



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MEDICINA Y SALUD ANIMAL

**“EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN ALIMENTICIA EN LA
ÚLTIMA FASE DE LA GESTACIÓN SOBRE LA CANTIDAD Y
CALIDAD DE CALOSTRO PRODUCIDO POR CABRAS LECHERAS
PRIMERIZAS Y LA INMUNIDAD TRANSMITIDA A LAS CRÍAS.”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

ALMA FLOR ISLAS RUEDA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. LORENZO ÁLVAREZ RAMÍREZ-CEIEPAA-FMVZ-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ANDRÉS ERNESTO DUCOING WATTY-FMVZ-UNAM

DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ-FES-CUAUTITLÁN

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Si los seres humanos utilizáramos nuestros recién adquiridos conocimientos científicos (física cuántica, genética, etc.) apropiadamente, fortaleceríamos la sensación de afinidad y de unidad, no sólo con nuestros semejantes sino también con todas las formas de vida.

Esta perspectiva sostendría, consecuentemente, una conciencia medioambiental más adecuada y saludable"

Dalai Lama, El universo en un solo átomo, Editorial Grijalbo.

Dedicatoria

A mi madre y abuela, por su ejemplo de lucha y perseverancia

A mi esposo Manuel, por ser mi compañero de vida

A mis hermanos, por su apoyo

A mi familia humana y de otras especies...

Goya, te lo prometí

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por darme la oportunidad de continuar con mis estudios.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) por las facilidades otorgadas durante la realización de la tesis.

Al departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado.

A todas las personas involucradas en la realización de esta tesis:

Mi tutor, Lorenzo Álvarez Ramírez, por brindarme su confianza, sus consejos siempre valiosos, paciencia y todas las enseñanzas.

A los integrantes del comité tutor, los doctores Jorge Tórtora Pérez y Andrés Ducoing Watty, por su disposición y valiosas aportaciones para la realización de esta tesis.

A la Dra. Myrna Vicencio Mallén, por estar siempre al pendiente de mi trabajo e iniciar la primera página del proyecto, pero además, por la gran amistad y cariño que nos une.

Al MVZ. Daniel Atilano López, su apoyo fue fundamental en la realización de esta tesis, y su amistad aún más importante.

A la Ing. Delia Gaspar Sánchez por su colaboración en la realización del análisis fisicoquímico del calostro.

A los trabajadores del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Eloy e Hilda, por su apoyo, compañía y amistad durante el trabajo de campo.

A los alumnos de tesis, servicio social y estancia que colaboraron durante el muestreo.

A los miembros de mi jurado, los doctores Laura Cobos Marín, Humberto Alejandro Martínez Rodríguez, Efrén Ramírez Bibriesca y Julio César Cervantes Morali por su disposición y comentarios para mejorar la tesis.

A los animales que formaron parte de este trabajo, es por ustedes y para ustedes.

Índice

Portada	i
Cita	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
1- Resumen	1
2- Abstract	2
3- Introducción	3
3.1- El calostro: definición	3
3.2- Función y características del calostro	4
3.3- Factores que afectan la calidad y cantidad de calostro	6
4- Justificación	9
5- Objetivo general	10
5.1- Objetivos específicos	10
6- Hipótesis	11
7- Material y métodos	12
7.1- Primera fase: Muestreo durante la complementación, producción y características del calostro	13
7.2- Segunda fase: Consumo de calostro por las crías, niveles de glucosa e inmunoglobulinas sanguíneas en cabritos	17
8- Análisis de la información	18
9- Resultados	19
9.1- Concentración sérica de glucosa en las cabras	19
9.2- Prolificidad al parto y peso de los cabritos al nacimiento	19
9.3- Volumen (ml) y densidad del calostro	21
9.4- Composición fisicoquímica del calostro	24
9.4.1- Grasa	24

9.4.2- Proteína	25
9.4.3- Lactosa	26
9.4.4- Sólidos no grasos	27
9.5- Concentración de inmunoglobulinas totales en el calostro a las 0, 6 y 12 horas desde el parto	28
9.6- Consumo de calostro por los cabritos (ml)	30
9.7- Correlación del consumo con el peso al nacimiento	32
9.8- Correlación del consumo con el porcentaje de inmunoglobulinas totales en suero de los cabritos	32
9.9- Concentración de inmunoglobulinas totales en el suero sanguíneo de los cabritos a las 0, 6, 12 horas y a los 21 y 42 días desde el parto	34
10- Discusión	36
11-Conclusiones	43
12- Bibliografía	44
13- Apéndices	54
13.1- Soluciones para electroforesis	54
13.2- Soluciones para purificación de IgG	57
13.3- Purificación de IgG mediante precipitación con sulfato de amonio	59
13.4 Prueba de Cloruro de Bario	60

1- Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la complementación alimenticia en la última fase de la gestación sobre la concentración de glucosa sanguínea, características fisicoquímicas e inmunoglobulinas totales del calostro producido por cabras lecheras primerizas y la concentración de inmunoglobulinas séricas en sus crías. Fueron utilizadas 20 cabras (Alpina Francesa, Saanen y Toggenburg) y sus 29 cabritos. Las cabras se dividieron en dos grupos; uno con 9 animales, complementadas 10 días antes del parto con 500 g de alimento concentrado comercial, y el testigo con 11 animales que se mantuvo con la dieta base de la granja. Después del parto, a las 6 y 12 horas, se midió volumen y densidad del calostro. Durante la complementación se determinó la concentración de glucosa sanguínea diariamente hasta el parto. Se obtuvo la concentración de inmunoglobulinas totales en el suero sanguíneo de los cabritos y en el calostro utilizando la técnica de electroforesis horizontal. Los resultados mostraron que la complementación alimenticia tuvo un efecto positivo sobre el volumen y composición fisicoquímica del calostro (proteína, grasa y sólidos no grasos). No hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre grupos en los niveles de glucosa sanguínea de madres y crías. Tampoco se observó efecto del tratamiento sobre la concentración de inmunoglobulinas en el calostro ni en suero sanguíneo de los cabritos ($P>0.05$). Se concluye que la complementación alimenticia 10 días antes del parto puede ser considerada como una estrategia útil para incrementar la cantidad y calidad fisicoquímica del calostro en cabras primerizas.

Palabras clave: Inmunoglobulinas, inmunidad pasiva, glucosa, alimentación focalizada, parto, electroforesis horizontal.

2- Abstract

The objective of this study was to examine the effect of food supplementation in the last stage of pregnancy on blood glucose concentration, chemical composition and total immunoglobulins from colostrum produced by gilts dairy goats and concentration of serum immunoglobulins in their goat kids. They were used 20 goats (French Alpine, Saanen and Toggenburg) and their 29 goat kids. The goats were divided into two groups; the first group with 9 animals, supplemented 10 days before delivery with 500 g of commercial feed, and the control group with 11 animals remained on the standard diet on the farm. After birth, at 6 and 12 hours, volume and density of colostrum was measured. During complementing the serum glucose concentration it was determined daily until delivery. The concentration of total immunoglobulins in the serum blood was measured in goat kids and colostrum using horizontal electrophoresis technique. The results showed that food supplementation had a positive effect on the volume and chemical composition of colostrum (protein, fat and non-fat solids). There were no significant differences ($P > 0.05$) between groups in blood glucose levels mothers and goat kids. Treatment had no effect on the concentration of immunoglobulins in colostrum or serum blood goat kids ($P > 0.05$) was observed. It is concluded that focus feeding 10 days before delivery can be considered a useful strategy to increase the quantity and quality of colostrum goats.

Keywords: Immunoglobulins, passive immunity, glucose, focus feeding, parturition, horizontal electrophoresis.

3- Introducción

3.1- El calostro: definición

Al calostro se le ha definido como un líquido amarillo y espeso, acumulado en la glándula mamaria de la madre en las últimas semanas de la gestación (Micusan *et al.*, 1976). Otros autores lo definen como la primera leche que se consume por el recién nacido, y que fue almacenada en la glándula mamaria al final de la gestación (Linzell y Peaker, 1974), o como la leche inicial secretada por los mamíferos después del parto (Sánchez *et al.*, 2014). Otro investigador, Hadjipanayiotou (1995) lo ha definido como la secreción de la glándula mamaria durante los primeros días postparto, además difiere de la leche por tener altos contenidos de sólidos totales, proteínas, grasa, minerales, y un bajo contenido de caseína y lactosa.

La Norma Oficial Mexicana (NMX-F-728-COFOCALEC-2007) considera al calostro como la secreción de la glándula mamaria obtenida en el periodo comprendido entre los tres días antes y los tres días después del parto y que difiere de la leche principalmente por su alto contenido de inmunoglobulinas del isotipo A, M y particularmente G, cuyo color va del amarillo al rosado. De acuerdo a un estudio realizado por Páez (2010), el calostro conserva sus características fisicoquímicas hasta las 72 horas después del parto, y desde ese momento su composición no difiere de la leche.

Desde el punto de vista inmunológico, el calostro sólo es la primera secreción de la glándula mamaria después del parto. Desde este enfoque el calostro representa la principal fuente de inmunoglobulinas (IgG) para el recién nacido de las especies con placentación

epiteliocorial durante los primeros días de vida (Arguello *et al.*, 2004a; Moreno-Indias *et al.*, 2012).

3.2- Función y características del calostro

El calostro cumple con una función alimenticia importante, al proporcionar una mezcla de diversos componentes nutricionales (Moreno-Indias *et al.*, 2012) como vitaminas, minerales, grasa y lactosa, que le sirven al neonato para enfrentar los desafíos ambientales postparto (Bendixen *et al.*, 2011).

La primera ingesta de calostro provoca cambios endocrinos y metabólicos en los cabritos debido al aporte de inmunoglobulinas, nutrientes, sales y proteínas que favorecen el desarrollo del tracto gastrointestinal, tal es el caso del factor de crecimiento parecido a la insulina IGF-1 (Insuline-like growth factor 1) el cual se encuentra en mayores concentraciones en el intestino de neonatos que fueron alimentados con calostro antes de las primeras 24 horas de vida (Blum y Hammon, 2000). Otra de las funciones atribuidas al calostro es regular la secreción de las hormonas pancreáticas: glucagón e insulina utilizadas para la absorción de glucosa a partir de nutrientes con la finalidad de cubrir los requerimientos energéticos de los animales durante sus primeras horas de vida (Blum y Hammon, 2000). En la primera semana de vida la ingesta de calostro incrementa la concentración de albúmina plasmática producto de la síntesis hepática (Blum y Hammon, 2000).

En becerros neonatos el consumo de calostro incrementa la concentración de plasma en sangre así como la cantidad de proteínas totales en el suero, especialmente IgG. Dichos

cambios se deben a la cantidad y frecuencia con que se ingiere el calostro (Blum y Hammon, 2000).

Se ha reportado que el calostro estimula el peristaltismo intestinal, lo que es de vital importancia para la expulsión de meconio acumulado en el intestino de los cabritos y corderos durante los últimos meses del desarrollo fetal (García de Jalón *et al.*, 1990; Barza *et al.*, 1993, citado en Argüello, 2000).

Las características fisicoquímicas del calostro pueden variar en función de diferentes factores, tales como volumen de producción, la alimentación, raza, longitud del período de descanso de la lactación, temporada del año y estado de salud de los animales (Romero *et al.*, 2013). Comparado con la leche, el calostro contiene más sodio, cloruro, proteínas, leucocitos (Blum y Hammon, 2000) e inmunoglobulinas, y una menor concentración de potasio y lactosa (Linzell y Peaker *et al.*, 1974).

La cantidad y calidad del calostro producido por una hembra al momento del parto son factores importantes para explicar las condiciones alimenticias e inmunológicas de la cría en las primeras horas de vida. Un aporte de calostro adecuado en términos de cantidad y calidad garantiza en la cría la termorregulación, siendo de vital importancia debido a que en las primeras horas de vida de los cabritos hay una evaporación de los líquidos uterinos provenientes de la madre, y una disminución en su temperatura rectal, lo que puede arriesgar su viabilidad. El consumo de calostro en las primeras horas de vida favorece el incremento de la temperatura corporal (Dos Santos *et al.*, 1994, citado en Argüello, 2000).

Mientras se alcanza la madurez del sistema inmunológico de la cría, el calostro provee resistencia específica pasiva al ser rico en inmunoglobulinas, además, contiene un

alto número de células somáticas, componentes celulares de la inmunidad innata, lactoferrina y lisozima (Rudovsky *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2014). En el caso de las especies ruminantes el calostro juega un rol fundamental en la transferencia de la inmunidad pasiva en neonatos porque nacen hipogammaglobulinémicos (Lascelles, 1979). Cuando se consume calostro de mala calidad y/o en cantidades bajas se presentan fallas en la transferencia de inmunidad pasiva a la cría, dichas crías tendrán un mayor riesgo de desarrollar problemas infecciosos, con morbilidad y mortalidades más altas (O'Brien *et al.*, 1993; Kolb *et al.*, 2003; Argüello *et al.*, 2004a; Argüello *et al.*, 2004b; Ahmad *et al.*, 2006). Se ha encontrado que los niveles de IgG sérica son mayores en cabritos sobrevivientes a la lactancia que en aquellos que murieron, reportando concentraciones de 25.6 mg/l en animales enfermos vs 33.11 mg/l en animales sanos (Dos Santos *et al.*, 1994, citado en Argüello 2000).

En relación al tipo de parto, se ha reportado que el calostro proveniente de ovejas y cabras con parto múltiple contiene 19.7-20.2 mg/ml más de IgG que el proveniente de animales con parto simple, efecto que aparentemente desaparece a las 24 h postparto (Csapó *et al.*, 1994).

3.3- Factores que afectan la calidad y cantidad de calostro

La edad y número de parto de la madre es determinante en la calidad y cantidad de calostro producido. Se ha visto que hembras adultas producen una mayor cantidad de calostro con altos niveles de inmunoglobulinas que las hembras jóvenes o de primer parto (Yilmaz y Kaşıkçı, 2013). En contraste, en un estudio realizado en ovejas de más de cuatro años de edad, la calidad del calostro disminuye (Karakuş y Atmaca, 2016).

El estado nutricional de la madre al momento del parto se ve reflejado en la cría y en la cantidad y calidad fisicoquímica del calostro. Durante la última parte de la gestación, el crecimiento de la cría y la producción de calostro generan una alta demanda metabólica en la madre. Si el aporte de alimento no cubre dichas demandas, se arriesga la gestación, disminuye el crecimiento fetal (Dwyer *et al.*, 2003) y la producción de calostro se ve afectada (Mellor *et al.*, 1985). En un estudio realizado en el 2016, se observó que el estado de desnutrición en ovejas previo al parto generó la disminución de la lactosa, proteína y sólidos no grasos del calostro (Chadio *et al.*, 2016).

El concepto “alimentación focalizada” se refiere al uso estratégico de complementos alimenticios en periodos determinados de la vida del animal para afectar de modo positivo su desempeño (Martin *et al.*, 2006). Aplicado a la producción de calostro, la alimentación focalizada se realiza en los últimos días de la gestación para mejorar la cantidad y calidad de la secreción mamaria (Martin *et al.*, 2006) con lo que se busca incrementar la viabilidad de la cría (O'Brien y Sherman, 1993; Arguello *et al.*, 2004b; Goodwin *et al.*, 2004).

En ovejas durante la última semana de gestación, el consumo de 500 g (0.8% del peso corporal) de cebada incrementa la producción de calostro, lo que resulta particularmente útil cuando nace más de una cría por parto (Hawken *et al.*, 2012). Resultados similares han obtenido otros autores en la misma especie al utilizar lupinos (Murphy *et al.*, 1996), cebada y maíz (Banchero *et al.*, 2004a; Banchero *et al.*, 2004b; Banchero *et al.*, 2007). Al parecer, el complemento otorgado funciona mejorando las cantidades de glucosa disponibles para la síntesis de lactosa mamaria así como el volumen de calostro producido (Banchero *et al.*, 2007).

En otras investigaciones el suministro de maíz quebrado incrementó la cantidad de calostro a más del doble mientras que el contenido de lactosa en el calostro aumentó 288% en comparación con calostro de animales que sólo consumieron una dieta a base de forrajes (Banchero *et al.*, 2004b).

En años recientes se documentó que en cabras multíparas en pastoreo, el consumo de 600g de maíz durante los últimos doce días de gestación incrementa la cantidad de calostro en las primeras diez horas desde el parto (Ramírez-Vera *et al.*, 2012). Aunque en el trabajo anterior no se evaluaron las características inmunológicas del calostro, ni los efectos de su consumo por la cría, esta estrategia de alimentación focalizada parece tener un gran potencial por su aparente eficacia y bajo costo. No se conocen reportes similares en cabras primerizas.

4- Justificación

El consumo de calostro es esencial durante las primeras horas vida del animal rumiante debido a la falta de transferencia de inmunoglobulinas maternas durante el desarrollo fetal y el aporte nutricional que esta secreción representa. La calidad y cantidad de calostro producido por una hembra se encuentra influenciada por diversos factores, siendo el estado nutricional al momento del parto uno de los más importantes. Durante la gestación las necesidades energéticas aumentan, por esta razón se requieren del uso de estrategias alimenticias que cubran dichas necesidades. El presente trabajo tiene como objetivo plantear a la “Alimentación focalizada” 10 días antes del parto como una estrategia de alimentación que permita cubrir los requerimientos nutricionales de las hembras durante este periodo tan crítico mejorando la calidad y cantidad de calostro y a su vez propiciar un mejor desarrollo en las crías.

5- Objetivo general

La presente propuesta tuvo como objetivo determinar el efecto de la complementación con alimento comercial peletizado durante los últimos 10 días de gestación, sobre la cantidad y las características fisicoquímicas e inmunológicas del calostro producido por cabras primerizas en pastoreo.

5.1- Objetivos específicos

Se observará el efecto de la complementación 10 días antes del parto sobre la concentración de glucosa sanguínea en las cabras.

Se determinará la concentración sanguínea de inmunoglobulinas totales y glucosa en cabritos alimentados con calostro de madres con y sin complemento alimenticio en la última semana de gestación.

6- Hipótesis

El consumo de 500 g de alimento comercial peletizado durante la última semana de gestación incrementará la producción de calostro y mejorará su composición fisicoquímica en cabras primerizas.

El consumo de calostro proveniente de madres complementadas resultará en mayores concentraciones sanguíneas de glucosa en las primeras 12 horas de vida de los cabritos y en mayores concentraciones de inmunoglobulinas séricas durante los primeros 42 días de vida de los cabritos.

7- Material y métodos

El estudio se realizó en el rebaño caprino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), perteneciente a la FMVZ de la UNAM. Se utilizó un total de 20 cabras primerizas (1.5-2 años, >40kg de peso, razas Alpino Francés, Toggenburg y Saanen). La ovulación de las cabras fue previamente sincronizada mediante métodos hormonales para sincronizar también sus partos. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos balanceados por raza. El grupo Testigo (n=11) se mantuvo con la dieta base que se proporciona en el Centro, la cual consistió en pastoreo en praderas de alfalfa y aporte de heno de alfalfa y avena en corrales. El otro grupo (Complementado, n=9) recibió el mismo manejo alimenticio en la pradera y corrales, además de 500g de alimento comercial peletizado por cabra durante los últimos 10 días de gestación. La fecha probable de parto se calculó sumando 145 días a la fecha de monta. El alimento comercial peletizado (Nucapra®) se ofreció de manera individual en comederos adecuados para ello, considerando un periodo de adaptación de 6 días (día -12 desde la fecha probable de parto) en que se ofrecieron 50, 100, 200, 300, 400 y 500g por animal por día. La alimentación base se calculó en 2 Kg MS/día/animal, mientras que la complementación contenía 93.23% MS, 22.92% PC y 3001.84 Kcal/Kg EM. La alimentación ofrecida cubría los requerimientos nutricionales de los animales para la etapa fisiológica en que se encontraban.

7.1- Primera fase: Muestreo durante la complementación, producción y características del calostro.

Se registraron diariamente las concentraciones de glucosa en sangre yugular obtenida mediante venopunción desde el día 16 antes del parto y hasta el día del parto (0 h). Luego del parto, la determinación se realizó nuevamente a las 6 horas y 12 horas posteriores. Las mediciones de glucosa se realizaron utilizando el dispositivo Accu-Chek[®] Active y sus tiras reactivas (Roche[®] Diagnostics, Indianápolis EE UU).

Se observó la conducta de todos los animales para detectar los signos anticipados del parto en los últimos 12 días de la gestación. Cuando un animal mostró signos como aislamiento, emisión de balidos bajos y/o se observó la cría o alguno de los tejidos placentarios, se continuó su vigilancia para auxiliar en el parto si era necesario.

Inmediatamente después del parto, la cría se separó de la madre para ser secada, pesada y alojada en corraletas de crianza acondicionadas con cama limpia y seca. En ese momento (0 horas) se realizó un primer ordeño del calostro en ambos medios de la ubre y posteriormente a las 6 y 12 horas. En cada momento se registró la cantidad obtenida de calostro, se evaluó en su consistencia y viscosidad mediante la prueba de calostrometría (Hawken *et al.*, 2012), y se tomó una muestra (50 ml) para determinar su composición fisicoquímica (MilkoScan[®] Minor) y su concentración de inmunoglobulinas mediante electroforesis horizontal (Luttman, 2008). Cuando las muestras no eran analizadas el mismo día, se envasaban en viales de 2ml y eran congeladas a -20°C para su conservación.

Para ser sometidas a electroforesis, las muestras de suero sanguíneo y calostro fueron descongeladas a temperatura ambiente y mezcladas durante un minuto con un vortex

(Reax Top – Heidolph®) con el fin de integrar perfectamente sus componentes y tener una muestra homogénea.

La electroforesis es una técnica utilizada para producir la migración de partículas y moléculas de una muestra a través de un campo eléctrico. El patrón electroforético de cada muestra dependerá de la naturaleza, carga eléctrica y peso de las partículas presentes y será observada en sus diferentes fracciones (Jan-Christer, 2011). En el caso de las proteínas del suero sanguíneo, la electroforesis permite separarlas en cuatro fracciones; albúmina, α -globulinas, β -globulinas y γ -globulinas (Kaneko *et al.*, 2008).

Existen pocos reportes acerca de la utilización de la electroforesis como un método para separar las fracciones proteicas de calostro, sin embargo, en un estudio electroforético realizado en el 2002 con muestras de calostro caprino se obtuvieron cuatro fracciones de proteínas: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulinas, albúmina sérica caprina y γ -globulinas (Levieux *et al.*, 2002). Se demostró que se puede visualizar y cuantificar el porcentaje de las diferentes proteínas presentes en muestras de suero y calostro utilizando colorantes que se unen a las proteínas (Jan-Christer, 2011).

Para la realización de la prueba de electroforesis horizontal se preparó una solución buffer en agua destilada con ácido bórico (H_3BO_3) al 0.3M e hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1M, con un pH de 8.7; dicha solución se utilizó como solución buffer de corrida. Para el soporte sobre el que se corrieron las muestras se utilizó un gel a base de agarosa al 1% disuelta en una solución buffer de tris-glicina (tris al 0.12M y glicina al 0.3M). Se depositaron 70 ml del gel de agarosa en la base para geles de la cámara de electroforesis con el peine de 16 pozos en doble hilera hasta que solidificó. Posteriormente se retiró el

peine y se cubrió el gel con la solución buffer de corrida aproximadamente 1cm por encima del gel. Para diluir las muestras de suero o calostro, se preparó una solución buffer de carga con 80% de solución salina fisiológica (SSF), 20% de glicerol, y como colorante azul de bromofenol que permitió visualizar la distancia de migración de las proteínas. Se realizó una dilución 1:2 para las muestras de suero y 1:5 para las muestras de calostro en el buffer de carga, en 20µl, 16µl de buffer de carga y 4µl de muestra respectivamente (Comunicación personal con el MVZ Daniel Atilano López; Coligan, 2008).

Se colocaron 10µl de la dilución en los pozos del gel y fueron sometidas a 55 voltios durante 150 minutos. Al inicio de cada hilera se estableció el uso de tres controles; para las muestras de suero fueron albúmina sérica bovina, gammaglobulinas de cabra purificadas con sulfato de amonio (Comunicación personal con la MVZ Myrna Vicencio Mallén; Coligan, 2008; ver apéndice 13.3) y suero de cabra adulta. Como controles para las muestras de calostro se colocaron diluciones de albúmina sérica bovina, gammaglobulinas de cabra purificadas con sulfato de amonio (ver apéndice 13.3) y leche de cabra, esto con el fin de comparar los patrones y la distancia de migración de las muestras problema con el de patrones electroforéticos conocidos. Debido a que las proteínas separadas por electroforesis no se pueden observar porque no poseen color, deben ser teñidas con un colorante. La tinción de Ponceau es la más utilizada porque tiñe y se lava fácil y rápidamente, permitiendo la visualización de las proteínas y su cuantificación mediante un fotodensitómetro (Luttmann, 2008). La solución lavadora para este tipo de tinción es el ácido acético glacial al 5% disuelto en agua destilada (ver apéndice 13.1). Una vez lavado el gel, se dejó deshidratar a temperatura ambiente durante cinco días, realizando lavados diarios con la solución lavadora para eliminar el exceso de colorante. El gel

deshidratado y transparentado se colocó en un acetato, fijándolo con glicerol y se procedió a su lectura en el fotodensitómetro (Cellomatic Jr. Internacional Científica®) a una sensibilidad de 0.45-0.5 con una distancia de lectura de 5 cm. Las lecturas de las muestras se realizaron por duplicado y al final se obtuvo un promedio del porcentaje de gammaglobulinas obtenido en ambas lecturas de cada muestra (Comunicación personal con el MVZ Daniel Atilano López; Coligan, 2008). A continuación se muestra la imagen de uno de los geles con muestras de calostro obtenido a las 0 horas.

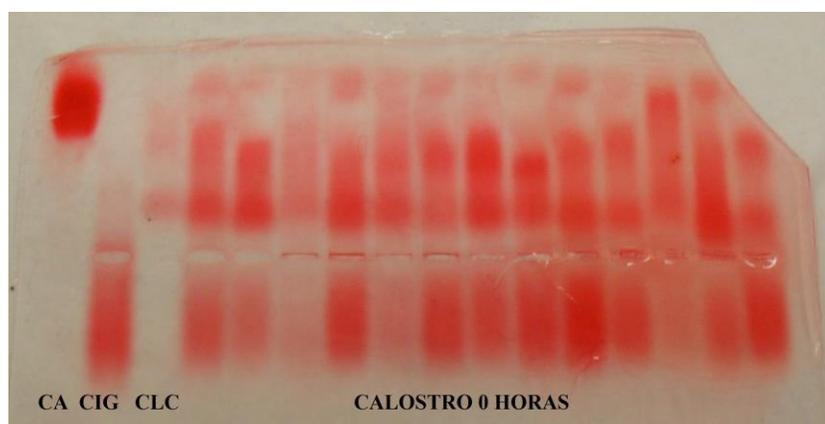


Imagen 1. Muestras de calostro obtenido a las 0 horas sometidas a electroforesis horizontal. CA:control de albúmina sérica bovina, CIG: control de inmunoglobulinas, CLC: control de leche de cabra.

La técnica de electroforesis utilizada para el presente trabajo fue estandarizada con el apoyo del MVZ Daniel Atilano López en el laboratorio de Prácticas de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, con modificaciones realizadas en la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano perteneciente a la misma universidad.

7.2- Segunda fase: Consumo de calostro por las crías, niveles de glucosa e inmunoglobulinas sanguíneas en cabritos.

Se trabajó con un total de 29 cabritos nacidos de las cabras utilizadas, 16 del grupo complementado y 13 del grupo testigo. Fueron manejados en el programa de lactancia artificial del CEIEPAA, que se realiza introduciendo a las crías recién nacidas en corraletas con limpieza diaria, con un mínimo de 0.8 m² por animal, dos alimentos al día y cama limpia y seca.

Todos los cabritos recibieron su primera toma de calostro (consumo voluntario, hasta un 20% de su peso vivo) en la primera hora de vida, el calostro provenía del primer ordeño (0 horas). Posteriormente, una segunda y tercera toma de calostro se otorgó a las 6 y 12 horas de vida respectivamente. En cada ocasión se registró la cantidad consumida por cada cría. A partir de ese momento, las crías fueron alimentadas con leche entera de cabra a libre acceso en dos ocasiones por día (08:00 y 16:00h).

Para determinar la concentración de inmunoglobulinas y glucosa antes de la primera toma de calostro, se obtuvo una muestra sanguínea de 0.5 ml mediante punción yugular de todas las crías en el momento de su nacimiento. Posteriormente, los muestreos sanguíneos se realizaron, con el mismo objetivo, a las 6 y 12 horas de vida, y a los 21 y 42 días de edad. Las muestras se tomaron por personal capacitado, utilizando jeringas para insulina BD[®] Ultrafine (0.5 ml) y tubos estériles. Ambas determinaciones se realizaron como se indicó arriba.

8- Análisis de la información

El análisis de la información se realizó utilizando el paquete estadístico SAS v. 9.1. Se utilizó un ANOVA para mediciones repetidas (PROC GLM) con el tratamiento como categoría ajustando el modelo por prolificidad. Se realizaron comparaciones post hoc mediante LSM de SAS y la prueba de Tukey Kramer. Entre algunas variables se obtuvo la correlación Pearson y se aplicó a prueba de regresión lineal (PROC CORR y PROC REG).

9- Resultados

9.1- Concentración sérica de glucosa en las cabras

No hubo diferencias estadísticas entre grupos, en los niveles de glucosa sanguínea ($P>0.05$; Figura 1). Durante el periodo preparto se observaron valores de 66-70 mg/dL en ambos grupos ($P>0.05$), con un incremento dramático al momento del parto de hasta 238.6 mg/dL en el grupo complementado y 236 mg/dL en el grupo testigo. El efecto del tiempo fue significativo ($P<0.05$) y no se observó interacción con el grupo ($P>0.05$).

9.2- Prolificidad al parto y peso de los cabritos al nacimiento

La prolificidad fue de 1.88 ± 0.14 crías/parto en el grupo complementado y de 1.6 ± 0.13 crías/parto en el grupo testigo ($P>0.05$). El promedio del peso al nacimiento no fue diferente entre grupos ($P>0.05$), complementado 3.2 ± 0.8 kg vs testigo 3.09 ± 0.6 kg.

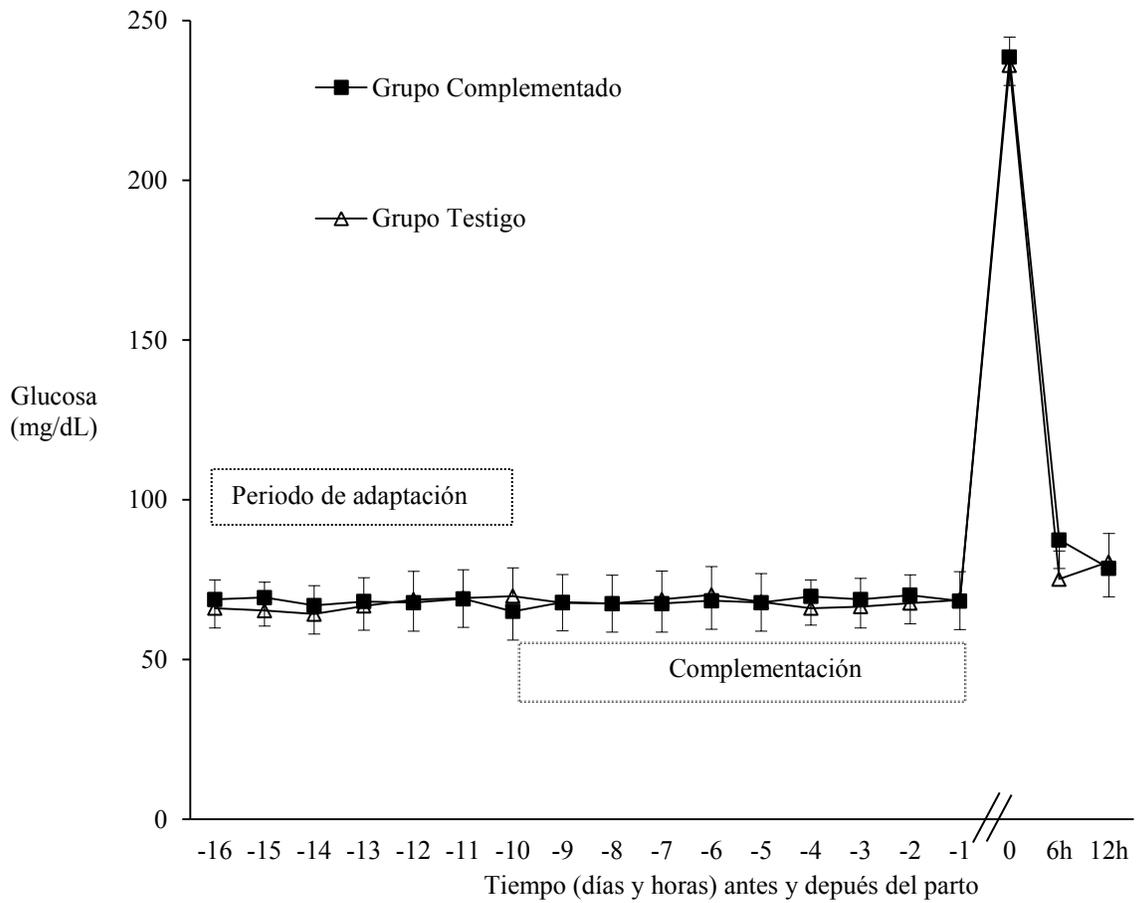


Figura 1. Niveles de glucosa sanguínea ($\pm ee$) en las cabras con y sin complementación alimenticia en los días previos al parto, en el momento del parto (0 horas) y luego de 6 y 12 horas. No se observaron diferencias estadísticas entre grupos ($P > 0.05$).

9.3- Volumen (ml) y densidad del calostro

Los animales complementados produjeron un mayor volumen de calostro en la muestra 0 horas, 1409 ± 320 ml vs 590 ± 189 ml ($P < 0.05$); (Figura 2).

En el muestreo de las 6 horas el efecto del grupo no fue significativo en el volumen del calostro ($P > 0.05$), 155 ± 77 ml en el grupo complementado vs 186 ± 45 ml en el grupo testigo.

En el muestreo de las 12 horas tampoco se observó efecto significativo del grupo ($P > 0.05$) (166 ± 65 ml complementado vs 206 ± 38 ml testigo).

El calostro total producido en los tres muestreos tendió a ser mayor en el grupo complementado ($P = 0.10$) 1751 ± 370 ml complementado vs 984 ± 218 ml testigo.

No se observó interacción de raza con el grupo, sobre el volumen de calostro producido ($P > 0.05$).

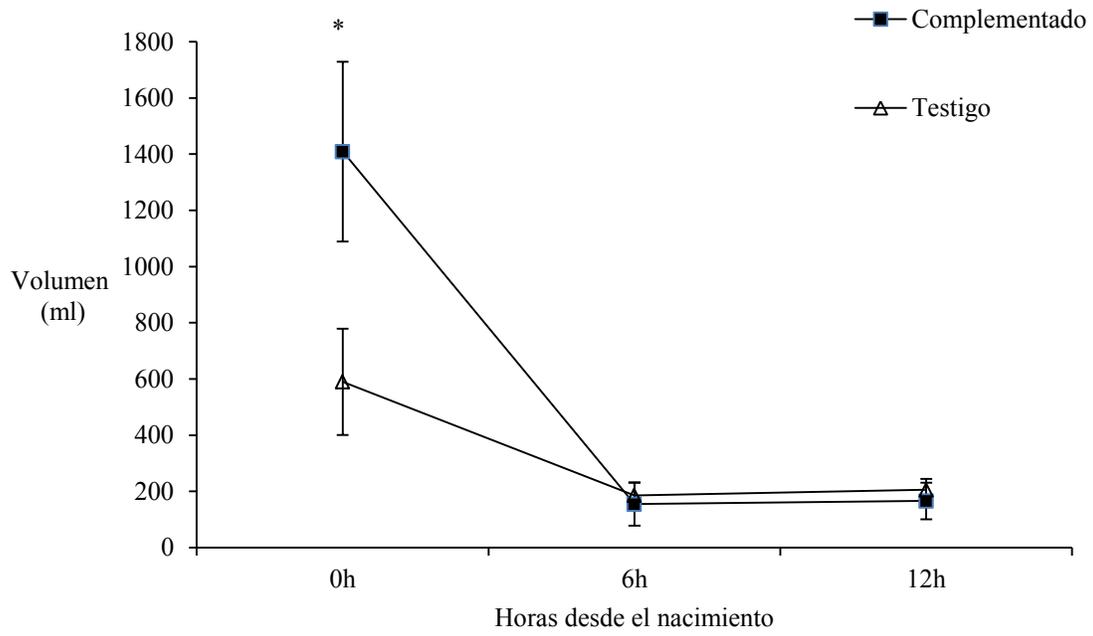


Figura 2. Volumen promedio (\pm ee) de calostro producido por cada grupo a las 0, 6 y 12 horas desde el parto.

* Indica diferencia estadística entre grupos ($P < 0.05$).

La densidad del calostro se muestra en el Cuadro 2. En algunas muestras no se pudo determinar la densidad debido a que la muestra fue insuficiente para llenar el calostrómetro (250 ml). Debido a esta situación sólo se realizó el análisis estadístico de las muestras de las 0 horas, sin encontrar diferencias entre grupos (complementado: $1044.8 \pm 2.8 \text{g/ml}$ vs testigo: $1036.3 \pm 3.1 \text{g/ml}$; $P > 0.05$; Cuadro 2).

COMPLEMENTADO			TESTIGO		
TIEMPO					
0H	6H	12H	0H	6H	12H
1035	1029	1025	1053	ND	1041
1047	ND	ND	ND	ND	ND
1035	ND	ND	1022	ND	ND
1048	1040	1030	1038	1029	ND
1038	ND	1030	1032	ND	1032
1050	1037	1030	1025	ND	ND
1063	ND	ND	1044	ND	ND
1049	1035	1034	1044	ND	ND
1055	1042	1035	1025	ND	ND
-	-	-	1045	ND	1032
-	-	-	ND	ND	ND

Cuadro 2. Densidad del calostro (calostrometría) en ambos grupos a las 0, 6 y 12 horas desde el parto. ND= No determinado.

9.4- Composición fisicoquímica del calostro

9.4.1- Grasa

El efecto del grupo sobre la concentración de grasa en el calostro fue significativo ($P < 0.05$). Se encontraron diferencias estadísticas a las 6 y 12 horas de muestreo con valores superiores en el grupo complementado ($P < 0.05$; Figura 3). La interacción del grupo con el tiempo no fue significativa ($P = 0.09$).

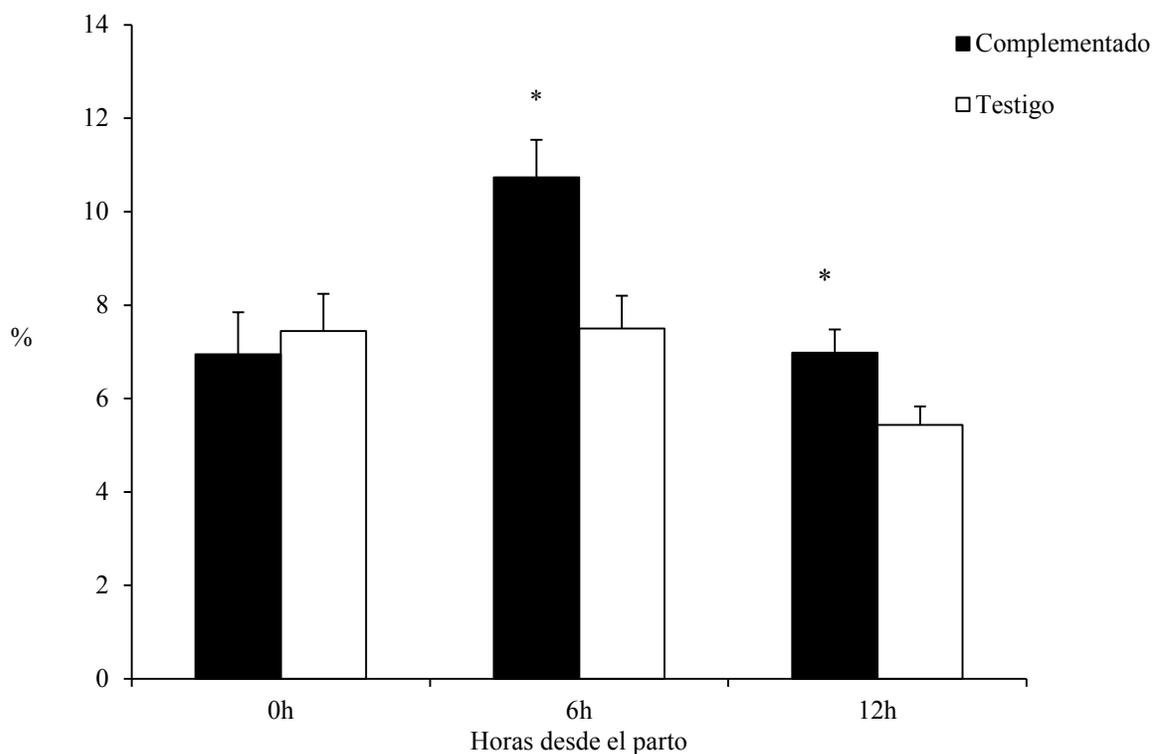


Figura 3. Porcentaje de grasa ($\pm ee$) producida en el calostro de cada grupo a las 0, 6 y 12 horas desde el parto. * Indica diferencia estadística entre grupos ($P < 0.05$).

9.4.2- Proteína

El efecto del grupo en la concentración de proteína del calostro fue significativo ($P < 0.05$; Figura 4). En los muestreos de 0 y 6 horas los valores fueron superiores en el grupo complementado ($P < 0.05$; Figura 4). La interacción del grupo con el tiempo de muestreo no fue significativa ($P = 0.19$).

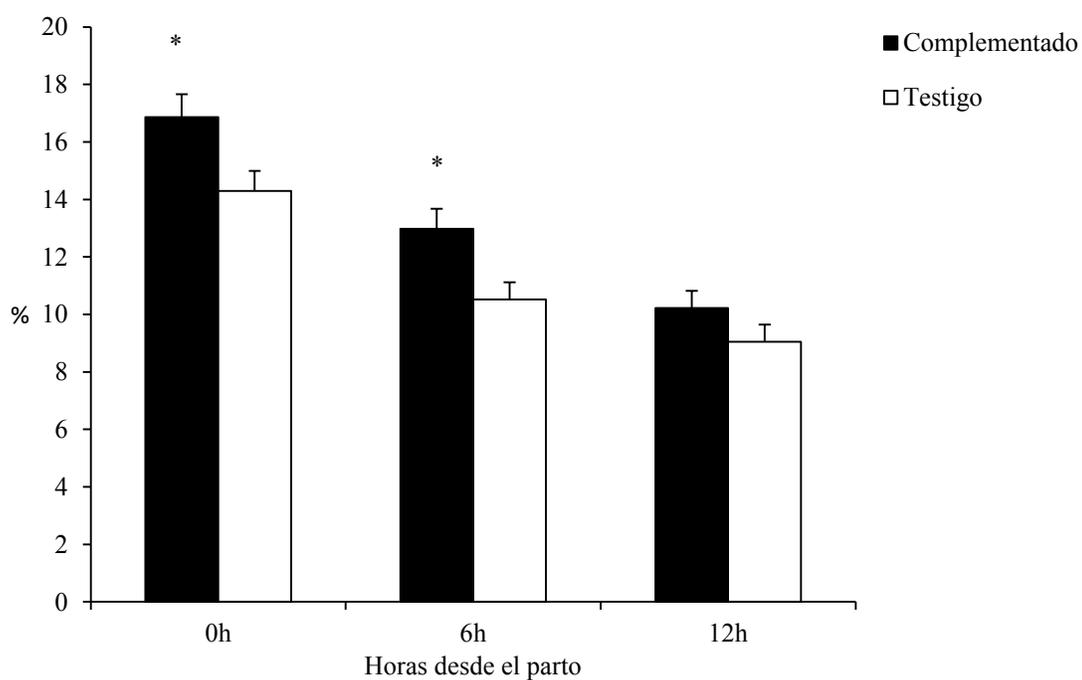


Figura 4. Porcentaje ($\pm ee$) de proteína producida en el calostro de cada grupo a las 0, 6 y 12 horas desde el parto. * Indica diferencia estadística entre grupos ($P < 0.05$).

9.4.3- Lactosa

No hubo un efecto significativo del grupo sobre la concentración de lactosa en el calostro ($P>0.05$). En ninguno de los momentos de muestreo (0, 6 y 12 horas) se encontraron diferencias entre grupos, en la concentración de lactosa ($P>0.05$; Figura 5). Se observó una interacción significativa del grupo con el tiempo de muestreo ($P<0.05$).

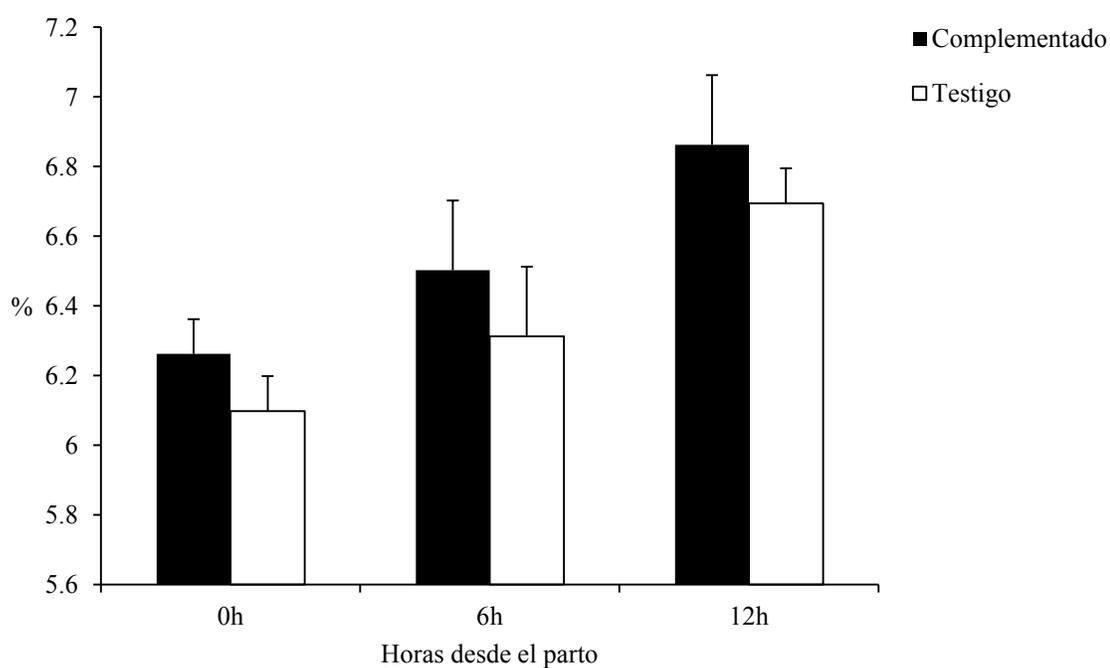


Figura 5. Porcentaje ($\pm ee$) de lactosa producida en el calostro de cada grupo a las 0, 6 y 12 horas desde el parto.

9.4.4- Sólidos no grasos

El efecto del grupo sobre la concentración de sólidos no grasos en el calostro fue significativo ($P < 0.05$; Figura 6). Las diferencias se observaron a las 0 y 6 horas, y no a las 12 horas de muestreo ($P = 0.16$; Figura 6). Todos los valores fueron superiores en el grupo complementado. La interacción del tiempo con el muestreo no fue significativa ($P > 0.05$).

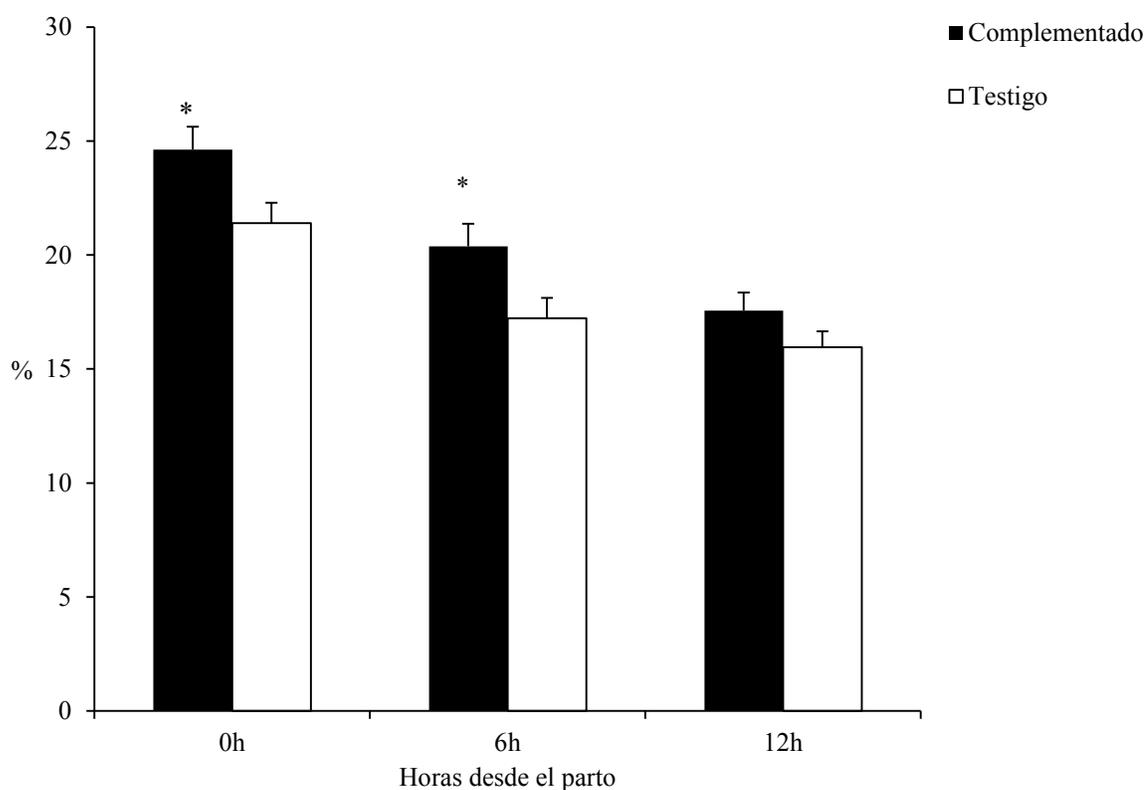


Figura 6. Porcentaje ($\pm ee$) de sólidos no grasos producidos en el calostro de cada grupo a las 0, 6 y 12 horas desde el parto.

* Indica diferencia estadística entre grupos ($P < 0.05$).

9.5- Concentración de inmunoglobulinas totales en el calostro a las 0, 6 y 12 horas desde el parto

No se encontró efecto del grupo sobre la concentración de inmunoglobulinas totales ($P>0.05$). Al comparar las concentraciones de inmunoglobulinas del calostro a las 0 horas entre grupos, no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.18$; Figura 7).

En el muestreo de las 12 horas, sólo algunas muestras presentaron valores cuantificables de inmunoglobulinas (3 en complementado y 6 en testigo) y tampoco se encontraron diferencias entre grupos ($P>0.05$).

El efecto del tiempo sobre la concentración de inmunoglobulinas en el calostro de ambos grupos fue significativa ($P<0.05$). El promedio de la concentración de inmunoglobulinas totales en el calostro a las 0 horas en las cabras del grupo complementado fue de $50.3\pm 10.6\%$ y mostró un descenso significativo a las 6 horas al llegar a $23.5\pm 7.7\%$ y hasta 4.3 ± 2.8 a las 12 horas ($P<0.05$; Figura 7).

En el grupo testigo se obtuvo una media en la concentración de inmunoglobulinas totales a las 0 horas de $45.1\pm 15.8\%$ y mostró también un descenso significativo a las 6 horas postparto en que llegó a $27.2\pm 15.6\%$. El descenso de inmunoglobulinas a las 12 horas llegó a un valor de 9.6 ± 2.7 (Figura 7). Desde la hora 0 hasta la 12 el descenso de las inmunoglobulinas fue de 500%.

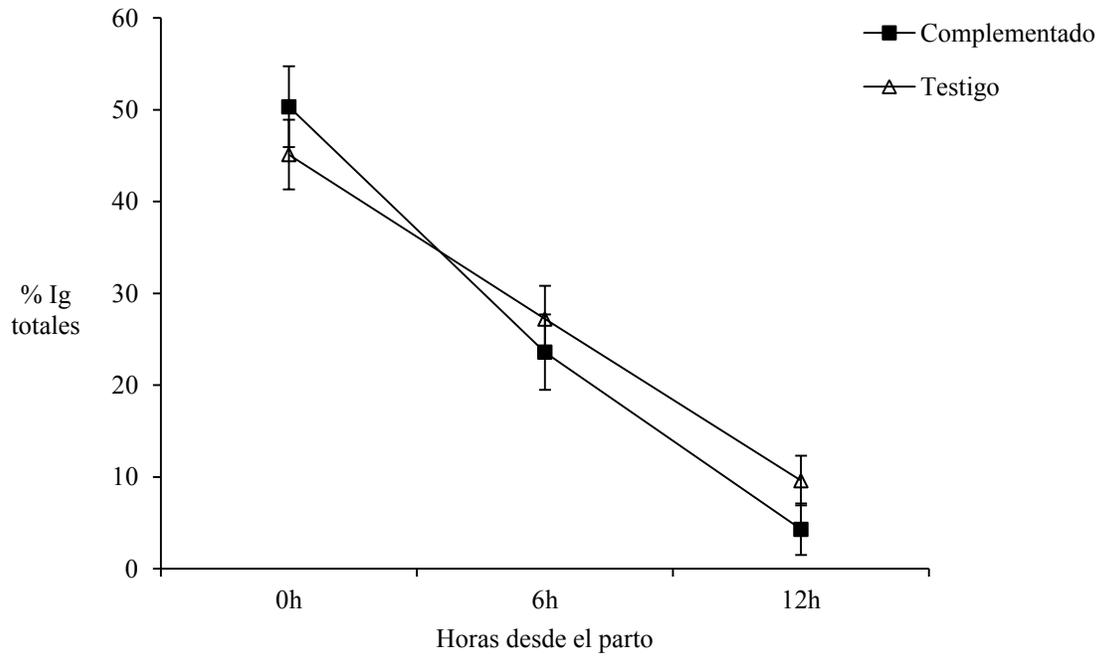


Figura 7. Porcentaje ($\pm ee$) de inmunoglobulinas totales en calostro de los grupos complementado y testigo a las 0, 6 y 12 horas desde el parto.

9.6- Consumo de calostro por los cabritos (ml)

El consumo total de calostro no difirió entre grupos ($P>0.05$; Figura 8). El consumo total luego de las tres tomas consideradas fue de 494.5 ± 24.5 ml en el grupo complementado y de 483.9 ± 25 ml para el grupo testigo ($P>0.05$; Figura 8). El consumo por grupo en cada una de las tomas se muestra en la Figura 8. No hubo diferencias entre grupos en ninguno de los horarios.

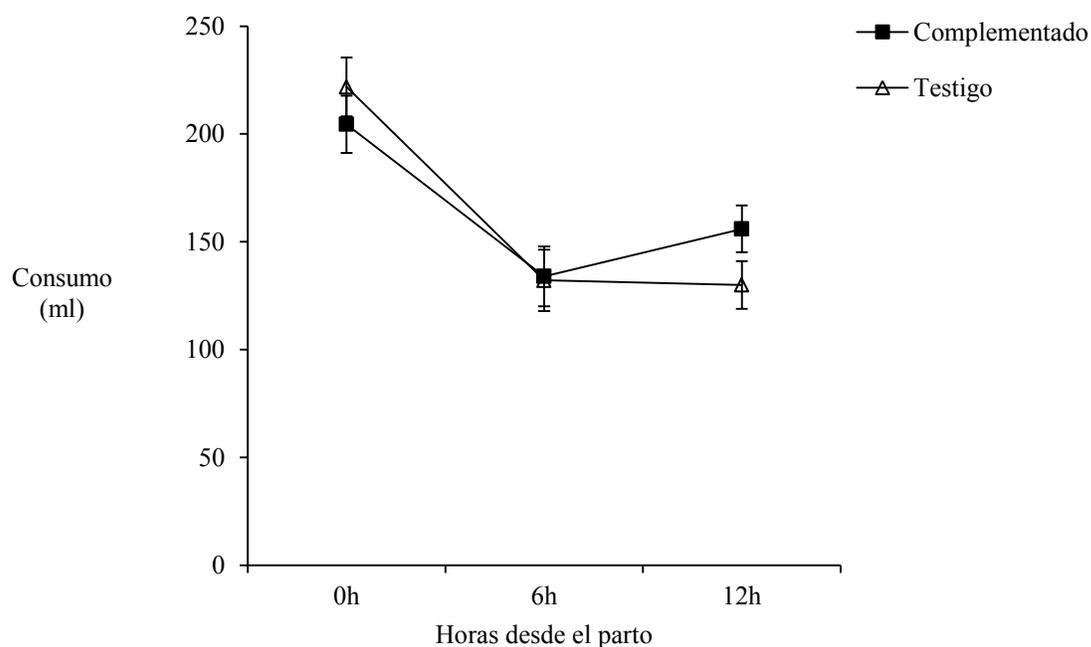


Figura 8. Cantidad de calostro consumido ($\pm ee$) por los cabritos de ambos grupos a las 0, 6 y 12 horas desde el parto.

9.7- Correlación del consumo con el peso al nacimiento

La correlación (Pearson) del peso al nacimiento con el consumo total de calostro fue significativa ($R=0.43$; $P=0.006$; Figura 9). A partir de los resultados de la regresión se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\hat{Y}: 293.1 + (62.4 * \text{Peso al nacimiento}).$$

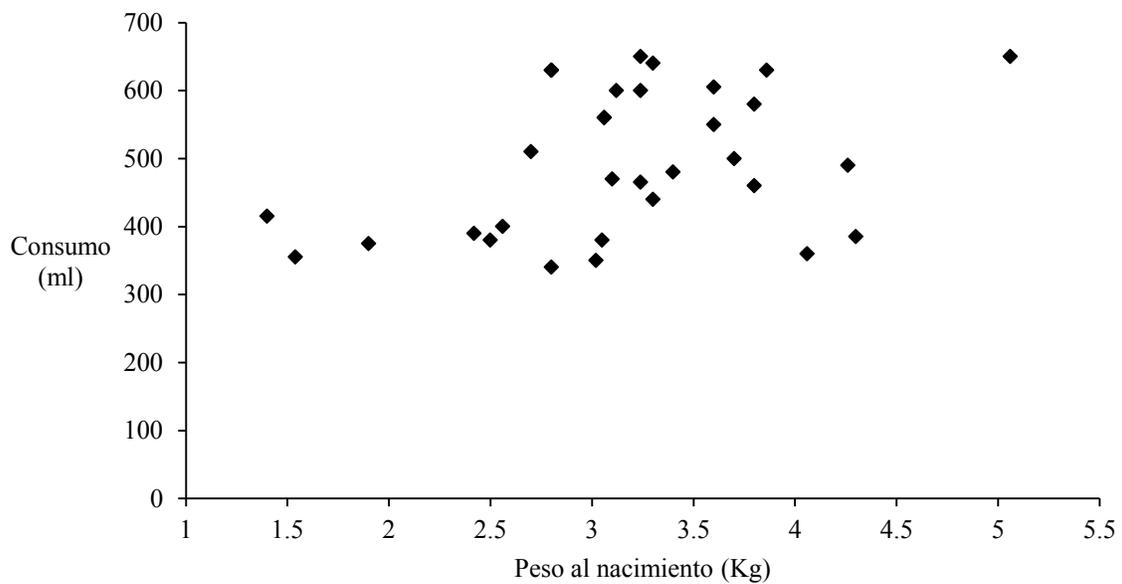


Figura 9. Correlación de Pearson entre el consumo total de calostro y el peso al nacimiento de los cabritos del estudio.

9.8- Correlación del consumo con el porcentaje de inmunoglobulinas totales en suero de los cabritos

No hubo una correlación significativa entre el calostro consumido y la concentración de inmunoglobulinas totales en el suero de los cabritos, en ningún momento del muestreo ($P>0.05$).

Concentración sanguínea de glucosa en los cabritos a las 0, 6 y 12 horas desde el parto

La concentración de glucosa sanguínea en los cabritos de ambos grupos se muestra en la Figura 10. La concentración de glucosa no difirió entre tratamientos en ninguno de los momentos del muestreo (Figura 10); ($P>0.05$). El efecto de tiempo en los valores de glucosa fue significativo ($P<0.05$; Figura 10), se observó un incremento notable desde el muestreo de 0 horas hasta el de 12 horas. La glucosa se incrementó en un 196% en el grupo complementado y 252% en el grupo testigo, y alcanzó valores superiores a 90 mg/dL en ambos grupos. La correlación entre el consumo total de calostro y los niveles sanguíneos de glucosa a las 12 horas, tendió a ser significativa ($R=0.29$; $P=0.07$). La interacción del tratamiento con el tiempo no fue significativa ($P>0.05$).

En ninguno de los muestreos los valores de glucosa fueron diferentes entre grupos ($P>0.05$; Figura 10).

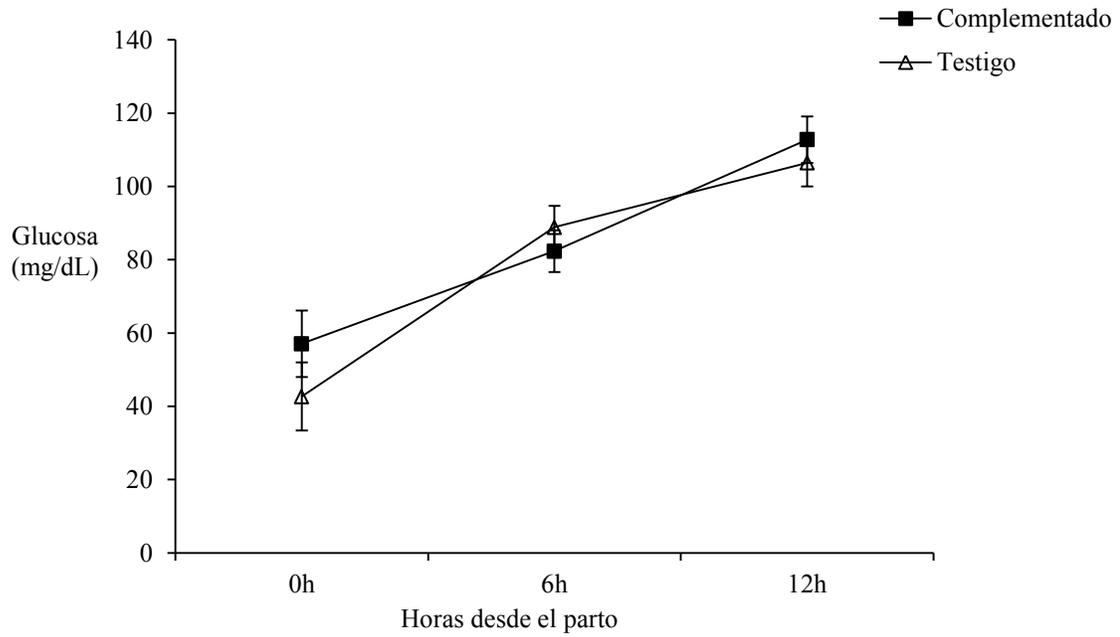


Figura 10. Niveles (media \pm ee) de glucosa sanguínea en cabritos de madres complementadas antes del parto y testigo durante las primeras 12 horas desde el parto.

9.9- Concentración de inmunoglobulinas totales en el suero sanguíneo de los cabritos a las 0, 6, 12 horas y a los 21 y 42 días desde el parto

No hubo diferencias significativas entre grupos, en la concentración de inmunoglobulinas séricas en ningún momento del muestreo ($P>0.05$); (Figura 11).

Como era de esperar, la concentración de inmunoglobulinas no fue detectable en las muestras de suero a las 0 horas. Por ello en el gráfico se muestra con un valor de 0 (Figura 11).

A las 6 y 12 horas del muestreo se alcanzaron concentraciones promedio superiores a 25% en el grupo complementado, mientras que en el grupo testigo fue de 18 y 23% respectivamente.

A los 21 días de edad de los cabritos se observó un descenso importante, que llegó hasta un valor indetectable para el día 42 (Figura 11). El tiempo tuvo un efecto significativo ($P>0.05$) y no presentó interacción con el grupo ($P>0.05$).

En los valores del muestreo a los 42 días sólo se muestra el promedio de los individuos que presentaron lecturas de inmunoglobulinas (11 en total), del resto no se obtuvo lectura.

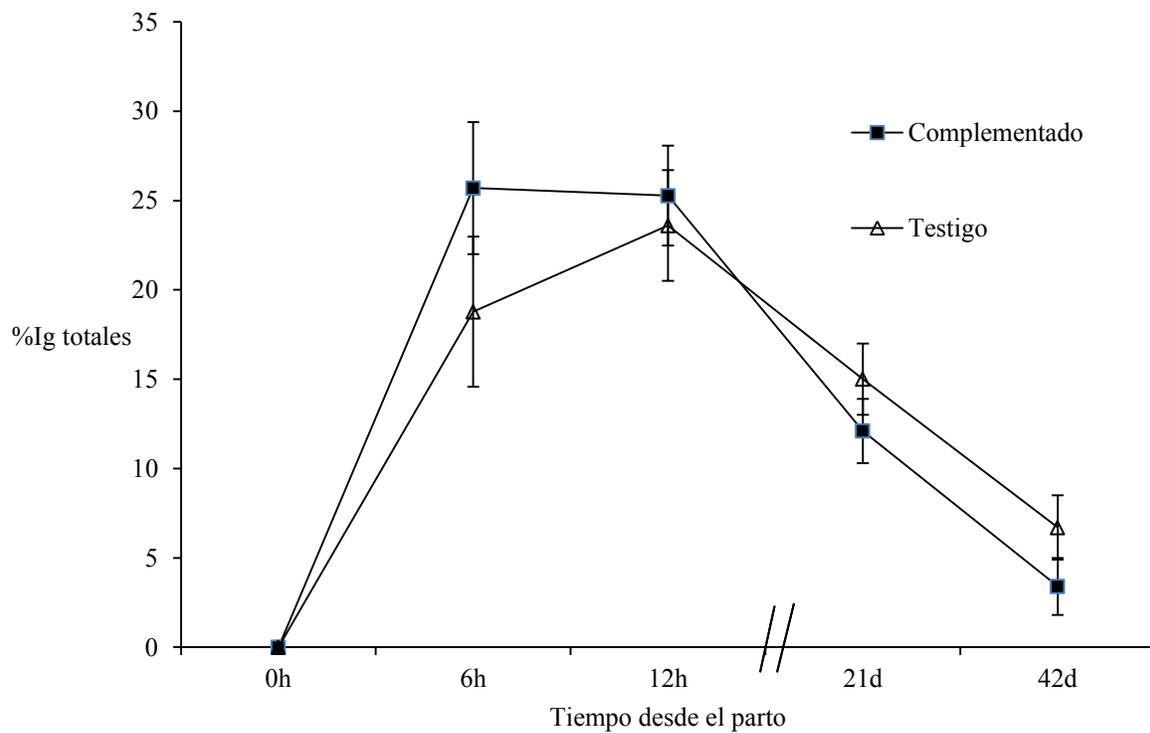


Figura 11. Porcentaje (\pm ee) de inmunoglobulinas totales en suero sanguíneo de cabritos de ambos grupos a las 0, 6, 12 horas y a los 21 y 42 días desde el parto.

10- Discusión

La complementación alimenticia 10 días antes del parto con 500 g de alimento concentrado incrementó significativamente el volumen de calostro producido sólo a las 0 horas postparto. En los horarios 6 horas y 12 horas no se observó ninguna diferencia. Este resultado es parcialmente consistente con lo reportado en trabajos realizados en cabras (Ramírez *et al.*, 2012) y ovejas (Banchero *et al.*, 2007), en donde el uso de maíz como complemento alimenticio en la última semana de gestación resultó ser una alternativa eficaz para mejorar hasta en un 200% la cantidad total de calostro producido en las 10 horas posteriores al parto. En este caso, las diferencias entre grupos desaparecieron a las 6 y 12 horas desde postparto y la suma total de calostro producido sólo tendió a ser mayor en el grupo complementado. En ovejas Pelibuey, la complementación con 600 g de maíz mejoró la producción de calostro sólo en el momento inmediato postparto (Martínez, 2009).

Las diferencias prolongadas en el volumen producido de calostro luego del parto se han tratado de explicar mediante los cambios en la glicemia producida por el consumo del complemento alimenticio. Banchero *et al.* (2007) y Ramírez *et al.* (2012) encontraron mayores niveles de glucosa sanguínea en los animales complementados. Dichos cambios fueron considerados como la razón principal para la mejora en el volumen de calostro producido. De acuerdo a lo que se ha sugerido, la glucosa induciría una mayor actividad lactogénica previo al parto y se promovería un mayor volumen de calostro producido (Banchero *et al.*, 2004; Banchero *et al.*, 2007). En este caso, la falta de diferencias en los valores de glucosa sanguínea entre grupos podría explicar el comportamiento observado en el volumen total de calostro registrado en cada grupo.

A pesar de las diferencias numéricas obtenidas en el volumen producido de calostro, los resultados no permiten aceptar por completo la hipótesis propuesta para las condiciones de este trabajo.

La concentración de glucosa en las cabras de ambos grupos no difirió durante el periodo de estudio. La explicación no es clara, sin embargo, la condición metabólica inicial de los animales podría estar relacionada. Con base en los valores de glicemia de los animales, los cuales estaban dentro de los parámetros considerados como ideales para la especie (>50 mg/dL) (Pugh y Baird, 2012; Kaneko, 2008), se asumió que se encontraban en un buen estado general debido a que la glucosa funciona como un indicador del balance energético (Mellado *et al.*, 2008). Se ha observado que en animales con glicemia inferior (<40 mg/dL; Ramírez *et al.*, 2012) y en aquellos en los que la alimentación no cubre al 100% sus necesidades nutricionales (Celi *et al.*, 2008) la complementación con alimentos energéticos es eficaz para incrementar los niveles de glucosa en sangre. A diferencia de lo que ocurre con los animales con una nutrición adecuada, en cabras desnutridas con glicemia inferior a 40 mg/dL, la complementación con maíz durante la última semana de la gestación mejora la cantidad de glucosa disponible en sangre (Cortez, 2008). Así, el efecto positivo de la complementación alimenticia sobre el nivel de glucosa en sangre parece ser más evidente en animales con un mal estado nutricional de inicio que en aquellos que se encuentran en un estado adecuado.

La influencia de la alimentación sobre la glándula mamaria también se ve reflejada en la composición del calostro (Ramírez-Vera *et al.*, 2012). En otros estudios en los que se ha empleado la complementación a base de maíz, tanto en ovejas (Banchemo *et al.*, 2004; Banchemo *et al.*, 2007; Martínez, 2009; Hawken *et al.*, 2012; Sánchez, 2012) como en

cabras (Ramírez-Vera *et al.*, 2012), se observaron mejoras en la concentración de los componentes del calostro en diferentes horarios de muestreo posterior al parto. Tal es el caso de Banchemo *et al.* (2004; 2007; en ovejas) quien reporta un efecto positivo de la complementación en el porcentaje de grasa (0 y 1 horas), proteína (0,1, 3, 6 horas) y lactosa (0, 1, 3 horas). De modo similar en cabras, Ramírez-Vera *et al.*, 2012 observó un incremento en el porcentaje de proteína (3, 6, 10 horas), lactosa (6 y 10 horas) y sólidos no grasos (3, 6, 10 horas).

En el presente trabajo se observó un aumento en la concentración de grasa (6 y 12 horas), proteína (0 y 6 horas) y sólidos no grasos (0 y 6 horas). Este efecto es particularmente importante para el neonato debido a las funciones biológicas y nutricionales que desempeñan tales componentes. La grasa del calostro es uno de los principales sustratos energéticos que tiene el neonato durante sus primeras horas de vida, el calostro mantiene un alto contenido de la misma durante las primeras 24 horas (Meléndez *et al.*, 2005). Otra función atribuida a la grasa contenida en el calostro es su efecto laxante, ya que actúa como un estimulador del peristaltismo de la mucosa intestinal (García de Jalón *et al.*, 1990, citado en Castro, 2005). Con respecto a la fracción proteica del calostro, se sabe que está compuesta por cuatro fracciones (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulinas, γ -globulinas y lactoferrina), y aproximadamente el 50% de esta son inmunoglobulinas γ -globulinas (Levieux *et al.*, 2002). Estas fracciones se desempeñan como factores antimicrobianos, citocinas y quimiocinas que contribuyen a proteger al recién nacido contra patógenos y otros desafíos ambientales postparto promoviendo el desarrollo gastrointestinal y del neonato (Bendixen *et al.*, 2011; Hurley y Theil, 2011). Con respecto a la fracción de sólidos no grasos, una buena concentración de estos es importante para el neonato ya que

en ella se encuentran contenidos los minerales y vitaminas que el cabrito necesita para su supervivencia (Blum y Hammon, 2000). Así, la mejora en estos componentes del calostro podría representar ventajas para el desarrollo del cabrito.

La lactosa sólo aumentó por efecto del tiempo pero no como efecto del grupo. En análisis fisicoquímicos en donde se ha determinado la concentración de lactosa en el calostro en diferentes momentos de muestreo se ha observado un efecto similar, ya que al paso del tiempo su concentración incrementa mientras que los demás componentes sólidos del calostro disminuyen (Hadjipanayiotou *et al.*, 1995; Hawken *et al.*, 2012; Páez, 2010; Sánchez *et al.*, 2014). Dado que la glucosa es el principal precursor de la lactosa en el calostro y leche (Cortez, 2008; Banchemo *et al.*, 2004; Kaneko *et al.*, 2008) la no similitud de sus valores sanguíneos entre grupos puede explicar que las concentraciones de lactosa hayan resultado similares en el calostro en todos los momentos de muestreo.

Aunque no se encontraron diferencias entre grupos en los valores de glucosa sanguínea de los cabritos, es interesante resaltar el incremento gradual de glucosa de hasta un 250% desde el nacimiento hasta las 12 horas posteriores, tiempo durante el cual los cabritos ya habían consumido dos tomas de calostro. Incrementos en la glicemia de hasta un 280% durante los primeros dos días de vida, se han descrito en cabritos luego del consumo de calostro (Yanaka *et al.*, 2012). La cantidad consumida de calostro tendió a correlacionarse positivamente con los niveles de glucosa de los cabritos a las 12 horas, lo que sugiere la utilidad del calostro como fuente energética para el neonato (Pattinson y Thomas, 1995); ello le ayudaría a enfrentar con mayor eficacia los elementos ambientales luego del nacimiento, en particular la termorregulación.

En el presente estudio se observó un marcado descenso en los niveles de inmunoglobulinas totales en el calostro desde las 0 y hasta las 12 horas postparto. Estos resultados son consistentes con trabajos en que se midió la concentración de inmunoglobulinas totales en el calostro de cabras a través del tiempo (Levieux *et al.*, 2002; Blum y Hammon, 2000; Linzell y Peaker, 1974; Marounek *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012). Este efecto se asocia a la degradación fisiológica de las inmunoglobulinas en el neonato y la incapacidad de éste para producirlas (Logan *et al.*, 1972 citado en Castro *et al.*, 2005b) por falta de madurez del sistema inmunológico (Romero, 2013).

La falta de correlación significativa entre el calostro consumido y la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de los cabritos contrasta con los hallazgos de Halliday *et al.* (1979). Dichos autores describieron una correlación positiva entre el consumo de calostro y la concentración de inmunoglobulinas en el suero de corderos que consumieron cantidades diferentes y en momentos distintos desde el nacimiento. En este caso, dado que el calostro no difirió en la concentración de inmunoglobulinas ni fue consumido en cantidades distintas entre tratamientos, era de esperarse la falta de correlación. Es de notar que durante el periodo de estudio, la mortalidad de los cabritos fue de tan solo 2.6%, lo cual apoya que la población de cabritos habría recibido una concentración adecuada de IgG (O'Brien y Sherman, 1993) que les permitió contar con una viabilidad adecuada durante la lactancia.

La concentración sérica de inmunoglobulinas en los cabritos no difirió entre grupos en ningún momento del muestreo. Ello puede deberse a que ambos grupos consumieron una cantidad semejante de calostro con una concentración similar de inmunoglobulinas. En casos en que se administra calostro con diferentes concentraciones de inmunoglobulinas, el

calostro con mayores concentraciones promueve a su vez una mayor cantidad de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de la cría (Castro *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009). Además, la administración de un volumen mayor de calostro también aumenta las inmunoglobulinas séricas (Connely *et al.*, 2014; Orsel *et al.*, 2000).

A las 0 horas se detectaron niveles traza de inmunoglobulina G en el suero de ambos grupos de cabritos, las cuales no fueron cuantificadas por el lector del equipo utilizado; este hallazgo es consistente con el de otros autores que reportan concentraciones basales de inmunoglobulinas en el suero de neonatos de esta especie sin consumir calostro (Cooper *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2014; Linhares *et al.*, 2013), cuyo origen debe ser transplacentario (Castro *et al.*, 2011). Todo ello pone en duda la condición del cabrito como “agammaglobulinémico” al nacer (Argüello *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005); recientemente al animal recién nacido se le ha atribuido la condición de “hipogammaglobulinémico” (Hernández *et al.*, 2015). Para explicar la presencia de inmunoglobulinas en el suero de neonatos rumiantes que no han consumido calostro es necesaria la realización de estudios que pongan en evidencia la presencia de los receptores de IgG 1 en la placenta y su comportamiento en el feto (Castro *et al.*, 2011).

A las 6 horas se observaron incrementos significativos de inmunoglobulinas séricas en el suero de los cabritos de ambos grupos posterior a la primera toma de calostro, esta concentración sugiere que el origen de estas inmunoglobulinas es exógeno, provenientes del calostro consumido al nacer. Resultados similares se han descrito en otros trabajos (Hernández *et al.*, 2015; Linhares *et al.*, 2013; Argüello *et al.*, 2004). A los 21 y 42 días de edad se detectaron niveles inferiores de inmunoglobulinas totales a los encontrados a las 6 y 12 horas después del nacimiento. La concentración sérica de IgG disminuye con relación a

la edad del animal (Hernández *et al.*, 2015). Al parecer, el descenso en la concentración de inmunoglobulinas se asocia a que el sistema inmune de los rumiantes madura hasta después de los 40 días de edad (Romero, 2013), periodo que coincide con el término de la vida media de las IgG de origen materno y comienza la producción endógena de anticuerpos (Linhares *et al.*, 2013).

No se encontraron diferencias entre el peso al nacimiento de ambos grupos. Este fue un hallazgo similar al encontrado por Martínez (2009) en donde la complementación 15 días antes del parto con maíz quebrado no tuvo efecto sobre el peso al nacimiento. Se observó una correlación positiva entre el peso al nacimiento y el consumo total de calostro, lo que podría explicarse por una mayor capacidad de consumo en los neonatos más pesados al nacimiento. Castillo *et al.* (2013) observaron una correlación positiva entre el peso al nacimiento y el peso al destete lo que se sugiere una mayor actividad de succión en animales que nacen con un peso superior (Ramírez-Vera *et al.*, 2012).

La función principal del calostro es proporcionar inmunidad pasiva al neonato mediante la ingesta de inmunoglobulinas de IgG (Botéquio *et al.*, 2012), además de representar la primer fuente de energía para las primeras horas de vida del recién nacido por su alto contenido de elementos nutricionales. Su calidad inmunológica se basa en la cantidad de inmunoglobulinas que contiene, y la variedad de agentes a las que van dirigidas. Como consecuencia del consumo de estas inmunoglobulinas el animal adquiere una gran variedad de anticuerpos preformados (Kindt *et al.*, 2010). Las inmunoglobulinas se encuentran en la fracción proteica del calostro así que una buena concentración de éstas, combinado con un adecuado manejo y consumo del calostro, mejoraría la viabilidad del neonato (O'Brien y Sherman, 1993).

11- Conclusiones

1.- La complementación alimenticia con 500g de concentrado en los últimos 10 días de gestación permite incrementar el volumen de calostro producido al parto por cabras primerizas.

2.- La complementación incrementó la concentración en calostro de grasa, proteína y sólidos totales en el calostro.

3.- No se obtuvo evidencia de que la complementación mejore la concentración de inmunoglobulinas totales en calostro y en suero sanguíneo de las crías.

12- Bibliografía

Argüello A. Lactancia Artificial en cabritos: Importancia del encalostrado, crecimiento de la canal y de la carne. Tesis de doctorado. Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 2000.

Argüello A., Castro, N. Capote, Tyler J., Holloway N. 2004a. Effect of colostrum administration practices on serum IgG in goat kids. *Livestock Production Science* 90: 235-239.

Argüello A., Castro N., Zamorano M., Castro A., Capote J. 2004b. Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. *Small Ruminant Research* 54:237-241.

Banchero G., Quintans G., Martin G., Lindsay D., Milton J. 2004a. Nutrition and colostrum production in sheep. 1. Metabolic and hormonal responses to a high-energy supplement in the final stages of pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development* 16:633-643.

Banchero G., Quintans G., Martin G., Milton J., Lindsay D. 2004b. Nutrition and colostrum production in sheep. 2. Metabolic and hormonal responses to different energy sources in the final stages of pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development* 16:645-653.

Banchero G., Quintans G., Vazquez A., Gigena F., La Manna A., Lindsay D., Milton J. 2007. Effect of supplementation of ewes with barley or maize during the last week of pregnancy on colostrum production. *Animal* 1: 625-630.

Bendixen E., Danielsen M., Hollung K., Gianazza E., Miller I. 2011. Farm animal proteomics a review. *Journal of Proteomics* 74:282–293.

Blum J., Hammon H. 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science* 66:151-159.

Botéquio M., Nordi M., Lima L., Pauletti I., Machado N. 2012. Goat kids' intestinal absorptive mucosa in period of passive immunity acquisition. *Livestock Science* 144: 1–10.

Castillo S., Rivera J., González A., Martínez-González J. 2013. Comportamiento predestete de cabritos cruzados en Guanajuato, México. *Revista MVZ Córdoba* 18:3607-3611.

Castro Navarro Noemí. Inmunidad humoral y celular en el ganado caprino: uso de calostros alternativos, conservación e higienización del calostro y efecto de la inclusión de ácido linoleico conjugado en la dieta. Departamento de Morfología. Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 2005.

Castro N., Capote J., Álvarez S., Argüello A. 2005. Effects of lyophilized colostrum and different colostrum feeding regimens on passive transfer of immunoglobulin G in Majorera goat kids. *Journal of Dairy Science* 88:3650-3654.

Castro N., Capote J., Argüello A. 2005. Conservación y manejo del calostro caprino. Sitio Argentino de producción animal.

Castro N., Capote J., Bruckmaier R., Argüello A. 2011. Management effects on colostrogenesis in small ruminants: a review. *Journal of Applied Animal Research* 32:85-93.

Celi P., Di Trana A., Claps Salvatore. 2008. Effects of perinatal nutrition on lactational performance, metabolic and hormonal profiles of dairy goats and respective kids. *Small Ruminant Research* 79:129-136.

Chadio S., Katsafadou A., Kotsampasi B., Michailidis G., Mountzouris K., Kalogiannis D., Christodoulou V. 2016. Effects of maternal undernutrition during late gestation and/or lactation on colostrum synthesis and immunological parameters in the offspring. *Reproduction, Fertility and Development* 28:384–393.

Coligan J. 2008. Isolation and Analysis of Proteins en *Current Protocols in Immunology*. 83:8.0.1–8.0.3.

Conneely M., Berry D., Murphy J., Lorenz I., Doherty M., Kennedy E. 2014. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 97:6991-7000.

Cooper L., Auad J., Cerutti J., Lozano A., Aguilar A., Sola M. 2014. Dinámica de la transferencia de inmunoglobulina G en el binomio madre-cría de la especie caprina. *Revista Veterinaria* 25(2):105-108

Cortéz Maya Rosaura Casilda. Evaluación de los efectos de la complementación con maíz en los últimos quince días de gestación, sobre los niveles de progesterona, glucosa y calidad de calostro en cabras desnutridas. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.

Csapó J., Csapó K., Martin T., Szentpeteri J., Wolf P. 1994. Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *International Dairy Journal* 445-458.

Dos Santos, G., Bertolini, D., 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: 285-292.

Dwyer C., Alistair B., Bishop S., Lewis M. 2003. Ewe-lamb bonding behaviours at birth are affected by maternal undernutrition in pregnancy. *British Journal of Nutrition* 89:123–136.

Goodwin N., Norton B., 2004. Improving doe nutrition immediately prior to kidding increases kid survival. *Animal Production in Australia* 25:251.

Halliday R., Williams M. 1979. The absorption of immunoglobulin from colostrum by bottle-fed lambs. *Annals of Veterinary Research* 4:549-556.

Hawken P., Williman M., Milton J., Kelly R., Nowak R., Blache D. 2012. Nutritional supplementation during the last week of gestation increased the volume and reduced the viscosity of colostrum produced by twin bearing ewes selected for nervous temperament. *Small Ruminant Research* 105:308-314.

Hernández L., Morales I., Sánchez D., Mireno I., Torres A., Capote J., Argüello A., Castro N. 2014. The effect of colostrum source (goat vs sheep) and timing of the first colostrum feeding (2h vs 14 h after birth) on body weight and immune status of artificialy reared newborn lambs. *Journal of Dairy Science* 98:204-210.

Hernández L., Moreno I., Morales A., Sánchez D., Torres A., Capote J., Argüello A., Castro N. 2015. The effect of milk source on body weight and immune status of lambs. Aceptado Livestock Science DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.02.011>.

Hurley W., Theil P. 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 3:442-474.

Jan-Christer J. 2011. "Introduction to protein purification" En *Protein purification Principles, High Resolution Methods, and Applications*. Tercera edición. Ed. John Wiley & Sons, Inc. E.U.A.

Kaneko J., John Harvey W., Bruss M. 2008. "Proteins, proteomics, and the dysproteinemias" En *Clinical biochemistry of domestic animals*. Sexta ed., Ed. Elsevier. E.U.A.

Karakuş F., Atmaca M. 2016. The effect of ewe body condition at lambing on growth of lambs and colostrum specific gravity. *Archives Animal Breeding* 59:107–112.

Kindt T., Goldsby R., Osborne B. 2010. *Inmunología de Kuby*. Sexta ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

Kolb, E., Kaskous, S. 2003. Bestandteile des kolostrums und der milch von ziegen und deren bedeutung für die gesundheit der ziegenlämmer (Übersichtsreferat) (Constituents of the colostrum and the milk of goats and their significance for the health of kids (A review). *Tierärztliche Umschau* 58:140-146.

Levieux D., Morgan F., Geneix I., Bouvier F. 2002. Caprine immunoglobulin G, β -lactoglobulin, α -lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early *post partum* period. *Journal of Dairy Research* 69:391-399.

Linhares A., Botéquio M., Wiolene N., Pauletti P., Susin I., Machado R. 2013. Electrophoretic profile of serum proteins of goat kids fed with bovine colostrum *in natura* and lyophilized. *Small Ruminant Research* 113:278-282.

Linzell J., Peaker M. 1974. Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. *The Journal of Physiology* 24:129–151.

Luttman W. 2008. *Inmunología. Manual de técnicas de investigación en el laboratorio*. Ed. Acribia. España.

Marounek M., Pavlata L., Mišurová L., Volek Z., Dvořák R. 2012. Changes in the composition of goat colostrum and milk fatty acids during the first month of lactation. *Czech Journal Animal Science* 57:28-33.

Martin G., Kadokawa H. 2006. "Clean, Green and Ethical" Animal Production. Case Study: Reproductive Efficiency in Small Ruminants. *Journal of Reproduction and Development* 52:145-152.

Martínez Aranda Hochimi Eder. Efecto de tres niveles de maíz sobre producción de calostro de ovejas pelibuey y crecimiento de corderos lactantes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

Meléndez J., Hernández R., Ortega J. 2005. Perfil inmunológico y nutritivo del calostro y leche de cabra en la comarca lagunera. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas* 4: 57-62.

Mellado M., Pittroff W., García J., Mellado J. 2008. Serum IgG, blood profiles, growth and survival in goat kids supplemented with artificial colostrum on the first day of life. *Tropical Animal Health and Production* 40:141-145.

Mellor DJ, Murray L. 1985. Effects of maternal nutrition on udder development during late pregnancy and on colostrum production in Scottish Blackface ewes with twin lambs. *Research in veterinary science* 39:230-234.

Micusan V., Boulay G., Borduas A. 1976. The role of colostrum on the occurrence of immunoglobulin G subclasses and antibody production in neonatal goats. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 40(2):184-9.

Moreno-Indias I., Sánchez D., Castro N., Morales-delaNuez A., Hernández-Castellano L., Capote J., Arguello A. 2012. Chemical composition and immune status of dairy goat colostrum fractions during the first 10h after partum. *Small Ruminant Research* 103: 220-224.

Murphy P., McNeill D., Fisher J., Lindsay D. 1996. Strategic feeding of Merino ewes in late pregnancy to increase colostrum production. *Proc Australian Society of Animal Production* 21:227-230.

Norma Mexicana NMX-F-728-COFOCALEC-2007 Sistema producto leche – alimentos – lácteos – leche cruda de cabra – especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de

prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de Enero de 2008.

O'Brien J., Sherman D. 1993. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. *Small Ruminant Research* 11:71-77.

Orsel K., van Amerongen J., Zadoks R., van Doorn D., Wensing T. 2000. Serum gamma globulin concentration in goat kids after colostrum administration: effect of time of administration, volume and type of colostrum. *ijdschr Diergeneeskd.* 23:709-12.

Páez A. Características microbiológicas y fisicoquímicas del calostro de cabras lecheras en estabulación total. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.

Pattinson S., Thomas E. 2004. The effect of sire breed on colostrum production of crossbred ewes. *Livestock Production Science* 86:1, 47-53.

Pugh D., Baird A. 2012. *Reference Intervals and Conversions en Sheep and goat medicine.* Segunda ed. Ed. Elsevier. E.U.A.

Ramírez S., Terrazas A., Delgadillo J., Serafin N., Flores J., Elizundia J., Hernández H. 2012. Feeding corn during the last 12 days of gestation improved colostrum production and neonatal activity in goats grazing subtropical semi-arid rangeland. *Journal of Animal Science* 90: 2362-2370.

Rodríguez C., Castro N., Capote J., Morales-delaNuez A., Moreno-Indias I., Sánchez-Macías D., Argüello A. 2009. Effect of colostrum immunoglobulin concentration on immunity in Majorera goat kids. *Journal of Dairy Science* 92:1696–1701.

Romero T., Beltrán M., Rodríguez M., Martí A., Molina M. 2013. Short communication: Goat colostrum quality: Litter size and lactation number effects. *Journal of Dairy Science* 96:7526–7531.

Romero J. 2013. “Criterios en la vacunación de ovinos” En Módulo 5. Diplomado en Vacunología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Romero T., Beltrán M., Pérez I., Rodríguez M., Molina M. 2014. Effect of the presence of colostrum on microbial screening methods for antibiotic detection in goats' milk. *Small Ruminant Research* 121:376-381.

Rudovsky A., Locher L., Zeyner A., Sobiraj A., Wittek T. 2008. Measurement of immunoglobulin concentration in goat colostrum. *Small Ruminant Research* 74: 265-269.

Sánchez E. Efecto del maíz rolado sobre ganancias de peso de ovejas y corderos, composición química del calostro y la leche de ovejas pelibuey durante la lactancia. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.

Sánchez I., Moreno N., Castro A., Morales A., Argüello A. 2014. From goat colostrum to milk: physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *Journal of Dairy Science* 97:10–16.

Yanaka R., Camargo D., Dos Santos W., Cavassano S., Bovino F., Mendes L., Peiró J., Feitosa F. 2012. Glicemia, proteinograma e perfil de alguns componentes bioquímicos

séricos de cabritos de raça Bøer. Brazil Journal of Veterinary Research and Animal Science 49:30-38.

Yilmaz Ö., Kaşıkçı G. 2013. Factors affecting colostrum quality of ewes and immunostimulation. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 37: 390-394.

13- Apéndices

13.1- Soluciones para electroforesis

1.- Solución salina fisiológica

- Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g

Se disuelve en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza en autoclave

2.- Solución amortiguadora de carga

Para preparar 1 ml de solución

- Glicerol 200 μ l
- Azul de Bromofenol cbp

Se toma con la punta de un palillo el clorante azul de bromofenol y se disuelve en 800 μ l de solución salina fisiológica, posteriormente se agrega el glicerol agitando con un vortex.

3.- Solución amortiguadora de corrida

Para preparar 1 litro

- Ácido Bórico al 0.3M 9.27g
- Hidróxido de Sodio al 0.1M 3.9g

Se disuelve el Hidróxido de Sodio en 1000ml de agua destilada y posteriormente se agrega el ácido bórico hasta obtener una mezcla homogénea. Ajustar el pH a 8.6.

4.- Solución Amortiguadora de Tris-Glicina

Para preparar 150 ml

- Glicina al 0.3M 3.37g
- Tris al 0.1163M 2.11g

Se disuelven los componentes en 150 ml de agua destilada.

5.- Agarosa al 1%

Para preparar 150 ml

- Agarosa de bajo punto de fusión 1.5g

Se disuelve la agarosa en 150 ml de solución amortiguadora de tris-glicina aplicando calor poco a poco hasta que quede transparente.

6.- Solución de Ácido Tricloroacético al 5%

Para preparar 100 ml

- Ácido tricloroacético 5g

Se disuelve el ácido en 95 ml de agua destilada.

7.- Solución para teñir proteínas con Rojo de Ponceau

Para preparar 100 ml

- Colorante Rojo de Ponceau 0.5g

Se disuelve el colorante en 100 ml de una solución de ácido tricloroacético al 5%.

8.- Solución lavadora de ácido acético glacial

Para preparar 500 ml

- Ácido Acético Glacial 25 ml

Se disuelve el ácido acético glacial en 475 ml de agua destilada.

13.2- Soluciones para purificación de IgG

1.- Solución amortiguadora de fosfatos (SAF)

Primero se preparan por separado las siguientes soluciones:

a) Solución de Sorensen

- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 8.33 g
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1.09 g

Se disuelven en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.6 y se esteriliza en autoclave.

b) Solución salina fisiológica

- Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g

Se disuelven en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza en autoclave.

c) Se mezclan 80 ml de solución de Sorensen con 920 ml de SSF, se ajusta el pH a 7.2.

2.- Solución de Sulfato de Amonio al 90%

Para preparar 100 ml

- Sulfato de amonio anhidro 90 g

Se disuelve el sulfato de amonio en 1000 ml de agua destilada aplicando calor para obtener una solución homogénea.

3.- Solución de Cloruro de Bario

Para preparar 50 ml

- Cloruro de Bario 6.1g

Se disuelve el cloruro de bario en 50 ml de agua destilada.

13.3- Purificación de IgG mediante precipitación con Sulfato de Amonio

1. Centrifugar el suero en refrigeración (0°C-2°C) a 5000 r.p.m durante 10 minutos
2. Eliminar el sedimento
3. Medir la cantidad de suero
4. En caso de que el suero presente grasa, se le agrega la misma cantidad de cloroformo y se centrifuga a 2000 r.p.m durante 10 minutos.
5. Preparar 3 veces más de Sulfato de Amonio saturado al 90%, que la cantidad que se tiene de suero. Para preparar el Sulfato de Amonio se deja en Baño serológico a más de 60°C hasta que se disuelva, agitando ocasionalmente.
6. En baño frío y agitación con bala magnética, poner cantidades iguales de suero, solución salina fisiológica (SSF) al 0.85 - 0.90%% y Sulfato de Amonio saturado, este último debe agregarse gota a gota durante 15 minutos.
7. Una vez precipitadas las gammaglobulinas (se observa turbidez uniforme), se deja 60 minutos en agitación e hielo.
8. Centrifugar en refrigeración a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos.
9. Eliminar el sobrenadante y con un gendarme, desprender poco a poco las gammaglobulinas del fondo del tubo, agregando a la vez y lentamente igual volumen de SSF y sulfato de amonio (mismo proceso que la primera vez).

10. Repetir centrifugado y precipitación hasta completar 3 veces, entre cada centrifugación dejar precipitar 15 minutos.
11. Una vez terminada la última centrifugación, obtener el sedimento (gammaglobulinas) y diluirlas en la mínima cantidad posible de SSF.
12. Empacar en membranas de diálisis de 35 mm x 100' (12,000-14,000) y dializar contra PBS 7.2, durante 24 horas en refrigeración y agitación constante, haciendo cambio de PBS cada 6 horas, los 2 últimos cambios hacerlos con SSF.
13. Para comprobar que el dializado ya no tenga sulfato de amonio, seguir las indicaciones de Cloruro de Bario.

13.4- Prueba de Cloruro de Bario

Para determinar si se ha quitado por completo el sulfato de amonio al dializado de las gammaglobulinas, mezclar en un tubo de ensaye 1 ml de la solución de diálisis con 1 ml de la solución de Cloruro de bario, si se pone turbia la mezcla indica que hace falta seguir dializando las gammaglobulinas pues todavía hay sulfato de amonio. Si no se observa cambio indica que ya es suficiente.