

MÉTODO Y COMPOSICIÓN PARA SOPORTAR CONCENTRACIONES DE CALCIO EN SANGRE NORMALES EN MAMÍFEROS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Esta descripción se refiere a un medicamento oral y la administración de tal medicamento a un mamífero periparturiente para prevenir o tratar hipocalcemia en los primeros días después del parto.

 Mamíferos, y en particular vacas lecheras, comienzan a amamantar después del parto y el inicio de la lactancia puede extraer más calcio de la sangre circulatoria para colocación en leche que el cuerpo del animal puede reemplazar de nuevo en la sangre circulatoria a partir del calcio dietético y reservas de calcio en huesos. La concentración de calcio en sangre (determinada en plasma o suero) en una vaca lechera ser aproximadamente 9 a 10 mg/dl (2.25 a 2.5 mM) con el fin de que el calcio realice sus funciones principales en el cuerpo. Sin embargo, una forma aguda y severa de hipocalcemia ocurre en casi 5% de vacas lecheras multíparas como un resultado del drenaje grande y repentino de calcio que ocurre al inicio de la lactancia (Goff, 2014). Estas vacas se acuestan y presentan paresis muscular, una condición clínica conocida como fiebre de la leche, que es frecuentemente letal si no se trata apropiadamente. Aproximadamente 50% de vacas lecheras multíparas y 25% de vaquillas experimentan un grado significativo de hipocalcemia que puede denominarse como hipocalcemia subclínica alrededor del momento del parto. La concentración de calcio en suero por debajo de lo que se dice que una vaca tiene hipocalcemia significativa varía dentro de la literatura de 8.0 a 8.6 mg/dl (2 a 2.15 mM). Aunque hipocalcemia puede tratarse con administración de calcio intravenosa u oral, las vacas con hipocalcemia significativa durante los primeros días de lactancia están en riesgo aumentado de disfunción inmune, metritis, desplazamiento del abomaso, placenta retenida, mastitis, y cetosis (Goff, 2014).

25 Afortunadamente, ganado y todos los mamíferos tienen un sistema que generalmente les permite restaurar concentraciones de calcio en sangre normales dentro de los pocos días después del parto. Homeostasis de calcio es mediada principalmente por la glándula paratiroides, que secreta hormona paratiroidea (PTH, por sus siglas en inglés) en respuesta a cualquier reducción en concentración de calcio en sangre. PTH estimula liberación de reservas de calcio en huesos y reduce la cantidad de calcio que se pierde en la orina. PTH también activa la enzima renal que produce la hormona de vitamina D, 1,25-dihidroxitamina D. La 1,25-dihidroxitamina D estimula absorción transcelular, también conocida como transporte activo, de calcio a través del epitelio intestinal para aumentar ampliamente la utilización de calcio dietético (Goff, 2018). Cuando homeostasis de calcio está trabajando apropiadamente la vaca experimenta únicamente una pequeña disminución y de corta duración en concentración de calcio en sangre durante el periodo periparturiente. Desafortunadamente, en aproximadamente la mitad de las vacas en un rebaño, la capacidad de mantener concentración de calcio en sangre por encima de aproximadamente 8 mg/dl (2 mM) en los primeros días de lactancia se deteriora. Una capacidad reducida de células óseas y renales para

responder a estimulación de PTH se ha implicado como el defecto en homeostasis de calcio que resulta en hipocalcemia prolongada o severa (Goff, 2014). Varios factores pueden interferir con homeostasis de calcio, causando disminuciones más drásticas y más duraderas en concentración de calcio en sangre. Factores de la vaca que afectan homeostasis de calcio incluyen edad avanzada de la vaca y raza.

Los factores nutricionales también influyen en la resiliencia del sistema de homeostasis de calcio. Cationes dietéticos, tal como potasio (K^+), sodio (Na^+), calcio (Ca^{+2}), y magnesio (Mg^{+2}), aumentarán el pH de la sangre de la vaca si se absorben en la sangre de la vaca. Aniones dietéticos, tal como cloruro (Cl^-), sulfato (SO_4^{-2}) y fosfato (PO_4^{-3}), acidificarán la sangre de la vaca si se absorben en la sangre. Cationes o aniones en la dieta que no se absorben no tienen impacto en pH de la sangre. La diferencia en el número de miliequivalentes de cationes y aniones absorbidos de la dieta ayuda a determinar el pH de la sangre (Goff, 2018). Las vacas típicamente están en estado de alcalosis metabólica compensada ya que su dieta consiste en forrajes que típicamente son altos en K^+ . Ya que K^+ se absorbe de la dieta con casi 100% de eficiencia, el K^+ en el forraje es fuertemente alcalinizante. Na^+ también es altamente alcalinizante ya que Na^+ de dieta o agua también se absorbe con casi 100% de eficiencia. Cationes de Ca^{+2} y Mg^{+2} se absorben de la dieta con mucho menor eficiencia que K^+ o Na^+ , pero pueden estar presentes en dietas en concentraciones relativamente altas de manera que Ca^{+2} o Mg^{+2} absorbidos contribuirán al estado alcalino de la sangre de la vaca.

Vacas en un estado de alcalosis metabólica compensada como un resultado de haber sido alimentadas con forrajes altos en K^+ no responden a estimulación de PTH así como también vacas colocadas en un estado de acidosis metabólica compensada por adición de aniones a su dieta (Goff, 2014). Alcalosis metabólica deteriora resorción de calcio en huesos (Block, 1994). Además, la capacidad de PTH para estimular producción oportuna de 1,25-dihidroxicolecalciferol se deteriora, reduciendo la utilización de calcio dietético. Ajustar diferencia de catión-anión en dieta para inducir una acidosis metabólica compensada es un medio comúnmente utilizado para reducir fiebre de la leche e hipocalcemia en vacas lecheras. Agregar cloruro y aniones de sulfato a la dieta pre-parto de la vaca puede reducir ampliamente el grado de hipocalcemia que la vaca experimentará en el parto. Esto restaura la sensibilidad de células óseas y renales a PTH lo que mejora mecanismos de homeostasis de calcio. Los detalles de manejo nutricional de la dieta alimentada antes y después del parto para reducir hipocalcemia en vacas lecheras se describirá (Goff, 2014). Dietas con aniones agregados pueden ser desagradables y pueden deprimir consumo de materia seca de la dieta antes del parto. Reducir consumo de la dieta alrededor del momento del parto puede aumentar susceptibilidad de la vaca a cetosis, metritis, y desplazamiento del abomaso. Sin embargo, hay advertencias sobre el uso de aniones para reducir hipocalcemia. Si la adición de aniones a la dieta falla al acidificar la vaca suficiente para causar pH de orina por debajo de aproximadamente 6.8, la efectividad de la dieta para reducir hipocalcemia se reduce ampliamente. Si el pH de la orina se reduce por debajo de 5.75 el consumo de materia seca puede disminuir y llevar a otros problemas metabólicos asociados con consumo de alimento reducido antes del parto. Aunque con

suplementación de anión apropiada puede mejorar homeostasis de calcio, puede ocurrir aún algo de hipocalcemia subclínica e incluso hipocalcemia clínica (fiebre de la leche).

En muchas vacas que sufren de hipocalcemia después del parto parece que la respuesta de homeostasis de calcio se retrasa con respecto de aquella de vacas que no sufren de hipocalcemia subclínica o clínica apreciable. Esto es particularmente evidente en vacas que desarrollan casos recurrentes de hipocalcemia clínica (Goff y otros, 1989). El tratamiento tradicional de la vaca con fiebre de la leche es administrar 10 a 12 gramos de calcio intravenosamente para restaurar rápida, aunque temporalmente, concentraciones de calcio en sangre a niveles que soportarán funciones de calcio normales, tal como función nerviosa y muscular. Esta intervención médica soporta concentraciones de calcio en sangre durante 6 a 10 horas lo que frecuentemente proporciona suficiente tiempo para que se activen mecanismos de homeostasis de calcio de la vaca. Después de activación completa de los mecanismos de homeostasis de calcio, la vaca obtiene suficiente calcio del hueso y de la dieta para soportar concentraciones de calcio en sangre normales mientras continúan perdiendo calcio para producción de leche. Sin embargo, en algunas vacas los mecanismos de homeostasis de calcio también se deterioran con vacas que recaen y tienen un segundo o tercer ataque de fiebre de la leche 12 a 24 horas después de la inyección de calcio. Como demostró Goff, y otros, (1989), estas vacas son muy lentas para producir 1,25-dihidroxitamina D. Una vez que empiezan a producir 1,25-dihidroxitamina D, obtienen control de homeostasis de calcio son capaces de mantener concentraciones de calcio en sangre sin tratamiento adicional. Las vacas que exhiben elevaciones tempranas de concentraciones de 1,25-dihidroxitamina D en sangre después del parto tienen una capacidad mejorada para mantener concentraciones de calcio en sangre normales que las vacas que no aumentan 1,25-dihidroxitamina D en sangre rápidamente después del parto. Otros estudios han demostrado que el pico de concentración de 1,25-dihidroxitamina D en sangre es inferior en las vacas normocalcémicas que producen 1,25-dihidroxitamina D inmediatamente después del parto que en vacas que producen 1,25-dihidroxitamina D posteriormente, ya que en las últimas vacas la 1,25-dihidroxitamina D se hace en respuesta a hipocalcemia más severa. (Goff y otros, 1991). Éstos y otros estudios provocaron que muchos investigadores estudien la administración de 1,25-dihidroxitamina D como un medio para prevenir hipocalcemia en vacas lecheras.

La administración de 1,25-dihidroxitamina D o sus análogos para vacas lecheras antes del parto se ha usado exitosamente para reducir hipocalcemia (Horst y otros, 1997). Desafortunadamente, tiene la desventaja que la predicción de tiempo de parto es crítica para su éxito. Si una sola dosis de 1,25-dihidroxitamina D o sus análogos se administra oral o parenteralmente menos de 12 a 24 horas después del parto o se administra sólo después del parto la 1,25-dihidroxitamina D no estimulará transporte activo de calcio suficientemente rápido para impactar hipocalcemia en muchas de las vacas. Si se da con demasiada anticipación antes del parto (más de 3 a 4 días), puede tener que administrarse una segunda incluso tercera dosis para ser efectiva. Al usar análogos 1,25-dihidroxitamina D con media vida de plasma más puede extender

la ventana terapéutica por 1 a 2 días pero aún debe administrarse al menos 12 a 24 horas después del parto para ser efectivo. Formulaciones de liberación prolongada de 1,25-dihidroxitamina D se han descrito, pero aún debe de administrarse antes del parto para ser efectivos. Administrar pequeñas dosis diariamente hasta o incluso después de los partos de las vacas también puede prevenir efectivamente hipocalcemia (Horst y otros, 1997). Sin embargo, la exposición prolongada a 1,25-dihidroxitamina D exógena puede inhibir la capacidad de la vaca lechera para hacer 1,25-dihidroxitamina D endógena, de manera que desarrolla hipocalcemia 4 a 10 días después que han disminuido los efectos de la 1,25-dihidroxitamina D exógena. Dosis más grandes de 1,25-dihidroxitamina D pueden entender la ventana efectiva ligeramente tal vez a 5 a 7 días antes del parto, pero esto también exacerba los problemas asociados con exposición prolongada a 1,25-dihidroxitamina D exógena (Horst y otros, 1997). Los problemas de tiempo de administración y posibilidad de inducir inhibición de síntesis de 1,25-dihidroxitamina D endógena disminuye ampliamente la practicalidad de uso de 1,25-dihidroxitamina D para prevenir hipocalcemia periparturienta.

Un segundo acercamiento para mantener concentraciones de calcio en sangre más normales en vacas periparturientas también ha sido administrar oralmente una gran dosis de calcio fácilmente solubilizado justo después del parto. Generalmente, se administran 30 a 75 g de calcio en la forma de un bolo, pasta o líquido. Al aumentar la concentración de calcio ionizado en el fluido (fluido ruminal o quimointestinal) directamente en contacto con células absorbentes por encima de aproximadamente 4 mM, el calcio puede absorberse al usar un mecanismo de transporte paracelular pasivo (Goff, 2018). Este mecanismo es independiente de estimulación por 1,25-dihidroxitamina D. Esto causa un aumento rápido pero limitado en concentración de calcio en sangre. Se ha demostrado que administración oral de 50 g de calcio en la forma de cloruro de calcio fácilmente solubilizado provocó que aproximadamente 4 g de calcio se absorbieran en la sangre de las vacas, lo que resulta en un aumento de calcio en sangre de aproximadamente 1 mg/dl (0.25 mM) dentro de 1 hora que duró aproximadamente 6 a 8 horas. Dosis más grandes pueden darse pero aumentan la ventana terapéutica (duración de calcio en sangre aumentó hacia lo normal) sólo por 1 a 3 horas (Goff, 1993). El acercamiento general para aumentar la ventana terapéutica es administrar una segunda o posiblemente tercera dosis de calcio oral a las 12 a 24 horas después de la primera dosis, que se administra generalmente dentro de horas del parto. Esto implica más trabajo para el ganadero para localizar y restringir a la vaca lechera y administrar cada dosis. Algunas veces también puede causar absorción excesiva de cloruro o sulfato; los aniones de las sales de calcio más comúnmente usadas. Esto puede causar que la vaca entre a un estado de acidosis metabólica no compensada que puede imponer desafíos a la salud adicionales a la vaca (Goff y Horst, 1994). Aunque únicamente se absorbe una pequeña porción de calcio administrado por la ruta paracelular, el resto es elegible para absorción una vez que se han activado los mecanismos de transporte de calcio activos por producción endógena de 1,25-dihidroxitamina D.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta descripción describe una composición para administración oral a un mamífero periparturiente en riesgo de desarrollar hipocalcemia dentro de 0 a 6 horas después del parto; la composición que comprende una forma de calcio que se puede absorber rápidamente por el mamífero periparturiente al usar transporte paracelular pasivo a través del epitelio intestinal y un compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada en una cantidad suficiente para estimular transporte activo de calcio través del epitelio intestinal, el calcio y la vitamina D 1-alfa hidroxilada que se administra concurrentemente para soportar mantenimiento de concentraciones de calcio en sangre normales en el mamífero periparturiente.

Esta descripción además describe que la forma de calcio administrado comprende, sólo o preferiblemente en combinación, sales de calcio fácilmente solubles en agua tal como cloruro de calcio, sulfato de calcio, propionato de calcio, acetato de calcio, lactato de calcio, o formato de calcio.

Esta descripción además describe en donde se incorpora cloruro de calcio en una cantidad suficiente para inducir una acidosis metabólica compensada dentro de 8 horas de administración para soportar sensibilidad normal de tejidos a hormona paratiroidea.

Esta descripción además describe que el compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada comprende 1,25-dihidroxitamina D o hidroxivitamina D 1-alfa hidroxilada o sus análogos en una cantidad suficiente para estimular rumen transcelular y/o absorción intestinal de calcio.

Esta descripción además describe que el compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada es un glucósido de 1,25-dihidroxitamina D como se encuentra en plantas o extractos calcinogénicos preparados a partir de las plantas calcinogénicas.

Esta descripción además describe que el compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada no se incorpora en una cantidad tan grande de manera que reduzca inhibición significativa de la inhibición de la enzima 25-hidroxitamina D 1-alfa hidroxilada, inhibiendo con ello producción endógena de 1,25-dihidroxitamina D, de manera que la hipocalcemia retrasada ocurre 4 a 10 días después de administración de la composición.

Esta descripción además describe la composición en donde el compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada y el calcio se administran concurrentemente en la forma de un bolo, tableta, o gránulo con una densidad de al menos 1.2 kg/L (g/mL) y se libera del bolo, tableta o gránulo durante un periodo de tiempo que es menor a 2 horas.

Esta descripción también describe un método para aumentar el nivel de calcio en sangre o para normalizar niveles de calcio en sangre o para mantener niveles de calcio normales o sanos en sangre o para evitar hipocalcemia de un mamífero; el método comprende administrar compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada y una fuente de calcio fácilmente soluble concurrentemente a un mamífero periparturiente justo después de parto.

Esta descripción también describe un método en donde el compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada y el calcio se administran concurrentemente en la forma de un bolo, tableta o gránulo con una densidad de al menos 1.25 kg/L (g/mL) y liberado del bolo, tableta o gránulo durante un periodo

de tiempo que es menor a 2 horas.

Esta descripción además describe un método en donde el compuesto de vitamina D 1 1-alfa hidroxilada y las sales de calcio del compuesto son capaces de soportar concentraciones de calcio en sangre más normales cuando se administran concurrentemente en una sola dosis sin ninguna
5 dosis adicional.

Esta descripción además describe un método en donde la composición es capaz de soportar concentraciones de calcio en sangre normales o reducir hipocalcemia si se administran a un mamífero periparturiente dentro de 6 horas del nacimiento, y muy preferido cuando se administran dentro de 3 horas del nacimiento.

10 Esta descripción además describe un método para reducir hipocalcemia en un mamífero periparturiente en riesgo de desarrollar hipocalcemia al inicio de la lactancia, tal como la vaca lechera.

Esta descripción además describe un método en donde la forma de calcio administrado incluye cloruro de calcio o sulfato de calcio en una cantidad suficiente para inducir una acidosis
15 metabólica compensada en el mamífero para soportar sensibilidad de los tejidos a hormona paratiroidea para mejorar homeostasis de calcio dentro de ocho horas de administración.

Esta descripción además describe un método en donde la forma de calcio es, sola o preferiblemente combinación, cloruro de calcio, sulfato de calcio, propionato de calcio, acetato de calcio, lactato de calcio, o formato de calcio en una cantidad suficiente para promover absorción de
20 calcio pasiva, independiente de vitamina D, paracelular para soportar concentraciones de calcio en sangre normales y reducir hipocalcemia durante las primeras 6 a 12 horas después de administración sin inducir una acidosis metabólica no compensada en el animal.

Esta descripción además describe un método en donde el compuesto de vitamina D 1 1-alfa hidroxilada comprende 1,25-dihidroxitamina D o vitamina D 1-alfa hidroxilada o sus análogos
25 administrados en una cantidad suficiente para estimular rumen transcelular y/o absorción intestinal de calcio para soportar concentraciones de calcio en sangre normales o reducir hipocalcemia de 12 horas a 72 horas después de administración.

Esta descripción además describe un método en donde el compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada es un glucósido de 1,25-dihidroxitamina D obtenido de plantas o extractos
30 calcinogénicos preparados de las plantas calcinogénicas administradas en una cantidad suficiente para estimular rumen transcelular y/o absorción intestinal de calcio para soportar concentraciones de calcio en sangre normales o reducir hipocalcemia de 12 horas a 72 horas después de administración.

Esta descripción además describe un método en donde el compuesto de vitamina D 1 1-alfa
35 hidroxilada no se incorporan una cantidad tan grande de manera que cause inhibición significativa de la enzima 25-hidroxitamina D-1-alfa hidrolasa normal, inhibiendo con ello producción endógena de 1,25-dihidroxitamina D, de manera que la hipocalcemia retrasada ocurre 4 a 10 días después de administración de la composición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una vista gráfica que muestra aumento en 1,25-dihidroxitamina D en plasma por 4 horas después de recibir el bolo.

5 La Figura 2 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en sangre después del parto que comparan vacas tratadas con vacas no tratadas.

La Figura 3 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en sangre después de parto que comprenden vacas tratadas y vacas no tratadas.

10 La Figura 4 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en sangre después de parto que comprende vacas tratadas y vacas no tratadas.

La Figura 5 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en plasma después de parto.

La Figura 6 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en plasma después de tratamiento y sin tratamiento.

15 La Figura 7 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en plasma después de tratamiento y sin tratamiento.

La Figura 8 es una vista gráfica que muestra niveles de calcio en plasma después de tratamiento y sin tratamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

20 Esta descripción describe un método para proporcionar una fuente fácilmente soluble de sales de calcio orales para promover absorción paracelular rápida de calcio y que acidificarán la vaca para mejorar sensibilidad al tejido a hormona paratiroidea, junto con 1,25-dihidroxitamina D o análogos 1-alfa hidroxilados exógenos de los mismos para promover absorción transcelular más prolongada y más eficiente de calcio dietético para prevenir o mitigar hipocalcemia y fiebre de la
25 leche. El método que preferiblemente proporciona la fuente soluble de sales de calcio y 1,25-dihidroxitamina D exógena o sus análogos justo después del parto. La fuente soluble de sales de calcio y 1,25-dihidroxitamina D exógena se proporcionan únicamente una vez. Justo después del parto significa que la fuente soluble de sales de calcio y 1,25-dihidroxitamina D exógena sus análogos se proporcionan dentro de 6 horas después del parto.

30 Los términos 1.25-de hidroxil O de hidroxil vitamina D y 1.25-OH₂D se usan intercambiablemente aquí y se deben considerar, sino referencia la misma estructura.

La estructura básica de 1,25-dihidroxitamina D y 1,25-OH₂D se usarán intercambiabilmente aquí y se deben considerar como haciendo referencia a la misma estructura.

35 La estructura básica de 1,25-OH₂D que comprende un secoesteroide. Los carbonos de este secoesteroide se enumeran por convención como se describe en Maestro y otros, (2019). Numerosos otros compuestos de vitamina D posibles que son 1 1-alfa hidroxilados podrían usarse además de o en lugar de 1,25-OH₂D, incluyendo pero no limitado a aquellos enlistados en Maestro y otros, (2019).

A menos que esté implícito específicamente lo contrario, “vitamina D” sin un subíndice, usado sólo, como un sufijo o prefijo, o como un modificador, se refiere a cualquiera de vitamina D₂ (ergocalciferol), vitamina D₃ (cholecalciferol), vitamina D₄ (22-dihidroergocalciferol), y vitamina D₅ (sitocalciferol).

Secoesteroides de vitamina D que son hidrolizados en carbono número 1 en la configuración alfa se denominarán como compuestos “vitamina D 1-alfa hidroxilada”. Los compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada incluyen compuestos 1,25-dihidroxitamina D (es decir, 1,25-dihidroxitamina D₂, 1,25-dihidroxitamina D₃, 1,25-dihidroxitamina D₄, y 1,25-dihidroxitamina D₅); sus análogos activos; o sus análogos inactivos que aumentan el nivel en sangre, tejido, o celular de un compuesto de 1,25-dihidroxitamina D o un análogo activo de éste.

“Análogos”, usados con referencia a compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilados, se refiere a precursores biológicos de compuestos 1,25-dihidroxitamina D, metabolitos biológicos de compuestos 1,25-dihidroxitamina D, o cualquier compuesto natural o sintético reconocido en la técnica como teniendo una similitud estructural a, o que se deriva de, compuestos 1,25-dihidroxitamina D.

“Activos” usado con referencia a compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada y sus análogos se refiere a hechos análogos que producen directamente de un efecto dependiente de vitamina D en un tejido objetivo o célula objetivo sin modificarse o metabolizarse adicionalmente por un tejido no objetivo, célula no objetivo, u otro sitio en otra parte en el cuerpo. Cuando se usa para modificar “vitamina D 1-alfa hidroxilada”, el término “activo” se refiere a compuestos 1,25-dihidroxitamina D o sus análogos activos. Un análogo “inactivo” de un compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada también útil para esta invención es uno que no es directamente capaz de producir un efecto dependiente de vitamina D en un tejido objetivo o célula objetivo sin modificarse o además metabolizarse por un tejido no objetivo, célula no objetivo, u otro sitio de otra parte en el cuerpo. “Efectos dependientes de vitamina D” incluyen cualquiera de los efectos aquí descritos, conocidos en la técnica, o en lo sucesivo descubiertos que resultan de administración o tratamiento de compuestos 1,25-dihidroxitamina D. Ejemplos de efectos dependientes de vitamina D incluyen, sin limitación, estimulación de absorción de calcio transcelular a través del rumen y epitelio intestinal y acciones anabólicas y catabólicas en hueso.

Análogos biológicamente inactivos de 1,25-dihidroxitamina D sobre los que se actúa dentro del cuerpo para formar 1,25-dihidroxitamina D biológicamente activa o sus análogos pueden usarse. Generalmente son menos costosos para usar que 1,25-dihidroxitamina D. Un compuesto tal es 1-Alfa vitamina D₃, que se hidroxila a la posición de carbono 25 para formar 1,25-OH₂D₃ activo. Otros compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada útiles en la práctica de la invención pueden contener de uno a cinco pro restos, que pueden estar en cualquiera de las posiciones C-1, C-3, C-24, o C-25, indirectamente, en posición C-26. Para los propósitos de esta descripción, se entiende que el pro resto puede anexarse cualquier grupo hidroxilo que existe en la forma escindida (libre) de 1,25OH₂D. Por ejemplo, en 1,25-dihidroxitamina D, un pro resto puede anexarse al grupo hidroxilo

en posiciones C-24, C-25, C3, o cualquier combinación de los mismos.

En compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada, los pro restos pueden incluir grupos sulfato o glicona. Por "resto de gliconas" significa glicopiranosilo o glicofuranosilo, así como también derivados de azúcar amino de los mismos y otros restos tal como glucuronidos. Los restos de glicona de glucósidos de vitamina D pueden comprender hasta 20 unidades de glicona. Preferidos son aquellos con un enlace β -glucósidos como existen en las plantas calcinogénicas tal como *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum*, and *Trisetum flavescens*.

La cantidad de compuesto vitamina D 1-alfa hidroxilada requeridos para ser efectivos para mantenimiento de concentración de calcio en sangre normal o reducir hipocalcemia, por supuesto, variarán con el mamífero individual que se trata y finalmente está a discreción del practicante veterinario o ganadero. Los factores a considerar incluyen la naturaleza de la formulación, el peso corporal del mamífero, área de superficie, edad, condición general, y el compuesto particular que se va a administrar. En general, una dosis efectiva adecuada de actividad equivalente de 1,25-dihidroxitamina D3 está en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, preferiblemente 0.2-1 $\mu\text{g/kg}$, y muy preferidos 0.25 a 0.5 $\mu\text{g/kg}$.

La vitamina D 1-alfa hidroxilada exógena y la sal de calcio se administran preferiblemente al mamífero en una forma preferida de un bolo. Para propósitos de esta solicitud un bolo comprende una masa redondeada típicamente de forma cilíndrica con una densidad mayor que 1.2 g/mL para asegurar que no flota sobre la plataforma flotante de rumen de un rumiante. Cualquier forma está dentro del alcance de esta descripción y es adecuada para administración al mamífero particular que se trata. También, para propósitos de esta solicitud, el término mamífero como se usa aquí aplicará a todo el ganado tal como todos los bovinos, búfalos, cerdos, caballos, mulas, burros, ovejas, y cabras. De interés especial son las vacas lecheras.

Numerosos documentos en la literatura como se resumió en Horst y otros, (1997), describen el uso de compuestos 1-alfa hidroxilados administrados antes del parto como un medio para prevenir o reducir el radio de hipocalcemia que un animal puede experimentar al inicio de la lactancia. Estos compuestos son efectivos debido a que estimulan el transporte transcelular o activo de calcio a través del tracto intestinal y también pueden mejorar liberación de calcio en huesos. Uso de compuestos de vitamina D para control de hipocalcemia no se han adoptado ampliamente debido a tres problemas. Estos son tiempo de administración del compuesto de vitamina D con relación al parto, posibilidad de causar toxicidad a partir de hipercalcemia excesiva, y la posibilidad de causar inhibición de síntesis endógena de 1,25-dihidroxitamina D, causando que hipocalcemia ocurra algunos 4 a 10 días después que han disminuido efectos de compuesto de vitamina D administrado. El tiempo de administración de la técnica anterior requiere que el compuesto de vitamina D se administre dentro de una ventana de algunos días antes del parto para ser eficaz. Los compuestos de 1-alfa vitamina D de la técnica anterior se tienen que dar al menos 12 a 24 horas antes del parto ya que la 1-Alfa vitamina D requiere 12 a 24 horas para iniciar transcripción y traslación de proteínas involucradas en el transporte activo de calcio a través de epitelio intestinal. Por ejemplo, si se

administra 1-alfa hidroxivitamina D3 o 1.25-dihidroxivitamina D3 más de 4 días antes del parto no son efectivos como los efectos benéficos de estos compuestos en transporte activo de calcio que disminuirán antes de los partos de las vacas. Puede ser muy difícil predecir de manera precisa que una vaca va a parir entre 24 y 96 horas después de administración del compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada. Ya que esto es muy difícil, la técnica anterior generalmente recomienda que se administre una segunda dosis si la vaca no varió dentro de 4 a 5 días de que se administra la primera dosis (Horst y otros, 1997). Dosis más grandes o uso de análogos más potentes de 1,25OH2D pueden extender la ventana de efectividad por 1 a 3 días, pero también pueden causar problemas asociados con hipercalcemia y toxicidad aguda. Complicar esto es un tercer problema. Como se describió en Horst y otros, (1997), se repitió dosificación o administración de altas dosis de compuestos de vitamina D para prevenir hipocalcemia y fiebre de la leche lo que puede resultar en inhibición sustancial de síntesis endógena de 1,25-dihidroxivitamina D. Esto puede resultar en desarrollo de hipocalcemia algunos 4 a 10 días después que han disminuido los efectos benéficos de los compuestos de vitamina D.

De conformidad con la enseñanza del documento patente de EE.UU. No. 9,757,415 una composición que comprende glucósidos de *Solanum glaucophyllum* para prevenir y/o tratar hipocalcemia y para estabilizar niveles de calcio en sangre en vacas lecheras puede producirse lo que no causa hipercalcemia excesiva o causa inhibición excesiva de la síntesis endógena de 1,25-dihidroxivitamina D. La composición utiliza glucósidos de 1,25OH2D3 derivado de hojas de *Solanum glaucophyllum* como una fuente de un compuesto de vitamina D 1-alfa hidroxilada que se convertirá a 1,25OH2D3 por escisión microbiana de rumen del(de los) glucósido(s) que libera(n) 1,25OH2D3. Una ventaja de este acercamiento es que el material de hoja no es costoso y puede considerarse una fuente de forraje natural de un compuesto de 1-alfa vitamina D. Calcio en la forma de dolomita se mezcla con glucósido de *Solanum glaucophyllum* para formar un bolo comprimido duro que únicamente se solubiliza lentamente en los fluidos de rumen que proporcionan una liberación más prolongada de glucósido de *Solanum glaucophyllum* en los fluidos de rumen. Para ser más efectiva, la composición de esta patente debe administrarse entre 24 y 72 horas antes del parto. El calcio en la forma de caliza dolomítica no es fácilmente soluble en fluido de rumen y no puede absorberse a ninguna gran medida por la trayectoria paracelular independiente de vitamina D a través del lumen y epitelio intestinal. Por lo tanto, el calcio dolomítico no contribuirá sustancialmente a mantenimiento de concentraciones en calcio en sangre normales antes de activación de las trayectorias de absorción de calcio transcelular iniciadas por el 1,25OH2D liberado de los glucósidos 1,25OH2D contenidos dentro de la hoja de *S glaucophyllum*. La composición podría administrarse hasta 72 horas antes del parto, lo que es similar a una técnica anterior. Ya que predicción del tiempo de parto puede ser difícil en la vaca, la vaca no parida dentro de 5 días de administración del bolo de liberación lenta y puede administrarse un segundo bolo. El obstáculo principal para el uso de esta preparación es, como con la mayoría de la técnica anterior que involucra uso de compuestos de vitamina D para prevenir hipocalcemia periparturienta, tiempo preciso de administración.

De conformidad con la enseñanza del documento de patente de EE.UU. No. 5,395,622 un bolo compuesto de sales de calcio, que incluyen cloruro de calcio y sulfato de calcio que pueden soportar concentraciones de calcio en sangre mejorados en vacas periparturientas durante 4 a 8 horas después de administración a una vaca. Por lo tanto, como se enseñó por la Patente de EE.UU. No. 5,395,622 la administración de un segundo bolo de sales de calcio se alienta a 12 a 24 horas después de administración del primer bolo para mejorar concentración de calcio en sangre durante un periodo más prolongado. Goff y Horst (1993) demostraron que la duración de las concentraciones de calcio en sangre aumentarán después de una dosis oral de calcio que puede extenderse 1 a 4 horas al aumentar la dosis de calcio administrada. Sin embargo, la dosis debe estar limitada ya que podría desarrollarse hipercalemia. De forma más importante, si grandes dosis de cloruro de calcio que proporcionan más de 3 a 3.5 equivalentes de cloruro se usan, la vaca arriesga el desarrollo de acidosis metabólica no compensada. Como se demostró en Goff y Horst, (1994), propionato de calcio también es una fuente fácilmente soluble de calcio pero no es acidificante. Propionato de calcio también puede extender la duración de dosis que es capaz de elevar concentraciones de calcio en sangre cuando se compara con cloro de calcio (Goff y Horst, 1993).

El acercamiento preventivo de esta descripción tiene varias ventajas sobre los acercamientos de la técnica anterior. El bolo puede darse tan pronto como el ganadero observa que la vaca ha parido un ternero. El ganadero no tiene que intentar predecir el tiempo correcto para administrar la vitamina D 1-alfa hidroxilada endógena a la vaca antes del parto. Además, la forma de bolo preferida de esta descripción se administra como una sola dosis, pasando por alto la necesidad de encontrar y restringir a la vaca para dar múltiples dosis de un suplemento de calcio oral para promover normocalcemia como se recomienda frecuentemente cuando se utilizan bolos de calcio actualmente disponibles. Estas ventajas se logran por provisión de una mezcla de sales de calcio solubles tal como cloruro de calcio y propionato de calcio para promover absorción pasiva de calcio a través del rumen y epitelio intestinal para mantener concentraciones de calcio en sangre durante hasta 12 horas después de administración de la preparación. Esto proporciona el tiempo necesario para que la vitamina D 1-alfa hidroxilada exógena en la preparación estimule el transporte activo de calcio a través de rumen y tejidos intestinales que soportarán concentraciones de calcio en sangre más normales durante las siguientes 60 a 72 horas. La sales de calcio orales incluyen cloruro de calcio y se proporcionan de tal forma para promover un pequeño grado de acidosis metabólica, lo que puede promover liberación de calcio en huesos y síntesis endógena de 1,25-dihidroxitamina D para soportar normocalcemia. También al incluir propionato de calcio u otra fuente de calcio fácilmente absorbible no acidificante en la preparación de una dosis total más grande de calcio se puede administrar de manera segura para que puedan mantenerse más concentraciones de calcio en sangre normocalcémicas durante 2 o más horas después de administración. La administración exógena de vitamina D 1-alfa hidroxilada aumentará concentraciones de 1,25-dihidroxitamina D en sangre rápidamente, en menos de 4 horas, lo que comienza el proceso de activar transporte de calcio transcelular activo de 4 a 12 horas antes de la síntesis endógena de 1,25-dihidroxitamina D

lo que se esperaría normalmente que ocurra en respuesta al inicio de hipocalcemia. La vitamina D 1-alfa hidroxilada exógena permite mayor uso de calcio dietético y cualquier calcio de bolo restante que reside en el lumen del tracto intestinal. Este efecto sinérgico de sales de calcio solubles orales y compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilados exógenos permiten mayor eficiencia contra hipocalcemia periparturienta que ya sea antes del acercamiento de la técnica anterior sólo o con mayor facilidad de uso.

La cantidad de sal de calcio administrada debe ser suficiente para soportar concentraciones de calcio en sangre normales durante hasta 12 horas. Esto protege a la vaca de hipocalcemia hasta que la vitamina D 1-alfa hidroxilada exógena ha tenido suficiente tiempo para estimular el transporte activo más eficiente de calcio del lumen intestinal a la sangre de la vaca. La cantidad de 1,25-dihidroxitamina D debe ser suficiente para estimular absorción de calcio intestinal dentro de 12 a 18 horas de administración. Composiciones de la técnica anterior tienen que administrarse antes del parto para ser efectivas, de manera que dosis típicamente incluidas de compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada en el intervalo de 300 a 600 ug totales para asegurar niveles en sangre adecuados de actividad de 1,25-dihidroxitamina D estarían disponibles a través del periodo de tiempo (24 a 96 horas) que pueden administrarse antes del parto de manera que podría estimular transporte de calcio activo por los primeros días después del parto. Debido a que la composición de esta invención se administra en un punto de tiempo fácilmente identificable, dentro de 6 horas del parto, la cantidad de vitamina D 1-alfa hidroxilada de esta invención que se encuentra que es efectiva es menor a 300 ug de dosis total. Esto reduce el riesgo de inhibición de la enzima 25-hidroxitamina D-1-alfa hidroxilasa renal que puede reducir síntesis endógena de 1,25-dihidroxitamina D, como se ha observado para causar hipocalcemia para desarrollar 4 a 10 días después de administración de dosis más grandes de compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada.

Métodos de producción

Los métodos descritos a continuación utilizan cantidades de calcio y compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada encontrados para ser más efectivos para la vaca lechera que pesa de 500 a 700 kg. Dosis para otras especies se ajustarían para incorporarse a diferente peso corporal

Preparación de una Preparación Oral de Dosis Sólida (es decir, Bolo).

En esta preparación más preferida para administración ha ganado, las sales de calcio (preferiblemente 80 a 150 g de $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (en donde x es igual a o mayor que 0 e igual a o menor que 6) y hasta 250 g de propionato de calcio) y compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada (preferiblemente equivalente de 100 a 280 ug de 1,25-dihidroxitamina D) se mezclan juntos, junto con otros materiales que pueden incluir pero no están limitados a, compuestos que soportan gluconeogénesis (es decir, propilenglicol, glicerina, propionato), balance electrolítico (es decir, cloruro de potasio y sodio, sulfato de magnesio y cloruro), levadura, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, y productos alimenticios fermentables de rumen (es decir, harina de alfalfa, harina de soya). Estos materiales se mezclan junto con agua hasta que se forma una mezcla bombeable. También es posible agregar agua en un recipiente mezclado y agregar los ingredientes anteriores al

agua y mezclar hasta que se forma una mezcla bombeable homogénea. Sin importar el método de preparación utilizado para hacer la mezcla bombeable, la mezcla bombeable entonces puede utilizarse para llenar un molde hecho de papel, polímero, metal u otro material que resultará en la forma de un artículo que es capaz de ser tragado por el animal (es decir, píldora o bolo). Hasta llenar el molde con la mezcla bombeable homogénea, el molde se dejará descansar durante un periodo de 0.5 a 24 horas (preferiblemente bajo enfriamiento) hasta que se ha solidificado la mezcla bombeable homogénea. Después de solidificación, el producto sólido puede o no ser revestido con una mezcla para permitir tragado más fácil del producto. El producto resultante será empacado en una forma para protegerlo de ruptura y exposición a los elementos. Se administrará producto a un animal oralmente. Patente de EE.UU. 5,395,622 y solicitud de patente publicada US20070098810 describen en detalle la manufactura de un bolo y ambos se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Para facilidad de administración a la vaca las dosis efectivas de las sales de calcio y los compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada exógena se distribuirán en un bolo grande o múltiples bolos más pequeños.

Preparación de una Tableta

En esta versión, la sales de calcio (preferiblemente 80 a 150 g de cloruro de calcio y hasta 250 g de propionato de calcio) y compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada (preferiblemente equivalente de 100 a 280 ug de 1,25-dihidroxitamina D) se mezclan juntos, junto con materiales que son comúnmente usados en la fabricación de tabletas de compresión o bolos de compresión. Estos materiales son denominados excipientes y pueden incluir artículos tal como aglutinantes (es decir, dextrosa, celulosa microcristalina), lubricantes (es decir, estearato de magnesio), agentes de flujo (es decir, fosfato dicálcico, dióxido de silicona), desintegrantes (es decir, almidón), y otros excipientes. Esta mezcla entonces se somete a fuerza suficiente para causar que se comprima el material de flujo libre en una masa sólida. Una vez que se ha creado una masa sólida cualquier número de estas unidades puede suministrarse a un animal que utiliza un aplicador y técnica que se conoce por técnico en la materia individual de medicina veterinaria o ganadería. Para facilidad de administración a la vaca las dosis efectivas de las sales de calcio y los compuestos de vitamina D 11-alfa hidroxilada pueden distribuirse en una tableta grande o múltiples tabletas más pequeñas.

Preparación de un Producto de Remojo

En esta versión las sales de calcio (preferiblemente 80 a 150 g de cloruro de calcio y hasta 250 g de propionato de calcio) y compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada (preferiblemente equivalente a 100 a 280 ug de 1,25-dihidroxitamina D) se mezclan juntos, junto con otros materiales que pueden incluir pero no están limitados a, compuestos que soportan glucogénesis (es decir, propilenglicol, glicerina, propionato), balance electrolítico (es decir, cloruro de potasio y sodio, sulfato de magnesio y cloruro), levadura, fármaco antiinflamatorio no esteroideo, y productos alimenticios fermentables de rumen (es decir, harina de alfalfa, harina de soya). Estos materiales se mezclan juntos y se empacan como material seco con aproximadamente 85 a 90% de materia seca. Cuando se usa 11,25-dihidroxitamina D o compuestos de vitamina D solubles en lípidos similares como la

forma de vitamina D 1-alfa hidroxilada, será necesario incorporar un agente para mantener la 1,25-dihidroxitamina D insoluble en agua en solución. Muchos de tales materiales son conocidos en la técnica e incluyen agentes tal como triglicéridos de cadena media para formar una emulsión con la vitamina D de 1,25-dihidroxitamina que la mantiene suspendida en el agua del remojo. Si la fuente de vitamina D 1-alfa hidroxilada es un glucósido o glucuronido, como puede estar contenido en material derivado de plantas calcinogénicas tal como *Solanum glaucophyllum*, un agente emulsionante no es necesario ya que estos compuestos de vitamina D ya son solubles en agua. En la granja, la mezcla de remojo se agrega a una cantidad adecuada de agua (típicamente 0.5 a 20 litros) en una cubeta u otro recipiente adecuado y se administra oralmente a la vaca justo después del parto a través de una pistola de remojo, tubo esofágico, o tubo que se extiende al rumen como se practica comúnmente en medicina veterinaria de animales grandes.

Preparación de Geles o Pastas

En este caso las sales de calcio (preferiblemente 80 a 120 gramos de cloruro de calcio y 100 a 250 g de propionato de calcio) y compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada (preferiblemente equivalente a 100 a 280 ug de 1,25-dihidroxitamina D) se mezclan con portadores (es decir, propilenglicol, glicerol, agua, o aceites vegetales) y espesantes (es decir, goma xantana, dióxido de silicio) para formar una emulsión o suspensión que se coloca en un tubo, típicamente en un volumen entre 250 y 400 mL. Otros compuestos también pueden incluirse como se describió anteriormente. El tubo que transporta la mezcla típicamente se diseña para ajustarse en una pistola de calafateado para administración oral en la parte posterior de la boca de la vaca al usar técnicas familiares a aquellas practicadas en la técnica de ganadería de animales y medicina veterinaria. Para facilidad de administración a la vaca las dosis efectivas de las sales de calcio y los compuestos de vitamina D 1-alfa hidroxilada exógenos pueden distribuirse en un tubo de pasta grande o múltiples tubos más pequeños.

Los siguientes ejemplos se pretende como ilustraciones ya que numerosas modificaciones y variaciones dentro del alcance de esta descripción se harán evidentes para aquellos técnicos en la materia.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Bolos de sal de calcio se prepararon e incorporan ya sea a 150 ug de 1,25-dihidroxitamina D o 5, 7.5 o 10 g de hoja de *solanum glaucophyllum*, una planta que contiene una forma de glucósido de 1,25-dihidroxitamina D3 en sus hojas. Dentro del rumen de la vaca el cocido de 1,25-dihidroxitamina D3, que es biológicamente inerte, se escinde por rumen por enzimas bacterianas de rumen a 1,25-dihidroxitamina D3 bioactivo. El lote de material de hoja usado para este experimento, y todos los siguientes experimentos descritos en este documento, se determinó para contener el equivalente de 14 ug de hoja de 1,25-dihidroxitamina D3/g que usa la modificación del método de Gil y otros, (2007). Las vacas Holstein usadas para este estudio estuvieron preñadas y

cerca del final de su lactancia y se secaron dentro de 2 semanas del estudio. Estas vacas se utilizaron ya que debieron estar en balance de calcio positivo y por lo tanto se esperaba que tengan concentraciones relativamente bajas de 1,25-dihidroxitamina D endógena en su sangre permitiendo mejor resolución de aumentos en 1,25-dihidroxitamina D en plasma que podría atribuirse a la administración de los bolos. Aunque nuestro animal objetivo es la vaca inmediatamente después del parto, estudios previos han determinado que concentraciones de 1,25-dihidroxitamina D en plasma puede ser muy variable (bajo y muy alto) dependiendo de la extensión de hipocalcemia que la vaca ha experimentado antes del parto y el tiempo de muestra de la sangre. Las vacas pesaron de 600 a 720 kg y produjeron de 16 a 28 kg de leche/día. El tratamiento consistió de administrar dos de los polos de un solo tipo a una vaca de manera que una vaca recibió bolos comprendidos ya sea de 300 ug de 1,25-dihidroxitamina D, o vuelos comprendidos de 10, 15, 20 g de hoja de *S. glaucophyllum* en total, suministrando el equivalente de 140, 210, y 280 auge de actividad de 1,25-dihidroxitamina D. Se recolectaron muestras de sangre en tubos vacutainer con heparina de litio de la vena yugular de cada vaca justo antes que se administraron los vuelos (tiempo 0) y 1, 4, 24, 48, 72 y 96 horas después que se administraron los bolos. Se analizó plasma para concentración de 1,25-dihidroxitamina D por espectrometría de masa de cromatografía líquida.

Como se muestra en la Figura 1, todas las vacas tuvieron un aumento significativo en 1,25-dihidroxitamina D en plasma por 4 horas después de recibir el bolo. Concentraciones de 1,25-dihidroxitamina D en plasma permanecieron significativamente elevadas antes de concentración de 1,25-dihidroxitamina D de pretratamiento a 48 horas después de administración pero no a 72 ó 96 horas después de administración. 1,25-dihidroxitamina D en plasma se elevó más rápidamente en vacas que recibieron 1,25-dihidroxitamina D3 sintética que en vacas que reciben el glucósido de 1,25-dihidroxitamina D3 de la hoja de *solanum glaucophyllum*. Esto puede reflejar el tiempo que toma que las bacterias de rumen conviertan en glucósido a la 1,25-dihidroxitamina D activa de manera que pueda absorberse en la sangre.

Para ejemplos 2 a 5, análisis estadístico consistió de análisis de medidas repetidas de variación con vaca anidada dentro de tratamiento y tiempo después de administración de bolo como la media repetida. Se compararon medios de calcio en plasma de tratamiento en cada punto de tiempo al usar prueba de Tukey de comparación de medios y diferencias que se declaran como significativas cuando la probabilidad de la hipótesis nula que es correcta es $P < 0.075$.

EJEMPLO 2

El Ejemplo 2 se realizó en un lácteo comercial tanto con Jersey como Holstein alimentadas con una dieta pre-parto con una tasa de inclusión de anión alta diseñada para ayudar a controlar hipocalcemia. Se usaron únicamente vacas multíparas y vacas asignadas a un tratamiento se bloquearon por número de lactancia. Los efectos de tratamiento en cada raza se presentaron de forma separada y entonces se combinaron. El protocolo de tratamiento fue idéntico para vacas Jersey y Holstein y las vacas se alojaron juntas para los 21 días finales antes del parto.

Holstein

El pH de orina promedio de Holstein durante las 2 semanas antes del parto fue 5.68. El consumo de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de las vacas se estimó a 10.5 kilogramos (23 libras)/día en estas vacas antes del parto. Siete Holstein no fueron administradas con bolos en el parto. Nueve vaca recibieron un bolo de calcio oral comercial, que suministra aproximadamente 50 g de calcio, principalmente cloruro de calcio. Estas Holstein recibieron el tratamiento en el parto y de nuevo a la mañana siguiente (12 a 24 horas después del primer bolo). 10 vacas Holstein fueron tratadas con dos polos de sal de calcio que también contuvieron hoja de *Solanum glaucophyllum* una sola vez dentro de 2 horas del parto. Estos dos polos suministraron 78 g de calcio total, la mayoría de cloruro de calcio con algo de propionato de calcio y 15 g de hoja de *Solanum glaucophyllum*, que suministra vitamina D 1-alfa hidroxilada en la forma de glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D determinado para ser equivalente a 196 ug de 1,25-dihidroxitamina D3. Se obtuvieron muestras de plasma de cada vaca antes de tratamiento, y 3, 12, 24, 36, 48 y 72 horas después de tratamiento. Se determinó concentración de calcio en plasma al usar el método de reactivo Arsenazio III.

La Figura 2 presenta $\text{Ca} \pm$ en sangre promedio de vaca Holstein, el error estándar de ese promedio. En Holstein que reciben el bolo de Ca + SG, el calcio de plasma fue significativamente mayor en 36 horas y 48 horas después del parto que en vacas que no reciben ningún bolo o el bolo de Ca. Ambos polos que contienen Ca aumentaron significativamente concentraciones de calcio en plasma 3 horas después del parto en comparación con vacas Holstein que reciben tratamiento sin bolo. Únicamente vacas Holstein de bolo de Ca + SG experimentaron Ca en plasma promedio por encima de 8.25 mg/dl (2.06 mM) durante el estudio. Grupos de tratamiento sin bolo y de bolo de Ca promediaron concentración de calcio en plasma y fallaron al alcanzar incluso 8.0 mg/dl (2 mM) durante los primeros 3 días después del parto.

Jersey

El pH de orina promedio de las vacas Jersey antes del parto fue 5.85 y 25% de las Jersey y tuvieron pH de orina por debajo de 5.5. Consumo de alimento de materia seca antes del parto se estimó 8.2 kilogramos (18 libras) DM/día. Diez vacas Jersey recibieron un bolo de Ca oral comercial en el parto y un segundo bolo de Ca 12 a 24 horas después. Catorce vacas Jersey recibieron los 2 bolos de Ca + SG con calcio y hoja de *Solanum glaucophyllum* en el parto únicamente. Tres vacas Jersey no recibieron ningún tratamiento (Sin Bolo) después del parto. Composición de bolo y tiempo de muestras de sangre fueron como se describió anteriormente para Holstein en este ejemplo.

Como se ilustró en la Figura 3, en el punto de tiempo de 3 horas ambos bolos, vacas tratadas con bolo de Ca + SG y bolo de Ca exhibieron calcio en plasma significativamente aumentada en comparación con vacas que no reciben Ningún Bolo. Desde ese punto en las vacas con Bolo de Ca y Ningún Bolo tuvieron concentración de calcio en plasma similar. Las vacas que obtienen el Bolo de Ca + SG tuvieron calcio en plasma significativamente superior a vacas que obtienen Ningún Bolo en 3, 12, 24 y 36 horas después del parto. Calcio en plasma de vacas que reciben el bolo de Ca + SG fue estadísticamente mejor en vacas de bolo de Ca a 24 y 36 horas después del parto. Únicamente las vacas de bolo de Ca + SG tuvieron calcio en plasma promedio por encima de 8.5

mg/dl entre 2 y 72 horas del estudio.

Datos combinados de Jersey y Holstein

Ya que todas las vacas se alojaron similarmente y se alimentaron antes y después del parto, los resultados de todas las vacas del Ejemplo 2 se combinaron en la Figura 4. Con números aumentados de vacas en cada punto de tiempo el poder estadístico del estudio aumentó. El grupo de tratamiento de bolo de Ca + SG tuvo mayor calcio en plasma que el grupo de tratamiento SIN Bolo de 3 a 48 horas después del parto y tiene mayor concentración de calcio en plasma que el grupo de tratamiento de Bolo de Ca a 24, 36 y 48 horas después del parto. Únicamente las vacas de Bolo de Ca + SG lograron concentración de calcio en plasma promedio por encima de 8.5 mg/dl entre 12 y 72 horas.

EJEMPLO 3

En el Ejemplo 3, vacas de un rebaño localizado en una granja se alimentaron con aniones en su dieta para lograr pH de orina entre 6 y 6.8. Esto se consideró generalmente un medio efectivo para prevenir hipocalcemia clínica en la vaca lechera. La producción de leche en este rebaño fue 46.8 kg (103 libras)/día con 3.9% de grasa. El pH de orina promedio de estas vacas las semanas antes del parto fue 6.6. En este estudio nueve de las vacas multíparas obtuvieron un solo bolo de calcio comercial (Bolo de Ca) en el parto (43 g Ca/bolo) y de nuevo 12 a 24 horas después del parto, proporcionando un total de 86 g de Ca principalmente a partir de cloruro de calcio. Seis vacas recibieron bolos de 2 Ca + 10 g SG en el parto únicamente. Estos 2 polos estuvieron comprendidos de 78 g de calcio principalmente de cloruro de calcio y propionato de calcio y 10 g de hoja de *Solanum glaucophyllum* de suministro total de equivalente de 140 ug de 1,25-dihidroxitamina D como un glucocido de 1,25-dihidroxitamina D3. Siete vacas recibieron bolos 2 Ca + 15 g SG en parto únicamente. Estos dos bolos estuvieron compuestos de 78 g de calcio principalmente de cloruro de calcio y propionato de calcio y contuvieron 15 g de hoja de *Solanum glaucophyllum* que suministra el equivalente de 210 ug de 1,25-dihidroxitamina D como un cocido de 1,25-dihidroxitamina D3. Se obtuvieron muestras de plasma de la vena yugular antes de administración de bolo (Tiempo=0) y 4, 12, 24, 48 y 72 horas después del parto.

Como se ilustra en la Figura 5, las vacas con bolo de Ca tuvieron concentración de calcio en plasma ligeramente superior antes de cualquier tratamiento que las vacas de cualquiera de los tratamientos con bolo Ca + SG. En vacas con bolo Ca + 15 g SG la concentración de calcio en plasma estuvo por encima de 9 mg/dl al día 2. Las vacas con bolo de Ca tuvieron concentración de calcio en plasma por debajo de 8.5 mg/dl los primeros 3 días después del parto. Vacas en el grupo de Ca + 10 g SG tuvieron calcio en plasma que excede 8.5 mg/dl al día 2. Estos datos sugieren una dosis de 15 g de hoja de *Solanum glaucophyllum* que fue más efectivo que una dosis de 10 g de hoja de *Solanum glaucophyllum* para incorporación en el bolo para prevenir hipocalcemia.

EJEMPLO 4

Este ejemplo utilizó vacas cruzadas Holstein y Holstein X Jersey en una granja lechera comercial grande que alimenta aniones para prevenir fiebre de la leche e hipocalcemia. pH de orina

promedio 5.7 en las semanas antes del parto.

Sesenta vacas fueron asignadas a uno de tres tratamientos con base en fecha de parto esperada y se bloquearon por número de lactancia y raza (de manera que hubo números casi iguales de vacas Holstein o vacas Holstein X Jersey y vacas que entran a su segunda (N=10) o tercera y mayor lactancia (N=10) en cada grupo de tratamiento. Los tratamientos fueron: A. Dos bolos de calcio con hoja de solanum glaucophyllum en el parto únicamente (suministrando 78 g de calcio y glucósido de 1,25-dihidroxitamina D3 equivalente a 196 ug de 1,25-dihidroxitamina D). B. Bolos de cápsula de gelatina que contienen calcio, compuestos de cloruro de calcio que suministra 40 g de calcio/dosis. Se administraron en el parto y de nuevo 12 a 24 horas después del parto, para un total de 80 g de calcio/vaca. C. Vacas que no reciben Ningún Bolo después del parto. Se obtuvieron muestras de plasma justo después del parto y antes del tratamiento (Tiempo=0) y a 24, 48, 72, 96 y 120 horas después del parto.

Los datos se presentaron con base en el número de lactancia en el que ingresó la vaca. Cada grupo de tratamiento tuvo 10 vacas en este. En vacas de 2^{da} lactancia (Figura 6, vacas en el grupo de tratamiento de bolo Ca + SG tuvieron mayor concentración de Ca en sangre que cualquiera de los otros tratamientos de 24 a 96 horas después de tratamiento. La Figura 7 presenta concentración de calcio en plasma en vacas que ingresan a su tercera y última lactancia. Concentraciones de calcio en plasma medio por encima de 8 mg/dl se lograron dentro de 24 horas en el grupo de tratamiento de bolo Ca + SG. Las vacas de tercera a mayor lactancia en el grupo Sin Bolo tuvieron concentración de calcio en plasma por encima de 8 mg/dl a 48 horas después de tratamiento. Las vacas de tercera o mayor lactancia que recibieron el Bolo de Ca lograr una concentración de calcio en plasma por 72 horas después de tratamiento.

EJEMPLO 5

En el Ejemplo 5, se utilizaron vacas multíparas de varias granjas pequeñas que no están utilizando una dieta aniónica para reducir la incidencia de hipocalcemia en las vacas. Dentro de algunas horas del parto, las vacas se administraron con uno de cuatro tratamientos. Seis vacas no fueron tratadas con ningún bolo después del parto (Sin Bolo). Cuatro vacas fueron tratadas con calcio intravenoso (10.5 g de calcio en la forma de gluconato de calcio) después del parto (IV Ca). Veintidós vacas recibieron dos bolos después del parto que contuvieron sales de calcio y hoja de Solanum glaucophyllum, suministrando 78 g de calcio y un glucósido de 1,25-dihidroxitamina D3 equivalente a 196 ug de 1,25-dihidroxitamina D3 (Bolo de Ca + SG). Veinticuatro vacas fueron tratadas en el parto y de nuevo 12 a 24 horas después con bolos de sal de calcio oral comerciales que suministraron 40 a 44 g de calcio cada uno para una dosis de calcio total de 80 a 88 g, principalmente a partir de cloruro de calcio (bolo de Ca).

Todas las vacas tuvieron concentración de calcio en plasma determinada antes de tratamientos que se aplican y se considerarían como hipocalcémicas (calcio en plasma por debajo de 8.0 mg/dl). Las vacas que recibieron un tratamiento Sin Bolo después del parto exhibieron una disminución adicional en calcio en sangre durante las primeras 4 horas después del parto. Como se

ilustró en la Figura 8, en las vacas que recibieron concentración de calcio en plasma Sin Bolo permanecieron por debajo de 8.0 mg/dl (comúnmente considerado como indicativo de una vaca con hipocalcemia subclínica) hasta casi 96 horas después del parto. Las vacas en el grupo de tratamiento de bolo Ca exhibieron una disminución pequeña en calcio en el punto de tiempo de 4 horas y su concentración de calcio en sangre en el punto de tiempo 4 horas que fue significativamente mejor que en vacas que no reciben Ningún Bolo. Sin embargo, de 12 a 120 horas después del parto sus concentraciones de calcio en plasma fueron similares a aquellas de vacas que no reciben Ningún Bolo después del parto. Administración de solución de calcio intravenosamente (Ca IV) resultó en concentración de calcio en plasma más alta observada a 4 horas después del parto. Sin embargo, de 24 a 84 horas después del parto estas vacas tuvieron la concentración de calcio en plasma más baja. La administración de calcio intravenosa inhibió los mecanismos de homeostasis de calcio de la vaca, causando más hipocalcemia que lo observado en los días 2 y 3 después de la lactancia que si no se hubiera dado ningún tratamiento. Vacas en el tratamiento de bolo de Ca + SG exhibieron un aumento en la concentración de calcio en plasma en cada punto de tiempo después del parto y su concentración de calcio en sangre se fue por arriba del umbral para hipocalcemia subclínica de 0.8 mg/dl por 24 horas después del parto. De 4 horas después de tratamiento a 84 horas después de tratamiento, vacas que reciben el bolo de Ca + SG en el parto únicamente tuvieron concentración de Ca en plasma significativamente superior que vacas que reciben los bolos de calcio orales comerciales dados dos veces después del parto.