 fourth group (low IgG level) received lyophilized colostrum paste twice per  
6 day during 2 days; this group was assigned like LL-2D (low level, 2 days).  
7 The IgG concentration on lyophilized colostrum paste was 5.72 mg  
8 IgG/mg. Each LL-2D kid received 36.80 g of lyophilized colostrum paste  
9 per kg of BW per feed, representing 210.5 mg of IgG per feed per kg of  
10 BW. Total IgG received by LL-2D kids was 842 mg per kg of BW.

11

12 To determine the levels of IgG in the kids' blood, samples from the  
13 jugular vein were taken every twelve hours from birth to 108 hours  
14 postpartum (every 12 hours). The blood was centrifuged immediately and  
15 the serum obtained was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until its analysis. The IgG  
16 quantification was made using radial immunodifusion according to  
17 Mancini et al. (1965). The standard curve was prepared according to  
18 Catty and Raykundalia (1988) using a goat IgG solution (50 mg/ml).

19

20 From day 3 until 5 the kids were fed by milk replacer machine (Mini  
21 Robot, Divasa Farmavic, S.A.) in accordance with Argüello et al., (2004b).  
22 Table 1 resumed the group managements.

23

24 The statistical analysis to evaluate the effects of lyophilized  
25 colostrum feed on IgG blood serum kids was a general linear model

1 procedure with repeat measures between CG and LG groups. The effect  
2 of IgG feed by kids during colostrum feed period on its IgG blood serum  
3 was evaluate using a general linear model procedure using H-IgG, M-  
4 IgG and L-IgG groups and a post-hoc Tukey analysis was performed.  
5 finally, the effect of the number of colostrum feeds was evaluated using  
6 a general linear model procedure with repeat measures between HL-1D  
7 and HL-2D groups at high IgG level and between LL-1D and LL-2D at  
8 low IgG level. SPSS statistics package were used for all statistic  
9 analysis.

10

11

## RESULTS AND DISCUSSION

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

The kids studied in all experiments did not display any detectable concentrations of IgG in the blood at birth (Table 2, 3 and 4) in accordance with Constant *et al.* (1994) and Argüello *et al.* (2004a). Table 2 shows the results of effect of feeding with lyophilized colostrum *vs* frozen (experiment 1). According to table 1 the management and IgG amount received by CG and LG kids were the same, but the blood serum IgG concentration in both groups was statistically different ( $P < 0.009$ ). At 12 and 108 hours after birth the IgG blood serum concentration was closer between groups but at 36 hours post partum LG kids had 85% more than CG kids (5.44 and 10.07 mg/ml on CG and LG kids, respectively). On the contrary to the effect observed in table 2, Klobasa *et al.* (1998) observed that immunoglobulins were absorbed with equal efficiency from frozen and lyophilized colostrum in newborn calves. The main difference between the two results was that according

1 to Klobasa et al. (1998) the lyophilized colostrum had the same IgG  
2 concentration as the frozen colostrum, but in the present study the  
3 lyophilized colostrum paste had an IgG concentration higher than  
4 frozen colostrum (16.84 and 22.88 mg/ml of IgG on frozen and  
5 lyophilized paste colostrum, respectively). This may be the reason for  
6 the differences observed between experiments, and according to Muller  
7 and Ellinger (1981) or Stott and Fella (1983), who reported that when  
8 compared on equal IgG mass, the amount of colostrum fed had less  
9 influence on IgG absorption than the IgG concentration. Thus  
10 colostrum, when correctly preserved by lyophilizing, can provide  
11 protection against enteric and systemic infection in kids.

12

13 Table 3 shows the effect of total IgG feed by kids on its IgG blood  
14 serum during colostrum feed period. IgG blood serum in H-IgG kids was  
15 statistically higher than M-IgG and L-IgG. No statistical differences were  
16 found for IgG blood serum between M-IgG and L-IgG kids, although L-  
17 IgG kids showed lower IgG blood serum at all sample times. High SEM  
18 could impede to detect statistical differences between M-IgG and L-IgG  
19 kids. H-IgG kids showed the highest IgG blood serum concentrations,  
20 according with results of Abel Francisco and Quigley III (1993) in calf or  
21 Dos Santos et al. (1994) working with Brazilian kids. Abel Francisco  
22 and Quigley III (1993) suggested that the relationship between serum  
23 immunoglobulin concentration and immunoglobulin intake should be  
24 curvilinear, but the results observed in table 4 suggest a linear

1 relationship. Probably the IgG feed by kids was low and it is necessary  
2 to do more experiments with higher IgG mass.

3

4 Experiment 3 evaluated the effect of number of lyophilized  
5 colostrum feeds on IgG blood serum in new born kids at 2 different IgG  
6 levels. HL-1D presented statistically higher IgG blood serum  
7 concentrations than HL-2D at all sample times tested (Table 3). The  
8 lyophilized colostrum paste amount was the same in both group,  
9 consequently the IgG concentration was higher in HL-1D group. Again,  
10 when compared with equal IgG mass, the amount of colostrum fed had  
11 less influence on IgG absorption than did IgG concentration (Muller and  
12 Ellinger, 1981; Stott and Fellah, 1983). No statistical differences were  
13 found between LL-1D and LL-2D, but LL-2D kids presented lower IgG  
14 blood serum concentration at all sample times. Similar results are  
15 reported by Chen et al., (1999) in Nubian kids. SEM values were very  
16 high and may impede to detecting statistical differences. High variability  
17 in IgG blood serum values are reported previously in calves (Klobasa et  
18 al., 1988). On the contrary to that observed in the present experiment,  
19 Al-Jawad and Lees (1985) did not find statistical differences between  
20 lambs that received artificial colostrum with high (139 mg/ml) or low  
21 (38 mg/ml) IgG concentration. Some artificial colostrum did not permit  
22 the immunoglobulin passive transfer (Argüello et al., 2003), that can  
23 explain the results related by Al-Jawad and Lees (1985). Using equal  
24 IgG mass the results were better feeding colostrum in 1 day vs 2 days.

25

1 **IMPLICATIONS**

2 Lyophilizing colostrum is a suitable means of creating a colostrum  
3 bank with intact nutritional and immunological qualities. Lyophilized  
4 colostrum powder is easy to transport, requires no special conditions  
5 for prolonged storage, and could be used to provide immunoglobulins to  
6 newborn kids. Using lyophilized colostrum pastes, which are more  
7 concentrated than liquid colostrum, work hours can be reduced from 2  
8 days to 1. It is certain that the use of colostrum with low IgG  
9 concentrations reduces the IgG blood serum kid; consequently increase  
10 the risk of death.

11  
12 **REFERENCES**

13 Abel Francisco, S.F. and J.D. Quigley III. 1993. Serum immunoglobulin  
14 concentrations after feeding maternal colostrum plus colostrum  
15 supplement to dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* 54:1051-1054.

16

17 Al-Jawad, A.B. and J.L. Lees. 1985. Effects of ewe colostrum and  
18 various substitutes and the serum immunoglobulin concentration, gut  
19 closure process and growth rate of lambs. *Anim. Prod.* 40:123-127.

20

21 Argüello, A., N. Castro, J. Capote, R. Ginés, F. Acosta and J.L. López.  
22 2003. Effects of refrigeration, freezing-thawing and pasteurization on  
23 IgG goat colostrum preservation. *Small. Rum. Res.* 48:135-139.

1 Argüello, A., N. Castro, M.J. Zamorano, A. Castroalonso and J. Capote.  
2 2004a. Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and  
3 frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. *Small. Rum.*  
4 *Res.* 54:237-241.

5

6 Argüello, A., N. Castro and J. Capote. 2004b. Growth of milk replacer  
7 kids fed under three different managements. *J. Appl. Anim. Res.* 25:37-  
8 40.

9

10 Argüello, A., N. Castro, J. Capote, J.W. Tyler and N.M. Holloway.  
11 Accepted. Effect of colostrum administration practices on serum IgG in  
12 goat kids. *Livest. Prod. Sci.*

13

14 Catty, D. and C. Raykundalia. 1988. Gel immunodiffusion,  
15 immunoelectrophoresis and immunostaining methods. In: Catty, D.  
16 (Ed.), *Antibodies*, IRL Press, Oxford, UK, pp. 137-167.

17

18 Chen, J.C., C.J. Chang, H.C. Peh and S.Y. Chen. 1999. Serum protein  
19 levels and neonatal growth rate of Nubian goat kids in Taiwan area.  
20 *Small Rum. Res.* 32:153-160.

21

22 Constant, S.B., M.M. Leblanc, E.F. Klapstein, D.E. Beebe, H.M. Leneau  
23 and C.J. Nunier. 1994. Serum immunoglobulin G concentration in  
24 goats kids fed colostrum or a colostrum substitute. *J. Am. Vet. Med.*  
25 *Assoc.* 205:1759-1762.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

Dos Santos, G.T., D.A. Bertolini, F. Macedo, I. Prado and E. Martins. 1994. Variabilidade em imunoglobulina G (IgG) no colostro de cabra de primeira ordenha e absorcao intestinal de IgG pelos cabritos recém-nascidos. Arq. Biol. Tecnol. 37:285-292.

Guerrault, P. 1990. Apport de colostrum: plusieurs methodes. La Chevre, 180:30-31.

Husu, J., E.L. Syväoja, H. Ahola-Luttilla, H. Kalsta, S. Sivelä and T.U. Kosunen. 1993. Production of hyperimmune bovine colostrum against *Campylobacter jejuni*. J. Appl. Bact. 74:564-569.

Klobasa, F., M.C. Goel and E. Werhahn. 1998. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. J. Anim. Sci. 76:923-926.

Mancini, G., A.O. Carbonara and J.F. Heremans. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry. 2: 235-254.

Muller, L.D. and D.K. Ellinger. 1981. Colostral immunoglobulin concentration among breeds of dairy cattle. J. Dairy Sci. 64:1727-1730.

1    Ramírez, A., A. Quiles, M.L. Hevia, F. Sotillo and M.C. Ramirez. 1996.  
2    Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic  
3    goat after different periods of postpartum separation. Small Rum. Res.  
4    23:75-81.

5

6    Stott, G. H. and A. Fella. 1983. Colostral immunoglobulin absorption  
7    linearly related to concentration for calves. J. Dairy Sci. 66:1319-1328.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1

2 Table 1. Group managements.

	Experiment 1		Experiment 2			Experiment 3			
	CG	LG	H-IgG	M-IgG	L-IgG	HL-1D	HL-2D	LL-1D	LL-2D
Colostrum fed									
time(days)	2	2	2	2	2	1	2	1	2
Feeds per day	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Total feeds	4	4	4	4	4	2	4	2	4
IgG mg per									
feed per kg of	842	842	842	421	210.5	842	421	421	210.5
BW									
Total IgG									
feed(mg/kg	3368	3368	3368	1684	842	1684	1684	842	842
BW)									

3 BW. Body weight.

4 CG. Control group.

5 LG. Lyophilized group.

6 HL-1D. High level of IgG in 1 day.

7 HL-2D. High level of IgG in 2 days.

8 LL-1D. Low level of IgG in 1 day.

9 LL-2D. Low level of IgG in 2 days.

10 H-IgG. High level of IgG.

11 M-IgG. Medium level of IgG.

12 L-IgG. Low level of IgG

13

14

15

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13

Table 2. IgG blood serum in control group and lyophilized group kids.

Time	CG kids	LG kids	SEM	P
	LSM			
0	0	0	0	0.009
12	7.52	8.82	0.83	
24	5.11	9.72	1.25	
36	5.44	10.07	1.09	
48	4.87	7.87	0.65	
60	6.09	8.85	0.95	
72	5.93	8.24	0.63	
84	4.32	7.30	0.66	
96	5.38	7.06	0.59	
108	5.46	5.79	0.59	

CG. Control group.  
LG. Lyophilized group.  
LSM. Least square mean.  
SEM. Standard error of mean.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13

Table 3. IgG blood serum in high, medium and low IgG amount groups.

Time	H-IgG	M-IgG	L-IgG	SEM	P
	LSM				
0	0	0	0	0	0.001
12	9.02	4.03	1.55	0.36	
24	9.53	4.69	3.26	0.36	
36	10.28	5.63	4.54	0.51	
48	8.85	4.42	3.65	0.34	
60	8.43	3.99	2.81	0.27	
72	8.14	3.63	2.39	0.23	
84	7.50	3.24	2.02	0.27	
96	7.23	3.26	2.34	0.27	
108	6.79	3.42	2.26	0.24	

H-IgG. High level of IgG.  
M-IgG. Medium level of IgG.  
L-IgG. Low level of IgG  
LSM. Least square mean.  
SEM. Standard error of mean.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

Table 4. IgG blood serum in high and low IgG concentration level groups.

Time	High IgG concentration			P	Low IgG concentration			
	HL-1D	HL-2D	SEM		LL-1D	LL-2D	SEM	
	LSM	SEM			LSM	SEM		
0	0	0	0	0.011	0	0	0	0.252
12	7.73	3.55	0.93		3.28	1.22	0.24	
24	6.96	4.49	0.85		3.86	3.49	0.38	
36	9.01	4.83	1.01		3.68	3.29	0.62	
48	9.43	4.43	1.21		3.37	3.17	0.36	
60	8.32	4.27	1.06		3.43	2.70	0.22	
72	5.93	3.84	0.41		3.30	2.49	0.20	
84	5.92	3.30	0.52		3.39	2.13	0.33	
96	5.82	3.45	0.49		3.62	2.74	0.34	
108	6.02	3.52	0.53		3.53	2.06	0.28	

HL-1D. High level of IgG in 1 day.

HL-2D. High level of IgG in 2 days.

LL-1D. Low level of IgG in 1 day.

LL-2D. Low level of IgG in 2 days.

LSM. Least square mean. SEM. Standard error of mean.

**Publicado en Small Ruminant Research**

## Effects of refrigeration, freezing-thawing and pasteurization on IgG goat colostrum preservation

A. Argüello<sup>a,\*</sup>, N. Castro<sup>a</sup>, J. Capote<sup>b</sup>, R. Ginés<sup>a</sup>, F. Acosta<sup>c</sup>, J.L. López<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Animal Production, Veterinary Faculty, Las Palmas de Gran Canaria University, 35416-Arucas, Las Palmas, Spain

<sup>b</sup> Canary Agronomic Science Institute, Apt. 60, La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>c</sup> Infectious Disease, Veterinary Faculty, Las Palmas de Gran Canaria University, 35416-Arucas, Las Palmas, Spain

Accepted 15 October 2002

### Abstract

The aim of this paper was to evaluate the effects of refrigeration, several different methods of thawing, and pasteurization on the concentration of IgG in goat colostrum. Three different experiments were designed to analyse these effects. In the first of these, 50 samples of goat colostrum were stored in a cold-storage room at a temperature of 4 °C for a 3-month period. No statistically significant effects were observed within this time, although there was a reduction in IgG concentrations (32.98 and 25.11 mg/ml IgG at day 0 and 91, respectively). In the second experiment, 20 samples of goat colostrum were frozen and subsequently thawed using four different methods: hot water (60 °C), refrigeration (4 °C), room temperature (27 °C) and microwave (55 °C). The process was carried out seven times for each of the four methods. The method of thawing did not affect the colostrum IgG concentration. However, the repetition of freezing and thawing tended to reduce IgG concentrations, albeit to no significant degree (15.50 and 10.73 mg/ml IgG at cycle 0 and 7, respectively). In the third experiment, 30 goat colostrum samples were used and a reduction of approximately 35% of IgG concentration after pasteurization was observed. Refrigeration, freezing and pasteurization are suitable methods for conserving goat colostrum.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Colostrum; Goat; Refrigeration; Thawing; Pasteurization

### 1. Introduction

Artificial rearing has been a subject of research at the Animal Production Section of the University of Las Palmas since 1991. In order to minimize or even annul the mother–kid link, which is established in the first hour after birth (Ramírez et al., 1996), the kids must be removed after parturition. This management facilitates the acceptance of artificial teats by the kid, thus improving the adoption of artificial lactation. This also

involves the kids being fed colostrum in an artificial manner. The colostrum can either be fresh (obtained directly from the mother) or preserved (either refrigerated or frozen). The latter system is of particular interest in areas where diseases such as CAEV are present, since colostrum is one of the direct means of transmission (Guerrault, 1990). Pasteurization can play a vital role in preventing such transmission. Several authors have confirmed this fact; Adams et al. (1983) demonstrated the inactivation of encephalitis arthritis virus in goats after a 60 min pasteurization treatment at 56 °C, while Moore et al. (1996) successfully inactivated the BIV virus with a 30 min pasteurization treatment at 47 °C, and Meylan et al. (1996) observed

\* Corresponding author. Tel.: +34-928-451093;

fax: +34-928-451142.

E-mail address: aarguello@dpat.ulpgc.es (A. Argüello).

a reduction in levels of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine colostrum after pasteurization (62 °C for 30 min). In some Canadian goat farms colostrum is heated to 57 °C for 10 min and then transferred to a preheated (with boiling water) thermos bottle for 1 h more (Kafidi, 2000; personal communication). The effects of pasteurization on IgG in colostrum have been analyzed by Meylan et al. (1996) and Tyler et al. (2000), using cattle. Here a significant reduction in IgG levels in pasteurized colostrum was observed, and this has a corresponding effect on the transfer of passive immunity to the calves (Lakritz et al., 2000). In contrast to these findings, Steinbach et al. (1981) did not observe differences in IgG concentration in colostrum after pasteurization at 55 °C for 30 min.

With respect to colostrum preservation methods, the most commonly cited forms are freezing (Voigtlander, 1981; Skrivanova et al., 1984; Morand-Fehr, 1989; Holloway et al., 2001), refrigeration (Valenta, 1982), lyophilizing (Klobasa et al., 1998), the addition of acidifying substances (Muller and Syhre, 1975) or substances with a buffering capacity (Jenny et al., 1984). Chemical preservation methods are recommended for storage at room temperature in cases where freezing facilities are not available (Foley and Otterby, 1978).

The objective of this research was to determine the IgG concentration of colostrum refrigerated over a long period of time, and to evaluate the effects of different methods of thawing and pasteurizing techniques on IgG concentration in goat colostrum.

## 2. Material and methods

Three different experiments were conducted. In the first, the effect of colostrum refrigeration time on IgG concentration was evaluated. Fifty samples belonging to Canary Caprine Group (CCG) were taken from two different herds. These samples were taken within 24 h of kidding and frozen at –20 °C in hermetically sealed 500 cc containers.

In the second experiment, the effect of the thawing method on IgG concentration was evaluated. Twenty samples of CCG colostrum were taken from two different herds. The samples were obtained after birth, and IgG levels were immediately measured. Each sample was divided into four aliquots and then frozen in 50 cc containers at –20 °C. Subsequently, each of

the aliquots was thawed using a different method: in hot water (60 °C) until thawed, at room temperature (27 °C) until thawed, in a cold-storage room (4 °C) until thawed, and by microwave (55 °C final temperature) and the IgG concentration after thawing was measured. The freezing-thawing cycle was repeated seven times.

The third experiment used 30 samples of CCG colostrum taken from two herds. The samples were obtained after birth, and IgG concentration levels were immediately measured. Each sample was then divided into two aliquots and subsequently pasteurized using two different methods. The first of these consisted of pasteurization at 56 °C for 60 min while in the second case the sample was pasteurized at 57 °C for 10 min and then transferred directly to thermos bottle which had been preheated with boiling water, where it remained for a 1 h period. The CFU was performed according to Beerens and Luquet (1987).

The IgG quantification was made according to Mancini et al. (1965) with some modifications. Briefly, the agar was prepared by adding 1 l of glycine buffer pH 7 (7.5 g glycine, 100 ml EDTA 0.4 M, in distilled water, and adjusting the volume to 1 l) to 20 g of agar. This suspension was placed in a boiling water-bath and stirred until all the agar had dissolved, after which it was cooled to 60 °C. The antiserum (previously made by rabbit immunization with goat IgG) or a suitable dilution of it made in glycine buffer was heated to 55 °C, after which both solutions were mixed thoroughly, avoiding bubbling, with the aid of a pipette preheated to 60 °C in the water-bath. The antiserum–agar mixture was immediately poured into the petri dish with a final agar thickness of 0.3 cm. The petri dish was sealed and stored at 4 °C until use. Circular wells were punched in the gel, using a 3 mm bore needle. The small cylinders of gel cut out by the needle were removed by suction. Each of the wells received 10 µl of antigen solution (standard curve) or blood serum. In each petri dish three wells received antigen solution for the preparation of the standard curve, which was prepared according to the method used by Catty and Raykundalia (1988).

With reference to statistical analysis, in experiment 1, a one-way analysis was used to test the effect of time on IgG colostrum concentration, in experiment 2, a GLM procedure was used, including number of cycle and thawing methods as fixed effects, and in

experiment 3, a one-way analysis was used to test the effect of pasteurization on IgG colostrum concentration and differences between means were tested by the Tukey *t*-test. All analysis were performed using the SPSS (v. 10.0) statistics program.

### 3. Results and discussion

Table 1 shows the evolution of IgG concentration in colostrum kept in refrigeration at 4 °C over a 91-day period. No significant statistical variation was observed ( $P = 0.579$ ) in this concentration during refrigeration time, although it did tend to diminish at the end of the experiment (24%). The main reduction occurred during the first month of the test (17%), possibly because it was during this period that the natural fermentation process of the colostrum took place. It

can be stated that refrigeration has a clear preservation effect on IgG concentration in goat colostrum, as was claimed by Valenta (1982) in his work with bovine colostrum when he observed only slight variations of IgG colostrum concentration when this was refrigerated at  $-2$  to  $+2$  °C over a 14-day period. In contrast, Mbuthia et al. (1997) observed a significant reduction in IgG concentration in colostrum stored at 28 °C. In conclusion, after 3 months of preservation at refrigeration temperatures of 4 °C, IgG levels diminish by 25%, but the colostrum is still usable for new-born kids, although where possible it would be desirable to store colostrum for no longer than a month after collection.

The freezing of colostrum is a well-known method of preservation. Morand-Fehr (1989) stated that immunoglobulins present in goat colostrum remain intact for 2 years, while Bilbao et al. (2001) ascertained that the maximum freezing time for bovine colostrum is 15 years. In Table 2, the evolution of IgG concentrations in colostrum throughout the freezing-thawing cycles with different thawing methods can be observed. There is no statistical interaction between the two effects (cycle and thawing method), since the thawing method used shows no variation with respect to IgG concentration, although the number of times the colostrum was subsequently refrozen and thawed does have a reducing effect on IgG concentration. In this experiment, the levels of reduction after seven cycles were 27, 33, 34, and 30% (thawing in hot water, refrigeration, room temperature and microwave, respectively). The thawing method used has been shown to have no statistical effect on IgG levels, which leaves each farm free to

Table 1  
IgG (mean  $\pm$  standard deviation) goat colostrum concentration during refrigeration time

Days	IgG (mg/ml)	<i>P</i>
0	32.98 $\pm$ 14.39	0.579
3	31.08 $\pm$ 14.01	
7	30.44 $\pm$ 15.16	
14	29.23 $\pm$ 14.48	
21	28.75 $\pm$ 12.67	
28	27.70 $\pm$ 10.25	
35	27.36 $\pm$ 10.41	
42	26.13 $\pm$ 14.32	
63	25.53 $\pm$ 10.07	
91	25.11 $\pm$ 9.35	

Table 2  
IgG (mean  $\pm$  standard deviation) goat colostrum concentration through freezing-thawing cycles

Cycle	Thawing method				Effects*	
	HW	CR	RT	MW	Cycle	Method
0	15.50 $\pm$ 8.36	15.50 $\pm$ 8.36	15.50 $\pm$ 8.36	15.50 $\pm$ 8.36	0.069	0.959
1	15.25 $\pm$ 7.77	15.05 $\pm$ 4.34	14.34 $\pm$ 5.39	14.39 $\pm$ 2.84		
2	14.40 $\pm$ 8.54	14.96 $\pm$ 10.01	14.16 $\pm$ 6.00	14.38 $\pm$ 5.09		
3	13.65 $\pm$ 5.30	14.29 $\pm$ 8.67	14.11 $\pm$ 6.35	14.38 $\pm$ 3.61		
4	12.96 $\pm$ 2.98	12.82 $\pm$ 3.60	13.04 $\pm$ 5.14	14.37 $\pm$ 7.48		
5	12.28 $\pm$ 3.89	10.92 $\pm$ 4.37	12.61 $\pm$ 7.12	12.45 $\pm$ 6.33		
6	11.84 $\pm$ 7.69	10.70 $\pm$ 2.82	10.97 $\pm$ 1.84	11.84 $\pm$ 4.18		
7	11.38 $\pm$ 2.85	10.40 $\pm$ 2.89	10.23 $\pm$ 0.93	10.91 $\pm$ 5.69		

HW: hot water (60 °C); CR: cold-storage room (4 °C); RT: room temperature (27 °C); MW: microwave (55 °C final temperature).

\* *P*-value.

Table 3  
IgG goat colostrum concentration before and after pasteurization

	Before	56 °C, 60 min	57 °C, 10 min + thermos bottle 60 min
IgG (mg/ml)	33.59 ± 11.91 <sup>a</sup>	21.19 ± 5.70 <sup>b</sup>	20.87 ± 7.24 <sup>b</sup>
CFU	39,300 ± 54,340 <sup>a</sup>	100 ± 316 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>

Means in the same row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). CFU: colony forming unit.

choose the thawing method which most suits it. The reduction of IgG levels after several freezing-thawing cycles is probably due to the effect of temperature changes, though on no occasion did the temperature exceed 60 °C, the temperature at which globulins begin to break up, as has been demonstrated by Anema (2000). Similar results have been obtained by Jones et al. (1987) using cattle colostrum, observing that casein, IgG and IgM concentrations were not significantly affected by microwave thawing in reference to colostrum thawed for 25 min in water at 45 °C.

With respect to the pasteurization of colostrum, Table 3 shows how this has a negative effect on IgG concentration, reducing it in the first case by 36.92% and by 37.84% in the second. The CFU was strongly reduced by both pasteurization processes. Major significant differences between the IgG concentration in colostrum prior to and after pasteurization treatments was observed, while no statistically significant differences are observable between the two treatments carried out. The reduction observed in the colostrum IgG concentration after pasteurization is greater than that observed in the results of the research carried out on bovine colostrum by Meylan et al. (1996). In complete contrast to this is the work carried out by Steinbach et al. (1981) in which no reduction in IgG concentration was observed after the pasteurization process. This apparent discrepancy could be due to the decreased exposure time to pasteurization of the colostrum used in the analysis (30 min) in comparison with our study.

In conclusion, refrigeration is a good method of IgG preservation for goat colostrum for the first 3 months, and the methods of thawing used have less effect on IgG concentration than the number of times which colostrum is thawed and refrozen. Pasteurization has a negative effect on IgG concentration, although the

effect of the latter on the transfer of passive immunity needs to be evaluated. The recommendations of this paper are to freeze in small quantities and to refrigerate left over thawed colostrum.

## Acknowledgements

The authors thank Ms. Heater R. Briggs for review of the paper for English grammar.

## References

- Adams, D.S., Klevjer-Anderson, P., Carlson, J.L., McGuire, T.C., Gorham, J.R., 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1670–1675.
- Anema, S.G., 2000. Effects of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4168–4175.
- Beerens, H., Luquet, F.M., 1987. Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et des produits laitiers. *Technique et Documentation (Lavoisier)*, Paris, 151 pp.
- Bilbao, G.N., Landi, H.G., Guarrochena, V., 2001. Calostro fermentado: una alternativa en la dieta líquida para terneros. *Nuestra Cabaña* 305, 18–23.
- Catty, D., Raykundalia, C., 1988. Gel immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining methods. In: Catty, D. (Ed.), *Antibodies*, IRL Press, Oxford, UK, pp. 137–167.
- Foley, J.A., Oterby, D.E., 1978. Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: a review. *J. Dairy Sci.* 61, 1033–1060.
- Guerrault, P., 1990. Apport de colostrum: plusieurs methodes. *La Chevre* 180, 30–31.
- Holloway, N.M., Tyler, J.W., Lakritz, J., Carlson, S., Holle, J., 2001. Serum immunoglobulins G concentrations in calves fed fresh and frozen colostrum. *JAVMA* 219, 357–359.
- Jenny, B.F., Hodge, S.E., O'Dell, G.D., Eilers, J.E., 1984. Influence of colostrum preservation and sodium bicarbonate on performance of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 67, 313–318.
- Jones, L.R., Taylor, A.W., Hines, H.C., 1987. Characteristics of frozen colostrum thawed in a microwave oven. *J. Dairy Sci.* 70, 1941–1945.
- Klobasa, F., Goel, M.C., Werhahn, E., 1998. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. *J. Anim. Sci.* 76, 923–926.
- Lakritz, J., Tyler, J.W., Hostetler, D.E., Marsh, A.E., Weaver, D.M., Holle, J.M., Stevens, B.J., Denbigh, J.L., 2000. Effects of pasteurization of colostrum on subsequent serum lactoferrin concentration and neutrophil superoxide production in calves. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1021–1025.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235–254.

- Mbuthia, E.W., Klobasa, F., Gachuri, C.K., Abate, A., 1997. Effect of treatment with formaldehyde and formic acid on immunoglobulin content of stored bovine colostrum. *Anim. Feed Sci. Tech.* 67, 291–298.
- Meylan, M., Rings, D.M., Shulaw, W.P., Kowalski, J.J., Bech-Nielsen, B., Hoffsis, G.F., 1996. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1580–1585.
- Moore, E.C., Keil, D., Coats, K., 1996. Thermal inactivation of bovine immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Micro.* 62, 4280–4283.
- Morand-Fehr, P., 1989. Influence of environment on mortality of kids. *Colloq. Inst. Natl. Rech. Agron.* 28, 31–46.
- Muller, L.D., Syhre, D.R., 1975. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. *J. Dairy Sci.* 58, 957–961.
- Ramírez, A., Quiles, A., Hevia, M.L., Sotillo, F., Ramírez, M.C., 1996. Influence of forced contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of postpartum separation. *Small Rumin. Res.* 23, 75–81.
- Skrivanova, V., Skrivan, M., Dobsinsky, O., 1984. Frozen colostrum as a source of immunoglobulins for calves in the first days of life. *Zivocisna Vyroba.* 29, 131–136.
- Steinbach, G., Kreutzer, B., Meyer, H., 1981. Zum einfluss der erwärmung auf den immunbiologischen wert des rinderkolostrums. *Monatshefte Veterinarmedizin* 36, 29–31.
- Tyler, J.W., Lakritz, J., Hostetler, D.E., Douglas, V., Weaver, D.M., Steevens, B.J., Holte, J., Denbigh, J., 2000. Effect of pasteurization at 76 and 63 °C on the absorption of colostrum IgG in calves. *J. Dairy Res.* 67, 619–623.
- Valenta, J., 1982. Short term preserved colostrum in the rearing of calves. *Veterinarstvi* 32, 410–411.
- Voigtlander, K.H., 1981. Experiments on preserving and storing colostrum. *Arch. Tierzucht.* 24, 297–303.

**Enviado a Journal of Animal and Feed Sciences**

1 Influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on colostrum quality  
2 and passive immunity transfer in dairy goats

3

4 Castro, N.<sup>1</sup>, Capote, J.<sup>2</sup>, Martín, D.<sup>2</sup>, Argüello, A.<sup>1\*</sup>

5

6 <sup>1</sup> Animal Production Unit, Las Palmas de Gran Canaria University,  
7 35416-Arucas, Las Palmas, Spain. Phone: +34-928-451093, Fax: +34-  
8 928-451142. E-mail: [aarguello@dpato.ulpgc.es](mailto:aarguello@dpato.ulpgc.es)

9 <sup>2</sup> Canary Agronomic Science Institute, Apt. 60, La Laguna, Tenerife,  
10 Spain.

11

12 \*Corresponding Author (A. Argüello): Phone: +34-928-451093, Fax: +34-  
13 928-451142, E-mail: [aarguello@dpato.ulpgc.es](mailto:aarguello@dpato.ulpgc.es)

14

15 Summary

16 Effect of CLA dietary inclusion on colostrum quality and passive  
17 immunity transfer were evaluated. Experiment 1- 20 goats were allotted  
18 in two groups, CLA group received 20g/Kg of dry matter of CLA 60 and  
19 control group received 0 g/Kg of CLA 60, from the third month of  
20 gestation until partum. Blood samples were taken from 1 day before  
21 CLA inclusion to partum every fortnight. From partum until 96 hours,  
22 blood and colostrum samples were taken every 24 hours. Before partum  
23 IgG serum blood levels were 15.56 and 9.42 mg/ml (CLA and control  
24 respectively), the time effects was statistically significant. After partum  
25 (96 hours) the effect of CLA dietary inclusion was statistically  
26 significant. Experiment 2- 30 male new born kids were allotted in two

1 groups, control group were fed with frozen goat colostrum and CLA  
2 group received CLA, 20g/l of colostrum of CLA 60. Blood samples were  
3 taken from birth to 120 hours postpartum every 12 hours. No statistical  
4 effect of CLA colostrum inclusion was found.

5

6 Keywords: Conjugated Linoleic acid, goat, IgG.

7

8

9 Introduction

10

11 Conjugated linoleic acid (CLA) is a group of positional and  
12 geometrical isomers derived from linoleic acid that have conjugated  
13 double-bond systems. The c-9 t-11 isomer was thought to be the  
14 biologically active form. In recent years, CLA has gained a great deal of  
15 attention due to its purported protective properties against cancer and  
16 heart disease and evidence suggests that CLA can also regulate immune  
17 functions (Ha *et al.* 1987; Sugano *et al.* 1998). The effect of CLA on the  
18 immune system has not been well investigated but it is a natural  
19 product that enhances immune function while decreasing the negative  
20 effects of inflammatory responses (Bassaganya *et al.* 2001). There is no  
21 information about the effect of dietary CLA in dairy goat  
22 Immunoglobulin G (IgG) colostrum and passive immune transfer in goat  
23 kids. The first objective of this study was to value the effect of the  
24 inclusion of CLA in the diet on IgG concentration in colostrum and  
25 blood serum of Majorera goats from the third month of gestation until  
26 96 hours postpartum. The second objective was to evaluate the effect of

1 the inclusion of CLA in the diet on IgG concentration in blood of new-  
2 born goat kids.

3

#### 4 Material and Methods

5

6 Objective 1. Twenty pregnant goats of Majorera breed were used  
7 in this study. These animals were divided into two groups based on diet.  
8 For this research, a commercial CLA preparation (CLA-60, Grunau  
9 Gmbh, Illertissen, 89257, Germany) containing 60% CLA isomers was  
10 included at 20 g/Kg of dry matter to provide 12 g/Kg CLA in the diet for  
11 the CLA group (n=10), this CLA was added to diet from the third month  
12 of gestation until the parturition. The control group received a control  
13 diet (0 g/Kg CLA). The animals were fed according to INRA (Jarrige,  
14 1990) with corn, soy 66, dehydrated Lucerne, dehydrated beetroot,  
15 wheat straw and a vitamin-mineral corrector. A blood sample was taken  
16 from each animal before the inclusion of CLA in the diet and from that  
17 moment onwards, three samples were collected every fortnight until the  
18 moment of partum. From partum until 96 hours, five blood and  
19 colostrum samples were taken every 24 hours.

20

21 Objective 2. Thirty male new born kids of Majorera breed were  
22 used. Immediately after birth they were separated from their mothers  
23 and then dried, their umbilical cords were disinfected, they were  
24 weighed and identified and randomly distributed in two groups. The  
25 kids were fed with frozen goat colostrum the first being fed within the  
26 first hour of life. The colostrum given (8.95% Gross protein, 8.66% Fat,

1 3.91% Lactose, 30.69 mg/ml IgG) was pooled from fresh goat colostrum  
2 and frozen (-20°C) until use. The frozen colostrum was defrosted at  
3 room temperature and after that was warmed to 40°C (internal  
4 temperature) in microwave ovens (rotary microwave). For this research,  
5 a commercial CLA preparation (CLA-60, Grunau GmbH, Illertissen,  
6 89257, Germany) containing 60% CLA isomers was included at 20 g/l  
7 of colostrum to provide 12 g/l CLA in the diet for the CLA group (n=15).  
8 This CLA was added to colostrum from birth until the day two of life.  
9 The control group received a control diet (0 g/l CLA). The CLA and  
10 control groups were fed colostrum from birth, twice per day, for two  
11 days, each kid receiving 5% of body weight per feed according Argüello  
12 et al. (2004). Subsequently, milk replacer was fed in accordance with  
13 Argüello (2003). To determine the levels of IgG in the kids' blood,  
14 samples from the jugular vein were taken every twelve hours from birth  
15 to 120 hours postpartum.

16

17 Blood from the goat and the kids was centrifuged immediately  
18 and the serum obtained was frozen at -20°C until its analysis. The IgG  
19 quantification was made according to Mancini et al. (1965). The  
20 standard curve was prepared according to Catty and Raykundalia  
21 (1988) using a goat IgG solution (30 mg/ml, Sigma-Aldrich, St Louis,  
22 Missouri 63178, USA). The colostrum samples were divided into two  
23 aliquots and stored at -20°C until analysis of the IgG. The effect of CLA  
24 dietary treatment and time was analyzed using the GLM procedure  
25 repeated measures analysis (SPSS V. 8.0 software).

26

## 1 Results and Discussion

2

3 Table 1 shows the evolution of goat serum IgG concentration from  
4 third month of gestation until fifteen days before partum. The time  
5 evolution effect is statistically significant on IgG blood serum content  
6 which is in accordance with the findings of Ha *et al.* (1986) who found  
7 that colostrum IgG is selectively transported from blood serum to lacteal  
8 fluid before partum. However, no significant statistical variation was  
9 observed due to dietary inclusion of CLA, although a trend can be  
10 observed. Table 1 shows that the reduction in the IgG concentration is  
11 marked in the animals that received the control diet, although the  
12 animals that received CLA show superior values of IgG thirty days  
13 before partum and then continued increase. The differences between  
14 the control group and the CLA group were also more marked fifteen  
15 days before partum. Blood serum IgG decreased in the CLA group by  
16 6.26% and in the control group by 38.67% during prepartum period.  
17 Sugano *et al.* (1999) working with rats, found that feeding CLA  
18 significantly raised the levels of immunoglobulins in serum, which is in  
19 agreement with the results shown in Table 1. The CLA dietary effect  
20 could have been stronger if the experiment had lasted for a longer time,  
21 because the effect of CLA on the modulation of the immune function is  
22 not immediate. The effects of an experiment which lasted for a longer  
23 time has already been described by Bassaganya *et al.* (2001) in a study  
24 made on the immune competence in nursery pigs. It would also be  
25 necessary to take into consideration the fact that this study was made  
26 with adult goats and the CLA cannot have as much influence on the

1 immune system if it is completely developed, which would agree with  
2 that observed by Corino *et al.* (2002) who studied the effect of the CLA  
3 on the immune system of weaned pigs and who concluded that this  
4 fatty acid enhances the immune response in young animals that have  
5 not yet developed a specific immune response repertoire. Analogous  
6 results found by Hayek *et al.* (1999) in mice show that the effects of CLA  
7 were less in old mice than in young ones.

8  
9 Table 2 shows the IgG serum blood evolution from partum until  
10 96 hours postpartum. No significant statistical time effect was observed  
11 on IgG blood serum. A high variability in results and a stable evolution  
12 of IgG blood serum in the control diet could be the reason for not  
13 finding a time effect. CLA dietary effect was statistically significant on  
14 IgG blood serum postpartum so the animals that received CLA  
15 recovered their immune function faster than the control group with  
16 values of 10.04 *vs* 9.53 mg/ml after birth to 15.49 *vs* 10.56 mg/ml at  
17 96 hours postpartum (CLA and control respectively). After partum, IgG  
18 selective transfer from blood to colostrum finished, and IgG blood rose  
19 to non-pregnant values. This recovery could be faster in the CLA group  
20 than in the control animals because the CLA has had enough time to  
21 activate lymphocytes and there is also the possibility that a high CLA  
22 concentration is released from adipose tissue after partum.

23  
24 With reference to the colostrum IgG concentration, Table 3 shows  
25 that time has a significant statistical effect on this, a overall descending  
26 evolution having been observed in the 48 hours postpartum. This fact

1 has been described previously by Argüello (2003) in goats of the  
2 Majorera breed. However the IgG concentration is not affected by the  
3 treatment (CLA dietary inclusion also), similar results have been found  
4 in both animal groups (CLA and control). Saturation in the selective  
5 transport of IgG from blood to colostrum may be the reason for these  
6 results. More experiments are necessary in order to clarify this  
7 question.

8

9 Table 4 shows the effect of CLA on passive immune transfer in  
10 kids. No statistical effect of CLA colostrum inclusion has been found. No  
11 experiments regarding the effect of CLA colostrum addition in new born  
12 passive immune transfer have been done either in goats or other  
13 species. Yamasaki et al. (2000) reported that rats receiving dietary CLA  
14 showed an increase in immunoglobulin productivity due to lymphocytes  
15 activity, but endogenous IgG production started after fifteen days of life  
16 in goat kids (Argüello et al. 2004). This could be the reason for not  
17 discovering differences between CLA and control kids.

18

## 19 Acknowledgements

20

21 The authors thank Ms. Heater R. Briggs for review of the paper for  
22 English grammar and Reproduction Unit Staff of Las Palmas de Gran  
23 Canaria University for his help and assistance.

24

25

26

27

28

## 1 References

2

3 Argüello, A., 2000. Lactancia artificial de cabritos, encalostrado,  
4 crecimiento, calidad de la canal y de la carne. PhD Thies. Las Palmas de  
5 Gran Canaria University, Spain.

6 Argüello, A., Castro, N., Zamorano, M.J., Castroalonso, A., Capote, J.  
7 2004. Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and  
8 frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. *Small Rum.*  
9 *Res.* 54, 237-241

10 Bassaganya-Riera, J., Hontecillas-Magarzo, R., Bregendahl, K.,  
11 Wannemuehler, M.J., Zimmerman, D.R., 2001. Effects of dietary  
12 conjugated linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments  
13 on growth, empty body composition, and immune competence. *J. Anim.*  
14 *Sci.* 79, 714-721

15 Corino, C., Bontempo, V., Sciannimanico, D., 2002. Effects of dietary  
16 conjugated linoleic acid on some aspecific immune parameters and  
17 acute phase protein in weaned piglets. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 115-117

18 Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W., 1987. Anticarcinogens from Fried  
19 Ground beef: Heated-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*,  
20 8, 1881-1887

21 Ha, W.K., Lim, J.W. Choi, C.K., 1986. A study on the immunoglobulin G  
22 concentration in milk and blood serum of Korean native goats. I.  
23 Changes os IgG concentration on the lactation period of Korean native  
24 goats. *Korean J. Anim. Sci.* 28, 679-683

25 Hayek, M.G., Han, S.N., Wu, D., Watkins, B.A., Meydani, M., Dorsey,  
26 J.L., Smith, D.E., Meydani, S.N., 1999. Dietary conjugated linoleic acid

- 1 influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR  
 2 mice. *J. Nut.* 129, 32-38
- 3 Jarrige, J., 1990. Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Mundi  
 4 Prensa, Madrid, Spain.
- 5 Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical  
 6 quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.  
 7 *Immunochemistry*, 2, 235
- 8 Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M., Yamada, K., 1998.  
 9 Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators  
 10 and immunoglobulin in rats. *Lipids*, 33, 521-527
- 11 Sugano, M., Yamasaki, M., Yamada, K., Huang, Y.S., 1999. Effect of  
 12 Conjugated linoleic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and  
 13 immune function. In *Advances in Conjugated linoleic acid research*,  
 14 Volume 1. (Yurawecz *et al.* Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois,  
 15 USA, 327-339.

16

17 Table 1. IgG goat blood concentration before the birth.

18

Time	IgG blood (mg/ml)		Effects (P<)	
	Control	CLA	Time	Treatment
3 m	15.36±5.55	16.60±2.25	0.021	0.062
3.5 m	13.22±3.81	11.85±4.85		
4 m	11.32±4.37	15.26±9.44		
4.5 m	9.42±1.73	15.56±6.08		

19

m: month of gestation.

20

1 Table 2. IgG goat serum blood concentration postpartum.

2

Time	IgG blood (mg/ml)		Effects (P<)	
	Control	CLA	Time	Treatment
0 h	9.53±2.42	10.04±2.89	0.430	0.014
24 h	9.53±3.04	13.31±4.34		
48 h	10.99±5.41	13.15±6.22		
72 h	10.81±2.48	12.48±2.20		
96 h	10.56±3.67	15.49±8.25		

3 h : hours postpartum.

4  
5 Table 3. IgG colostrum concentration from birth to 96 hours  
6 postpartum.

7

Time	IgG colostrum (mg/ml)		Effects (P<)	
	Control	CLA	Time	Treatment
0 h	32.44±8.98	33.41±20.22	0.000	0.344
24 h	19.26±9.02	23.73±16.20		
48 h	7.88±4.87	11.31±6.94		
72 h	3.94±3.83	4.88±4.44		
96 h	1.50±1.45	2.21±1.91		

8 h : hours postpartum.

1  
2  
3  
4

Table 4. IgG kid blood concentration from birth to 120 hours postpartum.

Time	IgG blood (mg/ml)		Effects (P<)	
	Control	CLA	Time	Treatment
0 h	0	0	0.000	0.778
12 h	6.22±2.65	6.39±3.56		
24 h	8.69±2.93	10.65±6.88		
36 h	9.67±2.85	10.89±5.130		
48 h	11.31±4.15	11.65±4.68		
60 h	10.44±2.23	10.54±3.01		
72 h	10.28±3.87	9.36±2.73		
84 h	9.04±1.50	9.99±2.64		
96 h	9.49±2.40	9.26±4.61		
108 h	8.98±1.64	8.95±2.39		
120 h	8.89±1.44	8.08±1.40		

5

h: hours postpartum.

**Enviado a Journal of Animal Science**

1 **Running head**

2

3 Effects of CLA on Nitric Oxide Serum in Goat Kids

4

5 **Title**

6

7 Effect of dietary conjugated linoleic acid on serum levels of nitric oxide and L-citrulline in  
8 goat kids<sup>a</sup>

9

10 Castro, N.<sup>1</sup>, Acosta, F.<sup>1</sup>, Capote, J.<sup>2</sup> and Argüello, A.<sup>1\*</sup>

11

12 <sup>1</sup>Department of Animal Science, Las Palmas de Gran Canaria University, Arucas 35416,  
13 Spain

14 <sup>2</sup>Canary Agronomic Science Institute, La Laguna. Tenerife. Spain

15

16

17

18

19

20

21

22

---

\* Correspondence (A. Argüello): Fac. Veterinaria, Transmontaña s/n, 35416-Arucas, Spain.

(phone: 34+928451093; Fax: 34+928451142; e-mail: aarguello@dp.at.ulpgc.es

<sup>a</sup>The authors thank Dr. Ellis for scientific and language assistance.

## ABSTRACT

New born kids, 40 males, were allotted in two groups for evaluating the effects of dietary CLA on nitric oxide (NO) and L-Citrulline levels in serum. The control group received no supplement CLA-60 and treatment groups received 20g/kg DM of CLA-60 from birth to one month of age. Kids were fed colostrum for two days and milk replacer from day 3 to 29. Blood samples (n=40) were taken at 1, 8, 15, 22 and 29 days of age. NO metabolite (nitrite + nitrate) values in serum ranged from 21.93 to 26.15 and 34.90 to 40.59  $\mu\text{mol}$  in 0 and 20 g/kg DM CLA-60 kids respectively, being statistically higher in 20 g/kg CLA-60 kids. L-Citrulline values ranged from 0.30 to 0.40 and 15.54 to 19.81  $\mu\text{mol}$  in 0 and 20 g/kg DM CLA-60 kids respectively, being statistically higher in 20 g/kg CLA-60 kids.

Key word: Goat Kid, Conjugated Linoleic Acid, Nitric Oxide, L-Citrulline.

## Introduction

When artificially rearing goats it is not recommended to feed the colostrum directly from the mother because the rapid maternal-filial bond (Ramírez et al., 1996) will make their subsequent adjustment to the artificial teats more difficult, causing a delay in their growth (Argüello, 2000). The latter system is of particular interest in areas where diseases such as caprine arthritis encephalitis virus are present, since colostrum is one of the direct means of transmission (Guerrault, 1990). Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional (9,11; 10,12; or 11,13) and geometric (cis or trans) isomers of conjugated octadecadienoic (18:2 n.6) acid with broad biological activities. CLA is anticarcinogenic (Ha et al., 1990; Pariza, 1991; Ip and Scimeca, 1997), antidiabetic (Houseknecht et al., 1998), antiatherogenic

1 (Nicolosi et al., 1993; Lee et al., 1994), and immunomodulatory (Sugano et al., 1998;  
2 Bassaganya-Riera et al., 1999; Hayek et al., 1999). In the European Union, the use of  
3 antimicrobials at subtherapeutical levels has been banned. In the United States, dietary  
4 immunomodulation by using orally active natural products might become a strategy adopted  
5 by producers as a means of maintaining current productivity levels after withdrawal of  
6 antibiotics at growth-promoting levels from livestock dietary formulations.

7  
8 Nitric oxide (NO) is an inorganic, short-lived (a few seconds) free radical gas that, due  
9 to its high solubility, freely diffuses through biological membranes. It is synthesized from L-  
10 arginine via an oxygen and NADPH dependent reaction that yields NO and L-citrulline (Bush  
11 et al., 1992). Nitric oxide synthesis depends on the action of a NO synthase (NOS), an  
12 enzyme that exists in three isoforms that have been classified depending on tissue of origin as  
13 well as on functional properties. Two of them (neuronal, nNOS and endothelial, eNOS) are  
14 constitutive and seem to be responsible for the continuous basal release of NO; the third one  
15 is inducible (iNOS) and is expressed in response to inflammatory cytokines and  
16 lipopolysaccharides (Morris and Billiar, 1994). The three isoforms have been found in a  
17 variety of cell types, including neurons, gastric and bronchial epithelium, skeletal muscle,  
18 macrophages, cardiomyocytes, hepatocytes, and chondrocytes. The production of NO is  
19 therefore almost ubiquitous. Nitric oxide is involved in a wide range of functions: It  
20 determines vasodilation, inhibits platelet aggregation and neutrophil adhesion to endothelial  
21 cells, reduces smooth-muscle cell proliferation and migration, controls apoptosis, sustains  
22 endothelial cell barrier function (Rosselli et al., 1998), is a neurotransmitter and acts as an  
23 antimicrobial. The objective of the present work was to evaluate the effect of CLA addition in  
24 milk replacer on nitric oxide synthesis in suckling goat kids.

25

## Material and Methods

Forty male new born kids of Majorera breed were immediately separated from their mothers after birth and then dried, their umbilical cords disinfected, they were weighed and identified and randomly distributed in two groups. For this research, a commercial CLA preparation (CLA-60, Grunau GmbH, Illertissen, 89257, Germany) containing 60% CLA isomers was included at 20 g/kg DM of colostrum to provide 12 g/kg DM CLA in the diet for the CLA group (n=20). This CLA was added to colostrum or milk replacer from birth until one month of age. The control group received a control diet (0 g/l CLA). The kids were fed with frozen goat colostrum, the first being fed within the first hour of life. The colostrum given (8.95% Gross protein, 8.66% Fat, 3.91% Lactose, 30.69 mg/ml IgG) was pooled from fresh goat colostrum and frozen (-20°C) until use. The frozen colostrum was defrosted at room temperature and after that was warmed to 40°C in microwave ovens (rotary microwave). The CLA and control groups were fed colostrum from birth, twice per day, for two days, each kid receiving 5% of body weight per feed according to Argüello (2000). Subsequently, milk replacer (Bacilactol Cabritos, Saprogal, La Coruna, Spain) was fed in accordance with Argüello et al. (2004). To determine the levels of NO and L-Citrulline in the kid's blood, samples from the jugular vein were taken at 1, 8, 15, 22 and 29 days of life. Blood from kids was centrifuged immediately and the serum obtained was frozen at -20°C until analyzed. Total NO metabolites (nitrite + nitrate) in serum were determined by using the nitrate reductase method essentially as described Schmidt et al. (1989). The L-Citrulline by-product of NO biosynthesis was determined by a standard colorimetric assay (Boyle and Rahmatullah, 1980). The effect of CLA dietary treatment on serum NO and L-Citrulline was analyzed using the GLM procedure repeated measures analysis (SPSS V. 11.0 software).

## Results and Discussion

NO and L-Citrulline values in control and 20 CLA-60 g/kg DM kid's serum are shown in Table 1. NO metabolite values in serum ranged from 21.93 to 26.15 and 34.90 to 40.59  $\mu\text{mol}$  in 0 and 20 g/kg DM CLA-60 kids respectively, being statistically higher in 20 g/kg CLA-60 kids. L-Citrulline values ranged from 0.30 to 0.40 and 15.54 to 19.81  $\mu\text{mol}$  in 0 and 20 g/kg DM CLA-60 kids respectively, being statistically higher in 20 g/kg CLA-60 kids. Using all samples, NO metabolites increased 14.96  $\mu\text{mol}$  and L-Citrulline 16.25  $\mu\text{mol}$ , being practically equimolar according to Acosta et al. (2004) and Acosta et al. (in press). No references about the effect of CLA on NO production *in vivo* are reported. Bassayange-Riera et al. (2001) observed that dietary conjugated linoleic acid expands peripheral porcine CD8<sup>+</sup> lymphocyte subsets and enhances lymphocyte proliferation in both clean and dirty environments. Thus, CLA was a nutraceutical that enhances cellular immunity. *In vitro* studies, Yu et al. (2002) reported that CLA acted as an anti-inflammatory agent, observing that CLA decreased the IFN $\gamma$ -dependent expression of inducible NOS (iNOS) and iNOS promoter activity in a concentration-dependent manner. The functional consequence of inhibited expression of iNOS by CLA was strengthened by the finding of decreased NO production in response to IFN $\gamma$ . In the present study, the higher NO and L-Citrulline level in the serum of kids receiving 20 g/kg DM dietary CLA-60 may not be produced by iNOS but could be produced by nNOS or eNOS. More experiments are needed to discover the origin and functions of increased production of NO.

## Literature Cited

- 1  
2
- 3 Acosta, F., C. M. Ruiz de Galarreta, A. E. Ellis, R. Díaz, V. Gómez, D. Padilla, and F. Real.  
4 2004. Activation of the nitric-oxide response in gilthead seabream after experimental  
5 infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish*  
6 *Immunology*, 16:581-588.
- 7
- 8 Acosta, F., F. Real, A. E. Ellis, C. Tabraue, D. Padilla, and C.M. Ruiz de Galarreta. Influence  
9 of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection  
10 with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology*. In  
11 press.
- 12
- 13 Argüello, A. 2000. Lactancia artificial de cabritos: encalostrado, crecimiento, calidad de la  
14 canal y de la carne. Ph.D. Diss., Las Palmas de Gran Canaria University, Las Palmas,  
15 Spain.
- 16
- 17 Argüello, A., N. Castro, and J. Capote. 2004. Growth of milk replacer kids fed under three  
18 different managements. *J. Appl. Anim. Res.* 25:37-40.
- 19
- 20 Bassaganya, J., R. Hontecillas, K. Bregendahl, M. J. Wannemuehler, and D. R. Zimmerman.  
21 1999. Dietary conjugated linoleic acid increases CD8 T lymphocyte subpopulation in  
22 weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 1):119(Abstr.).
- 23
- 24 Bassaganya-Riera, J., R. Hontecillas-Magarzo, K. Bregendahl, M. J. Wannemuehler, and D.  
25 R. Zimmerman. 2001. Effects of dietary conjugated linoleic acid in nursery pigs of

1 dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune  
2 competence. *J. Anim. Sci.* 79:714-721.

3

4 Boyde, T. R., and M. Rahmatullah. 1980. Optimization of conditions for the colorimetric  
5 determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* 15:424-431.

6

7 Bush, P. A., N. E. Gonzales, J. M. Griscavage, and L. J. Ignarro. 1992. Nitric oxide synthase  
8 from cerebellum catalyses the formation of equimolar quantities of nitric oxide and  
9 citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:960-966.

10

11 Guerrault, P. 1990. Apport de colostrum: plusieurs methodes. *La Chevre*, 180:30-31.

12

13 Ha, Y. L., J. Storkson, and M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse  
14 forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*  
15 50:1097-1101.

16 Hayek, M. G., S. N. Han, D. Wu, B. A. Watkins, M. Meydani, J. L. Dorsey, D. E. Smith, and  
17 S. N. Meydani. 1999. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response  
18 of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *J. Nutr.* 129:32-38.

19

20 Houseknecht, K. L., J. P. Vanden Heuvel, S. Y. Moya-Camarena, C. P. Portocarrero, L. W.  
21 Peck, K. P. Nickel, and M. A. Belury. 1998. Dietary conjugated linoleic acid  
22 normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem.*  
23 *Biophys. Res. Commun.* 244:678-682.

24

- 1 Ip, C., and J. A. Scimeca. 1997. Conjugated linoleic acid and linoleic acid are distinctive  
2 modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 27:131-135.
- 3
- 4 Lee, K. N., D. Kritchevsky, and M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and  
5 atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108:19-25.
- 6
- 7 Morris, S. M., and T. R. Billiar. 1994. New insights into the regulation of inducible nitric  
8 oxide synthesis. *Am. J. Physiol.* 266:E829-E839.
- 9
- 10 Nicolosi, R. J., K. V. Courtemanche, L. Laitinen, J. A. Scimeca, and P. J. Huth. 1993. Effect  
11 of feeding diets enriched in conjugated linoleic acid on lipoproteins and aortic  
12 atherogenesis in hamsters. *Circulation* 88:2458(Abstr.).
- 13
- 14 Pariza, M. W. 1991. A new cancer inhibitor in dairy products. *Bull. Int. Dairy Fed.* 257:29-  
15 30.
- 16
- 17 Ramírez, A., A. Quiles, M. L. Hevia, F. Sotillo, and M. C. Ramírez. 1996. Influence of forced  
18 contact on the maternal-filial bond in the domestic goat after different periods of  
19 postpartum separation. *Small Rum. Res.* 23:75-81.
- 20
- 21 Rosselli, M., P. J. Keller, and R. K. Dubey. 1998. Role of nitric oxide in the biology,  
22 physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 4:3-24.
- 23

1 Schmidt, H. H. H. W., R. Seifert, and E. J. N. Bohme. 1989. Formation and release of nitric-  
2 oxide from human-neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide,  
3 platelet activating factor and leukotriene-B4. FEBS Letters, 244:357.  
4

5 Sugano, M., A. Tsujita, M. Yamasaki, M. Noguchi, and K. Yamada. 1998. Conjugated  
6 linoleic acidmodulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in  
7 rats. *Lipids* 33:521-527.  
8

9 Yu, Y., P. H. Correll, and J. P. Van den Heuvel. 2002. Conjugated linoleic acid decreases  
10 production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR  
11 gamma-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1581: 89-99.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

1 Table 1. Nitric oxide and L-Citrulline levels on blood serum kids.

Item	Dietary CLA-60 <sup>1</sup>		SE <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>
	0 g/kg DM	20 g/kg DM		
	LSM <sup>2</sup>			
Nitric oxide (µmol)				0.001
....1 day	21.93	40.32	0.79	
....8 day	24.04	40.59	1.02	
....15 day	25.04	40.30	0.85	
....22 day	26.15	34.90	1.04	
....29 day	23.38	39.22	0.87	
L- Citrulline (µmol)				0.001
....1 day	0.30	19.81	0.51	
....8 day	0.35	15.71	0.40	
....15 day	0.40	15.54	0.46	
....22 day	0.31	15.91	0.36	
....29 day	0.32	15.97	0.51	

2 <sup>1</sup>Congugated linoleic acid.

3 <sup>2</sup>Least square mean

4 <sup>3</sup>Standar error

5 <sup>4</sup>P values

6