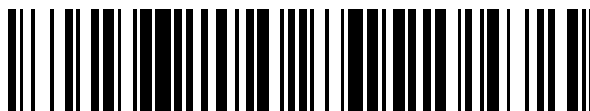


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 390**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47	(2006.01) A61K 33/06	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01) A61K 35/00	(2006.01)
A61K 31/716	(2006.01) A23K 50/20	(2006.01)
A61K 31/736	(2006.01) A23K 50/10	(2006.01)
A61K 35/02	(2015.01) A23K 50/70	(2006.01)
A23K 20/163	(2006.01) A23K 50/30	(2006.01)
A23K 20/20	(2006.01) A23K 50/40	(2006.01)
A23K 20/28	(2006.01)	
A61K 31/715	(2006.01)	
A61K 33/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2015** **PCT/US2015/015692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015** **WO15123456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2015** **E 15707833 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 3110437**

54 Título: **Composición y método para promover la reducción de estrés por calor en animales**

30 Prioridad:

12.02.2014 US 201461939206 P
20.05.2014 US 201462000986 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

OMNIGEN RESEARCH, LLC (50.0%)
1767 NW Kings Blvd
Corvallis OR 97330, US y
THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF
OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA (50.0%)

72 Inventor/es:

CHAPMAN, JAMES, D.;
CALABOTTA, DAVID;
FORSBERG, NEIL E.;
COLLIER, ROBERT;
PUNTENNEY, STEVEN B. y
HALL, LAUN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 656 390 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y método para promover la reducción de estrés por calor en animales

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a composiciones para su uso en un método para promover la reducción de estrés por calor en animales.

10 **Antecedentes**

El estrés por calor produce pérdidas económicas significativas en las industrias de los animales, tales como las industrias lácteas. La producción, reproducción y salud animal son alteradas por la hipertermia. Las respuestas fisiológicas y de producción están bien documentadas, pero no son completamente entendidas. Durante el estrés por calor, aumentan las frecuencias respiratorias y las temperaturas corporales, y disminuyen el consumo de alimentos, rendimiento de la leche y la reproducción.

La síntesis de leche disminuye del consumo de alimentos reducido. Hay pérdidas adicionales en el rendimiento de la leche que están asociados a los cambios metabólicos (Rhoads et al., 2009). El contrarrestar los efectos de producción del estrés por calor en vacas lecheras lactantes implica mantenimiento reducido del consumo de alimentos y control del flujo metabólico.

La función inmunitaria y la salud también se reducen con el estrés por calor. La gravedad y ocasión de enfermedad son elevadas cuando se alteran las respuestas inmunitarias e inflamatorias. El entorno del rumen puede alterarse durante el estrés térmico. Las elevadas frecuencias respiratorias pueden producir alcalosis respiratoria, acidosis del rumen y con el tiempo acidosis metabólica. El estrés oxidativo puede aumentar con el estrés por calor y puede alterar la respuesta al choque térmico y aumentar el daño celular y muerte.

El documento US-A-4759932 se refiere a un método de reducción del estrés por calor en animales en el que se añade una pequeña cantidad de zeolita al pienso para animales.

El documento WO 2007/021262 se refiere a un método para el aumento de la función inmunitaria en el que se mezcla un glucano, tierra de diatomeas, arcilla mineral y glucomanano con el pienso de un mamífero o aviar.

El documento US 2007/253983 se refiere a un método de potenciamiento de la eficacia de una vacuna en el que se mezcla un glucano, tierra de diatomeas, arcilla mineral y glucomanano con el pienso de un mamífero o aviar.

Sumario

El objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición novedosa y previamente desconocida para su uso en un método de promoción de la reducción del estrés por calor en animales. También en el presente documento se desvela una composición adecuada para administración a animales con el fin de prevenir y/o promover sustancialmente la reducción del estrés por calor en animales. La composición desvelada para su uso en el método de prevención y/o promoción de la reducción del estrés por calor puede aplicarse a cualquier especie de animal susceptible al estrés por calor, tales como mamíferos, aviares, o especies de animales acuáticos. En algunas realizaciones, los animales tratados en el presente documento pueden ser un animal criado para consumo humano, tal como ganado (por ejemplo, ganado vacuno para alimento o lechero) o cerdos, o aviares, tales como aves de corral domésticas (por ejemplo, pollo, pavo, ganso, pato, gallina de Cornualles, perdiz, faisán, gallina de Guinea, avestruz, emú, cisne o paloma), o peces (por ejemplo, salmón, trucha y similares). En otras realizaciones, el animal puede ser un animal doméstico, tal como un perro, gato, pez o conejo. En algunas otras realizaciones, el animal puede ser una especie de rumiante, tal como una oveja, cabra, vaca, reno, bisonte, búfalo o llama. En todavía otras realizaciones, el animal puede ser un ungulado tal como un caballo, burro o cerdo.

En el presente documento se desvelan realizaciones de composiciones para su uso en un método de promoción de la reducción del estrés por calor en un animal, tal como un mamífero o especie aviar administrando al mamífero o especie aviar una composición que comprende glucano, sílice, arcilla mineral y manano. En algunas realizaciones la composición comprende entre el 15 % y el 40 % de sílice, entre el 50 % y el 81 % de arcilla mineral, entre el 1,0 % y el 5,0 % de β -glucanos y entre el 1 % y el 8,0 % de manano. En una realización particular la composición consiste esencialmente en β -glucanos, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, tierra de diatomeas, una arcilla mineral y glucomanano.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, la composición puede administrarse profilácticamente, o cuando el animal tiene o está en riesgo de desarrollar estrés por calor. El estrés por calor puede producirse cuando el animal se expone a un índice de temperatura-humedad de 68 o mayor, 75 o mayor, o ≥ 79 .

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, el estrés por calor puede ser evidenciado por un indicador de estrés por calor. Los indicadores de estrés por calor incluyen, pero no se limitan a, el consumo de alimentos, consumo de agua, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, rendimiento de la leche, grasa de la leche, proteína de la leche, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición se administra antes de que el animal sufra el estrés por calor mientras que el animal está sufriendo el estrés por calor, y/o después de que el animal sufra el estrés por calor. En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, el animal puede estar inmunodeprimido antes de la administración de la composición, por ejemplo como resultado de estrés por calor.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, la composición puede administrarse a intervalos fijos al animal durante un periodo de tiempo eficaz para promover la reducción del estrés por calor. El intervalo fijo puede ser diariamente, o puede ser más o menos frecuentemente que ese. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo eficaz es de 0 días a 200 días, de 1 día a 200 días, de 1 día a 90 días, de 1 día a 60 días, de 1 día a 45 días, de 1 día a 30 días, de 3 días a 21 días, al menos 1 día, al menos 3 días, al menos 7 días, al menos 30 días, al menos 60 días, o al menos 90 días.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, la cantidad administrada al animal puede oscilar de 1 mg/kg de peso corporal por día a 20 g/kg de peso corporal por día. En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, la composición puede administrarse mezclando la composición con el pienso del animal en una cantidad que oscila de 0,1 a 20 kg por tonelada de pienso y proporcionar la composición mezclada con el pienso al animal. En algunas realizaciones, el animal es un bovino y la cantidad administrada a ese animal puede oscilar de 0,5 gramos a 100 gramos diariamente.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, una cantidad de la composición administrada al animal puede aumentarse si se espera que el índice de temperatura-humedad aumente o disminuya si se espera que el índice de temperatura-humedad disminuya.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, el animal puede administrarse con una cantidad de la composición eficaz para alterar un indicador de estrés por calor en comparación con un animal que no ha sido administrado con la composición. En algunas realizaciones, el método incluye además medir el indicador de estrés por calor, y seleccionar una cantidad de la composición administrada al animal basándose en al menos en parte en la medición del indicador de estrés por calor.

En realizaciones particulares el animal es una vaca, tal como, por ejemplo, una vaca lechera. Las vacas lecheras pueden administrarse con la composición antes de la lactancia. Esto puede ser de 90 días antes de la aparición de la lactancia a 1 día antes de la aparición de la lactancia, preferentemente de 45 días antes de la aparición de la lactancia a 10 días antes de la aparición de la lactancia. La composición puede administrarse diariamente antes de la aparición de la lactancia. En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, la vaca lechera puede ser alimentada con la composición durante un periodo de tiempo para aumentar la producción de leche y/o reducir la grasa de la leche con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición.

El animal que se administra con la composición puede tener consumo de agua reducido con respecto a animales no alimentados con la composición. El animal también puede tener una frecuencia respiratoria reducida con respecto a animales no alimentados con la composición. En otras realizaciones, el animal puede tener una temperatura rectal reducida con respecto al animal no alimentado con la composición. En realizaciones desveladas particulares, el animal puede presentar consumo de alimentos elevado con respecto al animal no alimentado con la composición. Por tanto, el animal puede presentar alcalosis respiratoria reducida, acidosis del rumen, acidosis metabólica, y todas y cada una de las combinaciones de los mismos, con respecto a animales no alimentados con la composición. En otras realizaciones, el animal puede tener niveles de cortisol en suero reducidos con respecto a animales no alimentados con la composición.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, el método puede comprender además administrar al mamífero o especie aviar un proceso terapéutico y/o un agente terapéutico adecuado para tratar el estrés por calor. Procesos y agentes terapéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, provisión de sombra al animal, uso de un rociador de agua para administrar externamente agua al animal, uso de un ventilador para proporcionar movimiento del aire, adición de grasas de derivación al pienso para el animal, meloxicam, un corticosteroide, una composición que comprende uno o más electrolitos, un agente alcalinizante, un microbiano de alimentación directa, o una combinación de los mismos.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, el método puede incluir administrar una primera cantidad de la composición a un grupo de animales que tienen o están en riesgo de desarrollar estrés inducido por el calor durante un primer periodo de tiempo, medir un indicador de estrés por calor de al menos un animal del grupo de animales, y administrar una cantidad ajustada de la composición al grupo de animales durante un periodo de tiempo posterior, en el que la cantidad ajustada se basa al menos en parte en la medición del indicador de estrés por calor.

En cualquiera o todas de las realizaciones anteriores, el método puede incluir evaluar al menos un indicador de estrés por calor de animales individuales en un grupo de animales, determinar si uno o más de los animales

individuales está sufriendo estrés por calor, y administrar la composición al uno o más animales individuales que están sufriendo estrés por calor.

Una realización a modo de ejemplo comprende seleccionar una vaca lechera que tiene o está en riesgo de desarrollar estrés inducido por calor y administrar a la vaca lechera antes, durante, y/o después de la lactancia una composición que comprende glucano, sílice, arcilla mineral, manano, y opcionalmente una endoglucanohidrolasa, en la que la composición se administra a intervalos fijos durante un periodo de tiempo eficaz suficiente para (1) aumentar la producción de leche con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (2) rebajar grasa de la leche con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (3) reducir el consumo de agua con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (4) reducir la frecuencia respiratoria con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (5) reducir la temperatura rectal con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (6) aumentar el consumo de alimentos con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (7) disminuir la alcalosis respiratoria, acidosis del rumen y/o acidosis metabólica con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, (8) disminuir los niveles de cortisol en suero con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición, o (9) todas y cada una de las composiciones de los mismos. El método puede comprender además administrar a la vaca lechera un agente terapéutico adecuado para tratar estrés por calor.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico de barras que ilustra el rendimiento de la leche en la vaquería (kg) por vacas que se administran con la composición desvelada y aquellas que no, que incluye tanto condiciones iniciales como condiciones en la vaquería.

La FIG. 2 es un gráfico de barras que ilustra rendimiento de la leche para vacas de control y vacas que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras (TN), condiciones de estrés por calor (HS) y condiciones de recuperación (Recuperación).

La FIG. 3 es un gráfico que ilustra la producción de leche media por día para vacas de control y aquellas que han sido administradas con la composición desvelada.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra el consumo de alimentos por día para vacas de control y aquellas que han sido administradas con la composición desvelada.

La FIG. 5 es un gráfico de barras que ilustra el consumo de alimentos para vacas de control y vacas que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras, condiciones de estrés por calor y condiciones de recuperación.

La FIG. 6 es un gráfico que ilustra la cifra somática de células por día para vacas de control y aquellas que han sido administradas con la composición desvelada.

La FIG. 7 es un gráfico de barras que ilustra el cortisol en suero medio para vacas de control y vacas que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras (TN) y condiciones de estrés por calor (HS), medido después de un cierto número de días.

La FIG. 8 es un gráfico de barras que ilustra los niveles de insulina en suero medios para vacas de control y vacas que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras (TN) y condiciones de estrés por calor (HS), medidos después de un cierto número de días.

La FIG. 9 es un gráfico de barras que ilustra los niveles de glucosa en suero medios para vacas de control y vacas que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras (TN) y condiciones de estrés por calor (HS), medidos después de un cierto número de días.

La FIG. 10 es un gráfico de barras que ilustra la expresión génica del receptor IL8R en leucocitos en vacas de control lactantes y vacas que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras y condiciones de estrés por calor, medida después de un cierto número de días.

La FIG. 11 es un gráfico de barras que ilustra niveles de proteína RANTES en vacas de control y vacas que han sido administradas con la composición desvelada antes de estrés por calor, durante estrés agudo por calor, estrés crónico por calor, recuperación del estrés por calor y recuperación a largo plazo.

La FIG. 12 es un gráfico de barras que ilustra los niveles de ACTH en suero en vacas de control y vacas lecheras lactantes que han sido administradas con la composición desvelada durante condiciones termoneutras (TN) y condiciones de estrés por calor (HS), medidos después de un cierto número de días.

La FIG. 13 es un gráfico que muestra la temperatura rectal de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición subcutánea a lipopolisacáridos.

La FIG. 14 es un gráfico que muestra el cambio en la temperatura rectal de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición subcutánea a lipopolisacáridos.

La FIG. 15 es un gráfico que muestra la temperatura rectal de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 16 es un gráfico que muestra el cambio en la temperatura rectal de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 17 es un gráfico de barras que muestran las concentraciones globales de cortisol de novillos castrados

recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt durante el periodo de recepción (OMN-28) o sin OmniGen (CON) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 18 es un gráfico que muestran las concentraciones de cortisol de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 19 es una serie de gráficos de barras que muestran el tratamiento, antes y después de las concentraciones de exposición a lipopolisacáridos de nitrógeno ureico en la sangre (BUN) para novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control).

La FIG. 20 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de tratamiento de concentraciones de glucosa para novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 21 es un gráfico que muestra las concentraciones de glucosa de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 22 es una serie de gráficos de barras que muestran el tratamiento, antes y después de las concentraciones de exposición a lipopolisacáridos de ácidos grasos no esterificados de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control).

La FIG. 23 es una serie de gráficos de barras que muestra el tratamiento, antes y después de las concentraciones de exposición a lipopolisacáridos de concentraciones de interferón- γ de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control).

La FIG. 24 es dos gráficos de barras que muestran el tratamiento y después de las concentraciones de exposición a lipopolisacáridos de necrosis tumoral- α (TNF- α) global y después de las concentraciones de exposición a LPS de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control).

La FIG. 25 es un gráfico que muestra las concentraciones de necrosis tumoral- α (TNF- α) de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 26 es un gráfico que muestra las de interleucina-6 (IL-6) de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición concentraciones desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 27 es un gráfico que muestra las concentraciones de linfocitos de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

La FIG. 28 es un gráfico que muestra la relación de neutrófilo a linfocito de novillos castrados recién recibidos complementados con la composición desvelada a una tasa de 4 g/cwt (OmniGen) durante el periodo de recepción (28 d) o sin OmniGen (Control) durante una exposición a lipopolisacáridos.

Descripción detallada

I. Definiciones

Las siguientes explicaciones de términos y abreviaturas se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a aquellos expertos habituales en la materia en la práctica de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, "que comprende" significa "que incluye" y las formas en singular "un" o "una" o "el" y "la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. El término "o" se refiere a un único elemento de elementos alternativos establecidos o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente divulgación, métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes. Otras características de la divulgación son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, porcentajes, temperaturas, tiempos, etc., como se usa en la memoria descriptiva o reivindicaciones, deben entenderse como que están modificados por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, implícitamente o explícitamente, los parámetros numéricos expuestos son aproximaciones que pueden depender de las propiedades deseadas buscadas y/o límites de detección en condiciones/métodos de prueba estándar. Cuando se distinguen directamente y explícitamente realizaciones del estado de la técnica tratado,

los números de realización no son aproximaciones, a menos que se cite la palabra "aproximadamente".

Animal: Este término incluye especies que se producen para consumo humano o que son animales domesticados. Especies a modo de ejemplo de tales animales se proporcionan en el presente documento.

Administrar: Administración por cualquier vía al sujeto. Como se usa en el presente documento, la administración normalmente se refiere a administración por vía oral.

Mananos: Una clase de polisacáridos que incluyen el azúcar manosa. La familia de los mananos incluye mananos puros (es decir, el esqueleto de polímero consiste en monómeros de manosa), glucomananos (el esqueleto de polímero comprende manosa y glucosa) y galactomananos (mananos o glucomananos en los que residuos de galactosa individuales están unidos al esqueleto de polímero). Los mananos se encuentran en paredes celulares de algunas especies de planta y levaduras.

Arcilla mineral: El término "arcilla mineral" se refiere a silicatos de aluminio hidratados. Las arcillas minerales normalmente incluyen cantidades menores de impurezas, tales como potasio, sodio, calcio, magnesio y/o hierro. Las arcillas minerales normalmente tienen una estructura en hoja de dos capas que incluye hojas de silicato tetraédricas y hojas de hidróxido octaédricas o una estructura de tres capas que incluye una hoja de hidróxido entre dos hojas de silicato.

Agente terapéutico: Un agente que es capaz de proporcionar un efecto terapéutico, por ejemplo, prevenir un trastorno, inhibir un trastorno, tal como por detener el desarrollo del trastorno o sus síntomas clínicos, o aliviar un trastorno produciendo la regresión del trastorno o sus síntomas clínicos.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad o concentración de un compuesto o composición especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que está tratándose para un trastorno. La cantidad terapéuticamente eficaz puede depender al menos en parte de la especie de animal que está tratándose, el tamaño del animal y/o la gravedad del trastorno.

Divulgación adicional se encuentra en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 13/566.433, la solicitud de patente de EE.UU. N.º 13/872.935, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2013/0017211, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2012/0156248, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2007/0253983, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2007/0202092, la publicación de patente de EE.UU. N.º 20070238120, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2006/0239992, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0220846, la publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0180964 y la solicitud de patente australiana N.º 2011201420, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

II. Composición

La presente divulgación se basa en el novedoso descubrimiento de que una combinación de glucano, sílice, arcilla mineral, mananos puede prevenir o reducir eficazmente el estrés por calor en animales. Realizaciones de la composición desvelada comprenden uno o más componentes como se desvelan en el presente documento. La composición normalmente comprende glucano (por ejemplo, β -1,3(4)glucano), sílice, arcilla mineral y mananos. En algunas realizaciones, la composición comprende además una endoglucanohidrolasa, tal como β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa. Fuentes de sílice adecuadas incluyen, pero no se limitan a, arena, cuarzo, tierra de diatomeas y sílice sintética. En ciertas realizaciones, los mananos comprenden glucomanano.

Los componentes de la composición se preparan por métodos comúnmente conocidos en la técnica y pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales. Al menos algunos componentes de la composición (por ejemplo, sílice, arcilla mineral) también pueden estar presentes en el entorno. La β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa puede producirse a partir de la fermentación sumergida de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum*. La tierra de diatomeas está disponible como un producto lavado en ácido comercialmente disponible con 95 % de sílice (SiO_2) y con sus componentes restantes no ensayados, pero que consisten principalmente en ceniza (minerales) como se define por la Asociación de Químicos Analíticos (AOAC, 2002). Las arcillas minerales (por ejemplo, aluminosilicatos) usadas en esta composición pueden ser cualquiera de una variedad de arcillas comercialmente disponibles que incluyen, pero no se limitan a, arcilla de montmorillonita, bentonita y zeolita. El glucano y los mananos pueden obtenerse de paredes celulares de plantas, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*), ciertos hongos (por ejemplo, setas) y bacterias.

En una realización, la composición incluye 1-40 % en peso de sílice, 1-25 % en peso de glucano y mananos y 40-92 % en peso de arcilla mineral. En otra realización, la composición comprende 5-40 % en peso de sílice, 2-15 % en peso de glucano y mananos y 40-80 % en peso de arcilla mineral. En otra realización, la composición comprende 20-40 % en peso de sílice, 4-10 % en peso de glucano y mananos y 50-70 % en peso de arcilla mineral. En otra realización, la composición comprende 15-40 % en peso de sílice, 1-15 % en peso de glucanos, 0-10 % en peso de mananos y 50-81 % en peso de arcilla mineral. En otra realización, la composición comprende 15-40 % en peso de sílice, 1,0-5,0 % en peso de glucanos, 1,0-8,0 % en peso de mananos y 50-81 % en peso de arcilla mineral. En otra

realización, la composición comprende 20-30 % en peso de sílice, 1,0-3,5 % en peso de glucanos, 1,0-6,0 % en peso de mananos y 60-75 % en peso de arcilla mineral.

En algunas realizaciones, los β -glucanos y mananos se obtienen de extracto de la pared celular de levadura, y la composición I comprende 1-40 % en peso de sílice, 1-30 % en peso de extracto de la pared celular de levadura, 40-92 % en peso de arcilla mineral. En una realización, la composición I comprende 10-40 % en peso de sílice, 5-20 % en peso de extracto de la pared celular de levadura y 40-80 % en peso de arcilla mineral. En otra realización, la composición I comprende 15-30 % en peso de sílice, 5-15 % en peso de extracto de la pared celular de levadura y 55-70 % en peso de arcilla mineral.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición puede comprender además una endoglucanohidrolasa, tal como β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa. La composición puede incluir de al menos el 0,05 % en peso de endoglucanohidrolasa al 5 % en peso de endoglucanohidrolasa, tal como del 0,05-3 % en peso de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa. En una realización, la composición I consiste esencialmente en 0,1-3 % en peso de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, 20-40 % en peso de sílice, 2-20 % en peso de glucano y mananos y 50-70 % en peso de arcilla mineral. En otra realización, la composición consiste esencialmente en 0,2-3 % en peso de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, 20-40 % en peso de sílice, 4-10 % en peso de glucano y mananos y 50-70 % en peso de arcilla mineral. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la sílice puede proporcionarse por tierra de diatomeas. En cualquiera de las realizaciones anteriores, los glucanos pueden ser β -glucanos. En algunas realizaciones, los β -glucanos pueden obtenerse de levadura, u otros materiales, tales como hongos, algas, o similares. En cualquiera de las realizaciones anteriores, los mananos pueden comprender glucomanano.

El glucano y mananos (o extracto de la pared celular de levadura) puede prepararse por un método comúnmente conocido en la técnica. En una realización independiente, puede ser una fuente comercial de β -1,3(4)glucano y glucomanano derivada de levadura inactivada primaria (*Saccharomyces cerevisiae*) con la siguiente composición química:

Humedad 3,5-6,5 %
Proteínas 1-6 %
Grasas 0-0,5 %
Fósforo 0-0,2 %
Mananos 9-20 %
 β -1,3-(4) glucano 9-18 %
Ceniza 75-85 %; y en algunas realizaciones, la composición puede comprender además materia seca 97-98 %.

En otra realización independiente, la composición puede comprender:

Humedad 2-3 %
Materia seca 97-98 %
Proteínas 14-17 %
Grasas 20-22 %
Fósforo 1-2 %
Mananos 22-24 %
 β -1,3-(4) glucano 24-26 %
Ceniza 3-5 %.

Las arcillas minerales (aluminosilicatos) usadas en esta composición pueden ser cumplidas por cualquiera de una variedad de arcillas comercialmente disponibles que incluyen, pero no se limitan a, arcilla de montmorillonita, bentonita y zeolita.

En una realización independiente de la composición, sílice, glucano y mananos y arcilla mineral se combinan al 1-40 %, 1-25 % y 40-92 %, respectivamente. En una realización independiente de la composición, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, tierra de diatomeas, extracto de la pared celular de levadura y arcilla mineral se combinan al 0,05-3 %, 1-40 %, 1-20 % y 40-92 %, respectivamente. En una composición independiente, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, tierra de diatomeas, extracto de la pared celular de levadura y arcilla mineral se combinan al 0,1-3 %, 5-40 %, 2-10 % y 40-80 %, respectivamente. En otra realización independiente de la composición, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, tierra de diatomeas, extracto de la pared celular de levadura y arcilla mineral se combinan al 0,2-3 %, 30-40 %, 4-6 % y 50-65 %, respectivamente.

En algunas realizaciones, la composición incluye componentes adicionales. Pueden usarse componentes adicionales para cualquier fin deseado, tal como un material inerte sustancialmente biológico añadido, por ejemplo, como una carga, o para proporcionar un efecto beneficioso deseado. Por ejemplo, la composición puede incluir un carbonato (incluyendo un carbonato metálico tal como carbonato cálcico), alga marina, una vitamina (tal como un complemento de niacina o complemento de vitamina B-12), biotina, pantotenato de d-calcio, cloruro de colina, mononitrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina, dimetilpirimidinolbissulfato de menadiona, riboflavin-5-fosfato, ácido fólico, aceite de soja, aluminosilicato de calcio, cáscaras de arroz, aceite mineral, o cualquier combinación de los

mismos.

La composición puede formularse en cualquier forma, que incluye un polvo, un gránulo, una pella, una solución o una suspensión. En una realización, la composición puede ser un polvo fluido seco adecuado para inclusión directa en un pienso comercialmente disponible, producto alimenticio o como un complemento para una ración mixta total o dieta. El polvo puede mezclarse con cualquier pienso sólido o líquido o con agua. En otra realización, la composición puede formarse en pellas.

En una realización, cuando se incorpora directamente en piensos, la composición puede añadirse en cantidades que oscilan de 0,1 a 100 kg por tonelada, tal como de 0,1 a 20 kg por tonelada (2000 libras) de pienso. En algunas realizaciones, la composición puede añadirse a piensos para animales o a alimentos en cantidades de 0,1 kg a 50 kg por tonelada, de 0,1 a 20 kg por tonelada, o de 0,5 kg a 10 kg por tonelada de pienso. En ciertas realizaciones, la composición puede añadirse a piensos en cantidades que oscilan de 1 a 5 kg por tonelada de pienso.

Cuando se expresa como un porcentaje de materia seca de pienso, la composición puede añadirse a los piensos para animales o a alimentos en cantidades que oscilan del 0,01 al 2,5 % en peso, tales como del 0,0125 % al 2 % en peso. En una realización, la composición puede añadirse a piensos para animales o a alimento en cantidades del 0,05 al 1,5 % en peso, tal como del 0,06 % al 1 % en peso. En otra realización, la composición puede añadirse en cantidades del 0,1 al 0,7 % en peso, tales como del 0,125 % al 0,5 % en peso de pienso.

Alternativamente, la composición puede ser alimentada directamente al animal como un complemento en cantidades de 0,01 gramos a 20 gramos por kilogramo de peso corporal vivo por día, tal como de 0,01 gramos a 10 gramos por kilogramo, 0,01 gramos a 5 gramos, 0,01 gramos a 1 gramo, 0,015 gramos a 1 gramo, o 0,02 gramos a 0,4 gramos por kilogramos de peso corporal vivo por día. En algunas realizaciones, la composición puede proporcionarse para su uso con muchas especies en cantidades de 0,05 gramos a 0,20 gramos por kilogramo de peso corporal vivo por día.

Adicionalmente, la composición puede ser alimentada a animales mamíferos o especies aviares como un complemento (en combinación con otro pienso, o sola) en cantidades que oscilan de 10 gramos por cabeza por día a 70 gramos por cabeza por día, tal como de 40 gramos por cabeza por día a 70 gramos por cabeza por día, de 45 gramos por cabeza por día a 70 gramos por cabeza por día, o de 50 gramos por cabeza por día a 70 gramos por cabeza por día. En realizaciones a modo de ejemplo, la composición puede proporcionarse a bovinos en una cantidad que oscila de 50 gramos por cabeza por día a 60 gramos por cabeza por día, tal como 56 gramos por cabeza por día.

La forma física de la composición puede ser un polvo fluido seco que es adecuado para inclusión directa en un pienso, producto alimenticio o como un complemento a una ración mezclada total o dieta.

Alternativamente, la composición contenida en la presente composición puede ser alimentada directamente al mamífero o especie aviar como un complemento en cantidades de 0,016 gramos/kg a 0,37 gramos/kg de peso corporal vivo por día. En una realización independiente, la composición puede proporcionarse al mamífero y especie aviar en cantidades de 0,10 gramos/kg a 0,20 gramos/kg de peso corporal por día.

En realizaciones desveladas particulares, la composición puede administrarse al mamífero o especie aviar usando un vehículo. El vehículo puede ser cualquier vehículo que sabe una persona experta habitual en la materia que es adecuado para combinar con una composición de pienso, tal como melazas. En algunas realizaciones, la composición incluye componentes adicionales. Por ejemplo, la composición incluye carbonato cálcico, algas marinas secadas, complemento de niacina, biotina, pantotenato de d-calcio, complemento de vitamina B-12, cloruro de colina, mononitrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina, dióxido de silicio, riboflavin-5-fosfato, ácido fólico, aceite de soja, o cualquier combinación de los mismos.

Un experto en la materia puede apreciar que la cantidad de la composición reivindicada alimentada puede variar dependiendo de la especie de animal, tamaño del animal y tipo de pienso al que se añade la composición reivindicada.

III. Reducción del estrés por calor

En realizaciones desveladas particulares, la composición desvelada en el presente documento puede usarse para prevenir y/o promover la reducción del estrés por calor en animales. El estrés por calor puede alterar la producción, reproducción y salud del animal. Por ejemplo, el estrés por calor puede conducir a una elevada frecuencia respiratoria, elevada temperatura corporal, elevado consumo de líquidos, disminución del consumo de alimentos, disminución del aumento de peso, disminución del rendimiento de la leche, disminución de la reproducción, alcalosis respiratoria, alcalosis ruminal, acidosis metabólica, aumento del estrés oxidativo, disminución de la función inmunitaria y/o elevado daño celular y muerte. Por consiguiente, cualquiera de los factores anteriores puede ser evaluado como indicadores del estrés por calor. En algunas realizaciones, el indicador de estrés por calor es el consumo de alimentos, consumo de agua, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, rendimiento de la leche, grasa

de la leche, proteína de la leche, un biomarcador inmunitario, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el indicador de estrés por calor es el consumo de alimentos, consumo de agua, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, rendimiento de la leche, grasa de la leche, proteína de la leche, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las condiciones de estrés por calor se producen cuando un índice de temperatura-humedad (THI) es superior a 68, tal como superior a 75, ≥ 79 (considerado como un nivel peligroso), o ≥ 84 (que se considera como un nivel de emergencia). En otra realización, las condiciones de estrés por calor se producen cuando el índice de calor, comúnmente informado por los medios para los seres humanos, está por encima de 100, tal como por encima de 110, por encima de 115, o por encima de 120.

La composición puede administrarse a un animal que es susceptible al estrés por calor o que padece estrés por calor. En una realización, la composición se administra al animal cuando el índice de temperatura-humedad es, o se espera que sea, superior a 68. La composición puede administrarse al animal a intervalos fijos. Por ejemplo, la composición puede administrarse al animal diariamente. En algunas realizaciones, una cantidad diaria de la composición se divide y administra al animal en dos o más alimentaciones.

En algunas realizaciones, el animal puede ser un animal criado para consumo humano que incluye, pero no se limita a, mamíferos, tales como ganado (por ejemplo, ganado vacuno para alimentación o lechero) o cerdos; aves, tales como aves de corral domésticas (por ejemplo, pollo, pavo, ganso, pato, gallina de Cornualles, perdiz, faisán, gallina de Guinea, avestruz, emú, cisne o paloma); o peces (por ejemplo, salmón, trucha y similares). En otras realizaciones, el animal puede ser un animal doméstico, tal como un perro, gato, pez o conejo. En algunas otras realizaciones, el animal puede ser una especie de rumiante, tal como una oveja, cabra, vaca, reno, bisonte, búfalo o llama. En todavía otras realizaciones, el animal puede ser un ungulado tal como un caballo, burro o cerdo.

El método desvelado y la composición pueden usarse para promover la reducción del estrés por calor en cualquier especie de mamífero (incluyendo ser humano), aviar o acuática. En una realización particular, las composiciones se administran a animales de ganado, que incluyen tanto ruminantes (por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cabras, vacas, reno, bisonte, búfalo) como no ruminantes (por ejemplo, cerdos, caballos, cerdas).

La composición desvelada en el presente documento puede administrarse en una cantidad eficaz para promover la reducción del estrés por calor en animales, tales como vacas lecheras, particularmente vacas lecheras lactantes. La composición puede administrarse antes o después de parir durante un número de días adecuado. La composición también puede administrarse antes de la lactancia o después de la lactancia. Por ejemplo, la composición puede administrarse al animal durante un periodo desde 1 día antes de la aparición de la lactancia hasta 100 días antes de la aparición de la lactancia. En otras realizaciones desveladas, la composición puede administrarse al animal durante 40 días a 100 días después de parir, o durante 45 días a 95 días después de parir, o durante 50 días a 90 días después de parir.

En algunas realizaciones, una vaca lechera se alimenta con la composición durante un periodo de tiempo para aumentar la producción de leche con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. En realizaciones particulares, la vaca lechera tiene menor grasa de la leche con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. En una realización, la vaca lechera tuvo consumo de agua reducido con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. En otra realización, la vaca lechera tuvo una frecuencia respiratoria reducida con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. En otra realización más, la vaca lechera tuvo una temperatura rectal reducida con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. La vaca lechera puede tener un aumento del consumo de alimentos con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. En realizaciones desveladas particulares, la vaca lechera puede tener alcalosis respiratoria reducida, acidosis del rumen, acidosis metabólica, y todas y cada una de las composiciones de los mismos, con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición. En otra realización, la vaca lechera tiene niveles de cortisol en suero reducidos con respecto al ganado vacuno lechero no alimentado con la composición.

En realizaciones desveladas adicionales, la composición puede administrarse profilácticamente. En ciertas realizaciones, la composición puede administrarse profilácticamente y continuamente. Por ejemplo, el animal puede administrarse con la composición cada día durante un cierto periodo de tiempo antes y durante la lactancia.

La composición desvelada puede formularse para administración a animales con el fin de prevenir y/o promover la reducción del estrés por calor. En realizaciones desveladas particulares, la cantidad eficaz de la composición administrada puede ser afirmativamente elegida basándose en la capacidad de la cantidad eficaz para promover la reducción del estrés por calor en un animal basándose en factores particulares desvelados en el presente documento. En realizaciones desveladas particulares, la cantidad eficaz puede determinarse administrando una primera dosis particular al animal, monitorizando el animal durante el estrés por calor, y entonces ajustando la dosis con el fin de determinar una cantidad eficaz de una segunda dosis que mejorará, o adicionalmente mejorará, el estrés por calor del animal.

- En una realización, la composición se administra a un grupo de animales que tiene o está en riesgo de desarrollar estrés por calor. La composición puede administrarse al grupo de animales en una primera cantidad durante un primer periodo de tiempo. Posteriormente, se mide un indicador de estrés por calor de al menos un animal en el grupo de animales. Basándose al menos en parte en la medición del indicador de estrés por calor, puede ajustarse la cantidad de composición administrada al grupo de animales durante un periodo de tiempo posterior. Por ejemplo, la cantidad puede aumentarse si la medición del indicador de estrés por calor indica que los animales están estresados. Alternativamente, la cantidad puede disminuirse si la medición del indicador de estrés por calor indica que los animales no están estresados o tienen relativamente poco estrés por calor.
- En otra realización, se evalúan animales individuales en un grupo de animales para estrés por calor. El estrés por calor puede evaluarse, por ejemplo, midiendo un nivel de uno o más indicadores de estrés por calor. Basándose al menos en la medición, se hace una determinación si uno o más de los animales individuales está sufriendo estrés por calor. Pueden seleccionarse animales individuales en el grupo que están sufriendo estrés por calor para recibir la composición durante un periodo de tiempo eficaz para promover la reducción del estrés por calor.
- En realizaciones desveladas particulares, la composición puede administrarse con un vehículo de melaza una vez o múltiples veces al día (por ejemplo, de dos a cinco veces por día). La composición puede mezclarse en la ración mezclada total de pienso que puede proporcionarse al mamífero o especie aviar, tal como en el cuarto superior, tercio superior o mitad superior de la ración mezclada total.
- En algunas realizaciones, el animal se administra además con un proceso terapéutico y/o un agente terapéutico adecuado para tratar estrés. Procesos y agentes terapéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, provisión de sombra al animal, uso de rociadores de agua para administrar externamente agua al animal, uso de un ventilador para proporcionar movimiento del aire, adición de piensos ricos en grasas o grasas de derivación, meloxicam, corticosteroides (isoflupredona, fludrocortisona, triamcinolona, dexametasona, betametasona, flumetasona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona), electrolitos orales (por ejemplo, sodio, glucosa, glicina, potasio, cloruro), agentes alcalinizantes (por ejemplo, sales de bicarbonato, acetato y/o citrato), microbianos de alimentación directa, y combinaciones de los mismos.
- La capacidad de la composición para reducir y/o revertir el estrés por calor puede determinarse comparando indicadores de estrés por calor con animales que no son administrados con la composición. En realizaciones desveladas particulares, pueden usarse los indicadores de estrés por calor para determinar el efecto de la composición sobre el estrés por calor. Indicadores/factores de estrés por calor adecuados incluyen, pero no se limitan a, consumo de alimentos, rendimiento de la leche, grasa de la leche, proteína de la leche, consumo de agua, frecuencias respiratorias, temperaturas rectales, y combinaciones de los mismos.
- En realizaciones desveladas particulares, los animales que se administran con la composición tendrán un mayor consumo de alimentos durante el estrés por calor en comparación con los animales que no son administrados con la composición. El consumo de alimentos durante el estrés por calor puede aumentar de 2 kg a 10 kg (o de 2 kg a 8 kg, o de 2 kg a 6 kg, o 2 kg a 4 kg) en comparación con el consumo de alimentos de un animal de la misma especie que no ha sido administrado con la composición. En realizaciones a modo de ejemplo, un bovino que se administra con la composición tendrá un consumo de alimentos de 3 kg superior a un bovino que no ha sido administrado con la composición.
- El rendimiento de la leche también puede mantenerse o aumentarse (como en comparación con rendimientos de animales que no son administrados con la composición) durante el estrés por calor administrando la composición. Por ejemplo, el rendimiento de la leche puede aumentar 1 kg, 2 kg, 3 kg, 4 kg, hasta 10 kg usando la composición desvelada. En realizaciones desveladas particulares, los animales a los que se proporciona la composición producirán leche que tiene menor grasa de la leche y/o proteína de la leche (en términos de porcentaje). Por ejemplo, la grasa de la leche puede reducirse del 0,2 % al 1 %, o del 0,2 % al 0,8 %, o del 0,2 % al 0,6 %, con realizaciones a modo de ejemplo que incluyen una reducción del 0,4 %. En una realización, una vaca lechera alimentada con la composición produce un porcentaje de grasa de la leche del 3,8 %, mientras que ganado vacuno lechero no alimentado con la composición tiene un porcentaje de grasa de la leche del 4,2 %.
- El consumo de agua, frecuencias respiratorias y niveles de cortisol en suero también se reducen administrando la composición desvelada, presentando algunas realizaciones de 4 a 10 respiraciones por minuto menos. Otro factor que indica que la composición desvelada es capaz de reducir el estrés por calor es la temperatura rectal, que normalmente puede ser reducida 0,10 °C a 0,3 °C, en comparación con las temperaturas rectales tomadas de animales que no son administrados con la composición. Adicionalmente, los animales que han sido administrados con la composición desvelada pueden tener reducida alcalosis respiratoria, acidosis del rumen, acidosis metabólica, y combinaciones de los mismos, en comparación con los animales que no se administraron la composición.

IV. Ejemplos

Ejemplo 1

5 Se equilibraron un total de 60 vacas en una vaquería comercial en Arizona para DIM, paridad y producción de leche y se asignaron a 1 de 2 grupos de tratamiento alimentados con la composición desvelada (OmniGen-AF® [OG] que comprende entre 15 % y 40 % de sílice, entre 50 % y 81 % de arcilla mineral, entre 1,0 % y 5,0 % de β -glucanos, entre 0,05 % y 3,0 % de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1 % y 8,0 % de manano, 30 vacas) o dietas de control (CON, 30 vacas) durante 52 d después de parir. A los 52 d de la lactancia, se seleccionaron aleatoriamente vacas (n = 12) de ambos grupos (6 OG y 6 CON) y se alojaron en módulos ambientalmente controlados durante 21 d. OG fue recubierto 2x/d con melazas como vehículo y las vacas CON recibieron el vehículo de melaza 2x/d. Ambos se mezclaron con el tercio superior de la TMR (ración mezclada total). Durante la fase de sala ambiental del estudio, las vacas alimentadas con OG tuvieron mayor consumo de alimentos que CON durante el estrés por calor (HS) (46,8 kg frente a 42,9 kg, $P < 0,0001$) y no hubo diferencia durante la termoneutra (TN). Se usó un umbral de índice de temperatura-humedad (THI) de 68 o mayor para lograr HS. La alimentación con OG mantuvo una ventaja numérica de rendimiento de leche de 1 kg en comparación con CON (30,3 kg frente a 31,4 kg, $P = 0,26$) durante HS pero no durante TN. Las vacas alimentadas con OG tuvieron menos grasa de la leche (%) (4,2 % frente a 3,8 %, $P = 0,02$) y proteína de la leche (%) ($P = 0,04$). No hubo diferencia en 3,5 % de FCM entre tratamientos. El consumo de agua fue más bajo (12,4 l/d en vacas tratadas con OG, $P < 0,01$) que en vacas de control. Las frecuencias respiratorias fueron más bajas en vacas tratadas a las 14:00 h y 17:00 h (4,7 y 8,4 respiraciones/min menos, $P = 0,05$, $< 0,001$) y las temperaturas rectales también fueron más bajas (0,15 °C y 0,25 °C más bajas que CON, $P = 0,05$, $< 0,001$) en vacas tratadas. La alimentación con OG redujo las respuestas fisiológicas al estrés por calor en vacas lecheras lactantes.

Ejemplo 2

Se equilibraron un total de 30 vacas en una vaquería comercial en Arizona para DIM, paridad y producción de leche y se asignaron a 1 de 2 grupos de tratamiento alimentados con la composición desvelada (OmniGen-AF® [OG] que comprende entre 15 % y 40 % de sílice, entre 50 % y 81 % de arcilla mineral, entre 1,0 % y 5,0 % de β -glucanos, entre 0,05 % y 3,0 % de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1 % y 8,0 % de manano, 15 vacas) o dietas de control (CON, 15 vacas) durante 90 d después de parir. A los 90 d de la lactancia, se seleccionaron aleatoriamente vacas (n = 12) de ambos grupos (6 OG y 6 CON) y se alojaron en módulos ambientalmente controlados durante 21 d en la Universidad de Arizona. OG fue recubierto 2x/d con melazas como el vehículo. Las vacas CON recibieron el vehículo de melaza 2x/d. Ambos se mezclaron con el tercio superior de TMR. Durante la fase de sala ambiental del estudio, las vacas alimentadas con OG tuvieron mayor consumo de alimentos que CON durante el estrés por calor (HS) (46,8 kg frente a 42,9 kg, $P < 0,0001$) y no hubo diferencia durante la termoneutra (TN). Se usó un umbral de índice de temperatura-humedad (THI) de 68 o mayor para lograr HS. La alimentación con OG mantuvo una ventaja numérica de rendimiento de leche de 1 kg en comparación con CON (30,3 kg frente a 31,4 kg, $P = 0,26$) durante HS pero no durante TN. Las vacas alimentadas con OG tuvieron menos grasa de la leche (%) (4,2 % frente a 3,8 %, $P = 0,02$) y proteína de la leche (%) ($P = 0,04$). No hubo diferencia en 3,5 % de FCM entre tratamientos. El consumo de agua fue más bajo (12,4 l/d en vacas tratadas con OG, $P < 0,01$) que en vacas de control. Las frecuencias respiratorias fueron más bajas en vacas tratadas a las 14:00 h y 17:00 h (4,7 y 8,4 respiraciones/min menos, $P = 0,05$, $< 0,001$) y las temperaturas rectales también fueron más bajas (0,15 °C y 0,25 °C más bajas que CON, $P = 0,05$, $< 0,001$) en vacas tratadas. La alimentación con OG redujo las respuestas fisiológicas al estrés por calor en vacas lecheras lactantes.

Diseño experimental: El estudio consistió en dos fases; 1) la vaquería comercial, y 2) las cámaras ambientales controladas. Durante la fase de vaquería comercial, vacas Holstein lactantes multiparas (n=30) fueron equilibradas por DIM, producción de leche y paridad ($91 \pm 5,9$ DIM, $36,2 \pm 2,5$ kg/d y $3,1 \pm 1,4$). Las vacas se separaron en uno de los dos grupos. El grupo de control recibió la TMR base sin complemento. El grupo de tratamiento se alimentó con la dieta base más 56 g/ cabeza/ día de la composición OmniGen-AF mezclada en la TMR. Se midió diariamente la producción de leche. La fase de vaquería duró 45 días. Se usó la porción de vaquería para cumplir la alimentación de 45 d recomendada por la fabricación para que funcionara la composición de OmniGen-AF.

Después de completarse la porción en la vaquería, 12 vacas (6 de control y 6 de tratamiento) se alojaron en las salas ambientalmente controladas en el Centro de Investigación Agrícola (ARC). Las vacas continuaron la porción de ARC en los mismos grupos de tratamiento de la porción en la vaquería.

La porción de ARC duró 21 días. Las vacas se sometieron a 7 días de condiciones TN, 10 días de HS y 4 días de recuperación (TN). El ciclo diurno durante la termoneutra (TN) y recuperación mantuvo un índice de temperatura-humedad (THI) < 68 . Durante HS, el THI fue superior a 68 durante 16 horas/día. Las temperaturas imitaron las temperaturas ambiente en un vaquería del sudeste de Estados Unidos durante el calor del verano y condiciones TN. Se proporcionó pienso nuevo dos veces al día y las vacas se alimentaron individualmente. Los animales de control recibieron TMR base, y las vacas de OmniGen-AF recibieron 56 g/cabeza por día, divididos entre dos comidas. Se midieron diariamente el consumo de alimentos, la producción de leche y la composición de la leche. Las temperaturas rectales y frecuencias respiratorias se registraron 3x /d (06:00, 14:00 y 18:00 h). Se tomaron muestras

de sangre por venopunción de la vena de la cola (coccígea) en los días 7 (TN), 8 (HS), 10 (HS), 17 (HS) y 18 (TN) durante el segmento de ARC. Se recogieron muestras 6 veces por día (04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 y 24:00 h) en los días 7, 8, 17 y 18, y una vez por día en el día 14 (08:00 h). Se recogió sangre en tubos Vacutainer (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ) que contenían heparina sódica para plasma y en tubos de blanco estériles para suero.

Se realizaron análisis estadísticos usando el procedimiento de PROC MIXED (versión 9.3, SAS Institute, Cary, NC). La vaca fue la unidad experimental (porción de ARC). Los datos se presentan en medias por mínimos cuadrados con significancia declarada con un valor de $P \leq 0,05$. (Véase la Tabla 1, más adelante).

No hubo diferencias iniciales en el rendimiento de la leche (control = 38,6 kg/día y tratamiento = 38,6 kg/día) al inicio de la fase en la vaquería del estudio. Hubo una ventaja numérica con respecto a la alimentación de OmniGen-AF (FIG. 1) de 1,5 kg de leche/día, pero ésta no fue significativa (control = 36,8 kg/día y tratamiento = 38,3 kg/día).

Hubo un efecto del periodo sobre el rendimiento de la leche ($P < 0,01$) durante la fase de la sala ambiental (ARC) asociado a una disminución en el rendimiento de la leche en ambos grupos durante HS. El rendimiento de la leche en ARC ($P < 0,23$) no se diferenció entre los grupos de control y alimentados con OmniGen-AF (FIGS. 2, 3), sin embargo, hubo una ventaja numérica (1,1 kg/día) para vacas alimentadas con OmniGen-AF durante HS ($P < 0,26$) que fue similar al patrón en el rendimiento de la leche indicado durante la fase en la granja.

La alimentación de la composición desvelada a las vacas lecheras estresadas por calor mantuvo el consumo de alimentos durante el estrés por calor. Los consumos de alimentos en los dos grupos no se diferenciaron durante TN, pero fueron más altos durante HS en vacas alimentadas con OmniGen-AF (46,8 kg/d y 42,9 kg/d, $P < 0,01$, FIGS. 4, 5; Tabla 1).

La proteína de la leche (%) y grasa (%) fueron más bajas en las vacas alimentadas con OmniGen-AF (Tabla 1) durante HS pero no durante TN. No hubo diferencia en FCM o el rendimiento de proteína entre tratamientos. Las vacas alimentadas con OmniGen-AF presentaron una cifra reducida de células somáticas (SCC) en comparación con las vacas de control (59,4 y 26,3 $\times 1000$, $P < 0,03$; Tabla 1), con la mayor diferencia durante el periodo de recuperación (FIG. 6). Hubo un pico en SCC aproximadamente en el día 5 (TN) y durante la recuperación aproximadamente en el día 17 (FIG. 6).

Tabla 1

Efectos de la complementación de OmniGen-AF en vacas lecheras lactantes estresadas por calor								
Punto	Control			OmniGen-AF			EEM	Valor de P
	TN	HS	Recuperación	TN	HS	Recuperación		
Consumo de alimentos (kg)	46,1	42,9	47,5	47,1	46,8*	49,1	1,04	0,01
Rendimiento de la leche (kg)	33,1	30,3	30,4	33,9	31,4	31,3	1,02	0,23
Grasa (%)	4,03	4,22	4,16	3,94	3,82	3,83	0,22	0,04
FCM (kg/d)	35,0	33,7	33,7	34,7	32,8	32,6	1,45	0,39
Proteína (%)	2,95	2,98*	2,86	2,95	2,86	2,79	0,07	0,15
Proteína (kg)	0,98	0,89	0,90	1,00	0,93	0,92	0,30	0,13
Lactosa (%)	4,87	4,85	4,99	4,89	4,78	4,96	0,08	0,61
SCC	20,3	23,9	59,4*	19,6	22,9	26,3	9,12	0,03

*= Valor de $P \leq 0,05$ e indica el valor más alto

La frecuencia respiratoria y las temperaturas rectales no se diferenciaron entre tratamientos durante TN; sin embargo, durante HS, OmniGen-AF redujo la frecuencia respiratoria, (Tabla 2, $P < 0,01$) en ambos entornos a las 14:00 h y en animales HS a las 18:00 h cuando la carga de calor ambiental fue la mayor. Las temperaturas rectales fueron más bajas en vacas alimentadas con OmniGen-AF a las 14:00 y 18:00 h en comparación con controles cuando las cargas de calor ambiental fueron máximas.

Tabla 2. Efectos de la complementación de OmniGen-AF y entorno sobre la frecuencia respiratoria y la temperatura rectal en vacas lecheras lactantes

Punto	Control			OmniGen-AF			EEM	Valor de P
	TN	HS	Recuperación	TN	HS	Recuperación		
Resp/min								
06:00	26,9	31,9	28,3	26,6	30,4	27,9	1,40	0,40
14:00	34,3	63,1*	35,3	30,1	58,3	35,5	2,99	0,20
18:00	34,9*	60,8*	32,1	29,5	52,4	29,7	2,62	0,01
Temp rectal (°C)								
06:00	38,2	38,0	37,9	38,2	38,1	38,1	0,05	0,26
14:00	38,0	38,7*	38,0	38,1	38,5	38,1	0,09	0,77
18:00	38,2	39,1*	38,2	38,2	38,8	38,3	0,08	0,25

* $P \leq 0,05$ e indica el valor más alto.

Las hormonas en plasma son importantes como posibles indicadores del estado fisiológico de una vaca y reflejan las compensaciones fisiológicas a las que una vaca se somete en diversos estados de la lactancia y exposición a HS. Los niveles de cortisol en suero fueron los más altos en el día 8 (primer día de HS, FIG. 7). Esto está de acuerdo con informes previos de que el HS agudo pero no crónico está asociado a aumentos en las concentraciones de cortisol circulantes (Christian y Johnson, 1972, Wise et al., 1988). Las vacas tratadas con OmniGen-AF tuvieron cortisol en suero significativamente más bajo en el día 8 (0,8372 frente a 0,4838 µg/dl para control y OmniGen-AF respectivamente, $P < 0,006$) y no se diferenciaron en otros días. Esto sugiere que OmniGen puede reducir el impacto del estrés agudo sobre la respuesta del cortisol en vacas lecheras lactantes.

Los niveles de insulina en suero y de glucosa en plasma (FIGS. 8 y 9) no fueron diferentes entre grupos ($P = 0,8248$ y $0,945$). Las concentraciones de insulina en suero en ambos grupos aumentaron durante la última parte del periodo de HS y durante el periodo de recuperación. El motivo de este patrón es desconocido.

Se evaluó la función inmunitaria del ganado vacuno en este estudio mirando la expresión del receptor de interleucina-8 (FIG. 10) y la expresión de la proteína regulada con la activación, expresada y secretada por linfocitos T normales (RANTES) (FIG. 11), que es un miembro de la familia de interleucina-8 de citocinas.

La exposición al estrés por calor fue de leve a moderada en este estudio. El umbral para el estrés por calor en vacas lecheras lactantes es un THI > 68 , frecuencias respiratorias > 60 lpm y temperaturas rectales $> 38,5$ °C (Zimbleman et al., 2009). OmniGen-AF redujo el impacto del estrés térmico sobre el estrés de vacas lecheras lactantes. Las vacas alimentadas con OmniGen-AF tuvieron temperaturas rectales y frecuencias respiratorias reducidas durante periodos de carga térmica pico. Las frecuencias respiratorias en vacas tratadas no superaron 60 lpm y las temperaturas rectales medias fueron 0,2 a 0,3 °C más frías. Las vacas alimentadas con OmniGen-AF también presentaron consumos de alimentos más altos durante el HS. Las vacas alimentadas con OmniGen-AF también presentaron un pico de cortisol más bajo en el primer día de estrés por calor.

El rendimiento de la leche disminuyó con el estrés por calor en tanto los animales de control como los animales alimentados con OmniGen-AF. Sin embargo, el consumo de alimentos no cambió en las vacas alimentadas con OmniGen-AF y los rendimientos de la leche fueron numéricamente más altos. Cambios en SCC fueron coherentes entre grupos. Las vacas alimentadas con OmniGen-AF presentaron SCC reducida en comparación con las vacas de control con la diferencia más alta durante el periodo de recuperación.

Los niveles de cortisol en suero fueron similares a los hallazgos previos (Christison y Johnson, 1972) y aumentaron en el plazo del primer día de exposición al calor. Los animales en ARC tuvieron niveles de cortisol más altos en comparación con los niveles publicados, pero el confinamiento y los cambios en los alrededores de la vaquería a la ARC pueden explicar algunos de los cambios.

La expresión génica de citocinas (RANTES) fue más alta en vacas alimentadas con OmniGen-AF durante la porción de HS del estudio, pero no durante la recuperación. La elevada expresión génica de citocinas puede asociarse a función inmunitaria mejorada en vacas alimentadas con OmniGen-AF.

Ejemplo 3

Se ha demostrado que realizaciones de la composición desvelada, tales como la composición OmniGen-AF® que comprende entre 15 % y 40 % de sílice, entre 50 % y 81 % de arcilla mineral, entre 1,0 % y 5,0 % de β -glucanos, entre 0,05 % y 3,0 % de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1 % y 8,0 % de manano (OG), reducen las medidas fisiológicas del estrés por calor (por ejemplo, temperatura corporal, frecuencia respiratoria y consumo de agua) en ganado vacuno sometido a condiciones de temperatura y humedad por encima de su zona termoneutra. Simultáneamente, en animales alimentados con OG, el consumo de alimentos aumentó significativamente y el rendimiento de la leche aumentó numéricamente durante los periodos de estrés térmico. Además, mejoraron las medidas de función inmunitaria junto con las reducidas concentraciones de cortisol durante el estrés agudo por calor. Paradójicamente, la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que regula la secreción de cortisol de la corteza suprarrenal aumentó significativamente en animales alimentados con OG (FIG. 12). Esto sugiere que o bien la suprarrenal es menos sensible a ACTH o que la globulina de unión a corticoide es elevada en animales alimentados con OG. Ambas condiciones producirían elevada secreción de ACTH de la pituitaria, ya que se reduciría la retroalimentación negativa en ambos casos. El objetivo de este estudio es determinar si la alimentación con OG a vacas lecheras lactantes disminuye la sensibilidad suprarrenal a ACTH o aumenta la globulina de unión a corticoide en o bien condiciones termoneutras o bien de estrés por calor.

El estrés por calor en vacas lecheras puede producir reducciones en los consumos de materia seca y los rendimientos de la leche y elevadas cifras de células somáticas, frecuencias respiratorias, temperatura corporal y proteína de choque térmico plasmática y cortisol en suero. La alimentación con OG puede reducir el impacto del estrés por calor en estas medidas de respuesta al estrés. La alimentación con OG a vacas lecheras lactantes no estresadas por calor durante 52 días antes de un brote de estrés por calor puede aumentar la expresión de marcadores inmunitarios de la función de neutrófilos (L-selectina, IL8-R y IL-1B) asociada a la secreción de cortisol alterada de la glándula suprarrenal. Esto puede asociarse a secreción de cortisol reducida en respuesta a infusión

de ACTH en vacas alimentadas con OG. El estrés por calor puede reducir la expresión de marcadores inmunitarios de neutrófilos incluso en vacas complementadas con OG. Sin embargo, la reducida respuesta de secreción de cortisol también puede estar presente en vacas lecheras estresadas por calor alimentadas con OG.

5 **Diseño experimental:**

Selección de animales y asignación de tratamiento: Se asignarán treinta vacas lecheras lactantes a uno de los dos tratamientos (15 cabezas/tratamiento). Las vacas del tratamiento 1 serán alimentadas con una dieta de control sin OG, y las vacas del tratamiento 2 vacas serán alimentadas con la dieta de control más OG. OG será previamente mezclado en una mezcla de granos para proporcionar 56 g/cabeza/d. Cada vaca se alojará en un establo de amarre individual donde puede controlarse el consumo individual de pienso y de agua y registrarse antes de ser trasladadas al Centro de Investigación Agrícola (ARC). Después de 45 días en el estudio, todas las vacas se administrarán con una exposición a ACTH de dosis baja (20 mg) mediante infusión en la vena de la cola, y se tomarán muestras de sangre en el tiempo cero, 1 hora, 4 horas y 8 horas después de la exposición a ACTH. Posteriormente, se añadirá un subgrupo de 12 vacas, que ha estado en sus dietas respectivas en una vaquería comercial durante 55 días antes de ser trasladadas a las salas ambientalmente controladas de ARC. De las 30 vacas originales asignadas a tratamientos, se seleccionarán 6 vacas de cada tratamiento para el ensayo y continuarán en sus dietas de tratamiento respectivas mientras están en ARC. La vaca será la unidad experimental.

Programa de muestras de sangre: Se recogerán muestras de sangre de todas las vacas de tratamiento mientras estén en la vaquería comercial en los días 1, 21 y 42 después de la asignación al tratamiento inicial. En los días 45-50 se someterán diez vacas cada día a exposición a ACTH de dosis baja. En cada día de muestreo, aproximadamente 2 horas después de la alimentación en la mañana, las vacas se contendrán en cepos para la cabeza, teniendo cuidado para evitar estresar a los animales; se obtendrán muestras de sangre de la vena de la cola de cada animal y entonces se infundirán a través de la vena de la cola o la arteria de la cola con 20 µg (=2 UI) de un análogo sintético de ACTH (ACTH1-24, Synacthen® - Novartis Pharma AG - Stein, CH). También se tomarán muestras de sangre 30 y 60 minutos después de la inyección de ACTH, dejando las vacas contenidas en los cepos para la cabeza. Todas las muestras de sangre se recogerán en tubos de heparina de Li a vacío, y se guardarán inmediatamente en agua con hielo. En las muestras de sangre, se determinará el hematocrito (PCV) y, después de la centrifugación (3500 g durante 16 min a 6 °C), se medirá el cortisol en plasma por el método de RIA (Coat-A-Count; DPC, Los Angeles, CA, EE.UU.). La respuesta de cortisol integrada durante 60 min se evaluará como el área bajo la curva. Para la evaluación estadística, los datos se someterán a ANOVA usando el procedimiento de GLM (SAS Inst. Inc., Cary, NC, edición 9.1) incluyendo en el modelo vaca, etapa de tratamiento dietético (control o OmniGen-AF) de la lactancia como factores principales. También se realizará un análisis de medidas repetidas en los datos de exposición.

Al llegar al ARC, las vacas se pesarán, se proveerán de ronzales y se recogerán muestras de sangre. Las vacas seguirán en las cámaras de ARC durante 21 días, los primeros 7 días a condiciones térmicas neutras (TN), seguido de 10 días de estrés por calor (HS) y luego 4 días en condiciones TN. En d 7 de TN, d 8 (HS), d 17 (HS), d 18 (TN) y d 21 (TN) se extraerá sangre de las vacas en intervalos de 4 h a las 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 y 24:00 h tras una dosis baja (20 mg) de ACTH infundida a través de la vena de la cola.

Medida fisiológica/del comportamiento: Para evaluar la eficacia del modelo de estrés por calor impuesto, se medirán respuestas fisiológicas y de comportamiento conocidas y se registrarán diariamente. Éstas incluirán el consumo de alimentos, consumo de agua, rendimiento de la leche, concentraciones de células somáticas en leche (células/ml), frecuencia respiratoria, temperatura rectal y mediciones de la temperatura de la piel (3x/d a las 06:00, 14:00 y 18:00 h). Se recogerán muestras de leche y se almacenarán en viales que contienen comprimidos de bronopol para la preservación y se guardarán a 4 °C hasta el análisis. Los análisis se harán por análisis de infrarrojos. Todos los eventos de tratamiento y salud se registrarán diariamente.

Se recogerá la sangre recogida para biomarcadores inmunitarios y se conservará según el protocolo (Wang, et al., 2003). Se evaluarán los biomarcadores inmunitarios L-selectina de neutrófilo, IL8-R y IL-1B en cada muestra. Además, en los días 17 y 18 de las muestras de las 08:00 y 16:00 h, los neutrófilos se purificarán y evaluarán para RANTES (regulada con la activación, expresada y secretada por linfocitos T normales), capacidad de fagocitosis o generación de ROS (especies reactivas de oxígeno). También se determinará el calcio en suero ionizado en muestras recogidas en los días 1, 7, 17, 18 y 21. Se ensayarán las muestras de sangre recogidas en el día 1 de llegada al ARC y los días 7, 8, 12, 17, 18 y 21 para la proteína de choque térmico (HSP) y cortisol. Estas muestras se almacenarán sobre hielo hasta la centrifugación (15.000 x g) durante 15 minutos a 4 °C. Se eliminará el plasma y se guardará a -20 °C y la fracción de capa leucocitaria se eliminará y se guardará en Trizol a -80 °C. En los días de muestreo de sangre, se recogerán muestras de leche adicionales en tanto los ordeños AM como PM y se aislarán los neutrófilos.

Una posibilidad adicional es el muestreo de cortisol fecal como medida no invasiva de la salida de cortisol. Otra consideración es medir los glóbulos de unión a corticoides (CBG). Un aumento en CBG reduciría las concentraciones eficaces de cortisol y produciría aumentos en ACTH.

Ejemplo 4

Procedimientos: Se utilizaron novillos castrados estabulados (306 cabezas; BW 263,5 ± 18,6 kg; 36 rediles) en un experimento de diseño de bloques aleatorizados. Los novillos castrados fueron recibidos durante un periodo de dos días en la unidad de engorde. Tras la llegada, los novillos castrados tuvieron acceso a agua y se procesaron, pesaron y asignaron a tratamiento en el plazo de 12 h. Durante el procesamiento, los novillos castrados se identificaron con una etiqueta en la oreja individual, se pesaron individualmente, se vacunaron con Bovi-Shield Gold One Shot™ (IBR, BVD), Dectomax inyectable® (parasitocida interno y externo) y Somubac® (*complejo de enfermedad de Haemophilus somnus*). El BW en ayunas fue un peso individual recogido en el momento del procesamiento tras la llegada. Los novillos castrados se dividieron en bloques basándose en la fecha de llegada produciendo dos bloques. Dentro de los bloques, los novillos castrados se asignaron aleatoriamente a uno de los tres tratamientos clasificando por puerta cada dos novillos castrados a un redil; el redil se asignó entonces aleatoriamente al tratamiento. Los tratamientos incluyeron: un grupo de control (Control): sin complementación con la composición desvelada (OmniGen-AF® [OG] que comprende entre 15 % y 40 % de sílice, entre 50 % y 81 % de arcilla mineral, entre 1,0 % y 5,0 % de β-glucanos, entre 0,05 % y 3,0 % de β-1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1 % y 8,0 % de manano), complementado con OG a 4 g/cwt de BW durante 28 d (periodo de recepción); y complementado con OG a 4 g/cwt de BW durante 215 d (el periodo de alimentación completo). La complementación con OG para los grupos de tratamiento de tanto 28 d como 215 d se formuló y añadió a la administración diaria de la dieta antes de la alimentación. Se añadió aleatoriamente un noveno novillo castrado a los nueve rediles del grupo de control y el grupo de tratamiento que solo recibió OG durante 28 d durante el procesamiento del 2º bloque. Estos 18 novillos castrados (9 cabezas/grupo de tratamiento) permitirían que se utilizara la selección de un novillo castrado de cada uno de estos 18 para la porción exposición intravenosa a lipopolisacárido (LPS) del ensayo.

Al final del periodo de recepción de 28 d, los novillos castrados se alimentaron de forma limitada un periodo de 4 d al 2 % de BW para obtener un fin del BW del periodo de recepción. Al final del periodo de recepción de 28 d, OG ya no se complementó al grupo de novillos castrados dentro del grupo de tratamiento que solo recibió OG durante los 28 d del periodo de recepción; los novillos castrados dentro del otro grupo de tratamiento con OG (alimentados durante 215 d) continuaron recibiendo OG. La complementación con OG para el grupo de tratamiento restante se recalculó cada 30 d para suministrar 4 g/cwt de BW en promedio. Todos los novillos castrados fueron implantados con Revalor® XS al final del periodo de recepción. Durante los últimos 28 d del periodo de engorde, todo el ganado vacuno se complementó con la composición de ractopamina Optaflexx® a una tasa de 300 mg/cabeza/d. Al final del ensayo, los novillos castrados fueron transportados 51,5 km a un matadero comercial y se mantuvieron durante la noche. A la mañana siguiente, los novillos castrados se recogieron; momento en el que se registraron los pesos de la canal caliente (HCW). Tras un enfriamiento de 48 h, se determinaron el espesor de grasa, área de LM y puntuación de marmoleado de USDA. Se calcularon BW final, ADG y F:G usando HCW ajustado a un porcentaje de faenado patrón (63 %).

Para evaluar la respuesta inmunitaria, se realizaron dos exposiciones a LPS; una exposición subcutánea a LPS (novillos castrados del grupo de control y los alimentados con OG para el grupo de 215 d) y una exposición intravenosa a LPS (novillos castrados del grupo de control y los alimentados con OG para el grupo de 28 d). Para el LPS subcutáneo, se seleccionaron aleatoriamente tres rediles de los de control y los alimentados con OG del grupo de tratamiento de 215 d. De los rediles seleccionados, se seleccionaron aleatoriamente 6 novillos castrados/redil y se expusieron a LPS mediante inyección subcutánea en d 21. En d 21, los novillos castrados de rediles seleccionados se sacaron del redil y se trasladaron al establo de procesamiento. A medida que se procesó cada novillo castrado, se determinó el BW y se insertó una sonda rectal permanente. Después de determinar el BW, cada novillo castrado se expuso a una inyección subcutánea de LPS a una tasa de 0,5 µg/kg de BW y luego se devolvió al redil de la unidad de engorde. Para la exposición intravenosa a LPS, en d 25 del periodo de recepción, se seleccionaron aleatoriamente 18 novillos castrados (nuevos novillos castrados de Control y alimentados con OG para los grupos de tratamiento de 28 d) de los 9 de Control y 9 alimentados con OG para los rediles de 28 d que contuvieron 9 novillos castrados/redil. Los novillos castrados se identificaron y se trasladaron al establo de amarre. Después de un periodo de ajuste de 3 d, los novillos castrados se proveyeron de catéteres permanentes de la vena yugular para la extracción de sangre en serie y dispositivos de registro de la temperatura rectal (RT) permanentes, establecidos para grabar la RT a intervalos de 1 min continuamente durante todo el estudio de exposición inmunitaria. Después de la inserción del catéter yugular y la sonda RT, los novillos castrados se devolvieron a los establos de amarre individuales y se dejaron descansar durante el resto del d.

Al día siguiente, de 08:00 a 16:00 h, se recogieron muestras de sangre a intervalos de 30 min; dos h antes de la exposición (08:00 - 10:00 h) y seis h después de la exposición (10:00 - 16:00 h). A las 10:00 (0 h), tras la recogida de la muestra de sangre, los novillos castrados se administraron con una dosis i.v. de lipopolisacárido (LPS, 0,5 µg/kg de BW; purificado de O111:B4 de *E. coli*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se recogió una muestra de sangre final 24 h después de la exposición a LPS. En cada punto de recogida, se recogieron 9 ml de sangre mediante tubos Monovette que no contenían aditivo para suero. Después de la recogida, se dejó que las muestras de sangre coagularan durante 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 2.000 x g durante 30 min (39,2 °F (4 °C)). El suero se recogió y se transfirió a tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml y se guardaron a -112 °F (-80 °C) hasta que se analizaron. El suero se analizó para cortisol y citocinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral-α, TNF-α; interferón-γ, IFN-γ; e interleucina-6, IL-6).

Se analizaron los datos de rendimiento de la unidad de engorde como un diseño de bloques aleatorizados usando los procedimientos MIXED de SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Los novillos castrados se bloquearon por fecha de llegada y el redil fue la unidad experimental; el modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento y el bloque era un efecto aleatorio. Se analizaron los datos de respuestas inmunitarias como un diseño completamente aleatorizado con medidas repetidas usando los procedimientos MIXED de SAS; el modelo incluyó efectos fijos del tratamiento y del tiempo, se usó tratamiento x tiempo como el término de error para probar el efecto de la representación completa. Para tanto la unidad de engorde como los datos inmunitarios, cuando los resultados de la prueba de la F fueron significativos ($P < 0,05$), se compararon las medias de grupos usando la diferencia significativa mínima. Se evaluaron las diferencias emparejadas entre medias por mínimos cuadrados a diversos tiempos de muestra con la opción PDIF de SAS. Se analizó la distribución de los datos de los grados de calidad de USDA como un diseño de bloques aleatorizados usando el procedimiento Glimmix de SAS.

Resultados: Para la porción de recepción del ensayo, no hubo diferencia en BW inicial ($P = 0,82$), BW final ($P = 0,43$), ADG ($P = 0,32$), DMI ($P = 0,76$) y F:G ($P = 0,35$) entre los tres tratamientos (Tabla 2). En términos de morbilidad relacionada con las enfermedades respiratorias, no hubo diferencia ($P = 0,21$) en el % de novillos castrados tratados (Tabla 3). Tampoco hubo diferencia en el rendimiento de la unidad de engorde global; DMI ($P = 0,89$), ADG ($P = 0,66$) y F:G ($P = 0,90$) fueron similares a través de los tres tratamientos (Tabla 2). No hubo diferencia en BW final ($P = 0,59$), HCW ($P = 0,60$), área de LM ($P = 0,31$), puntuación de marmoleado ($P = 0,96$), espesor de grasa de la 12ª costilla ($P = 0,86$) o grado de rendimiento calculado ($P = 0,52$) entre los tres grupos de tratamiento. La distribución del grado de calidad de USDA se analizó a través de los tres tratamientos. No hubo diferencia en la cantidad de los grados de calidad USDA Óptima, USDA Preferida o USDA Selecta para los tres tratamientos (Tabla 3). Aunque no hubo diferencia estadística en términos del porcentaje de la clasificación de canales USDA Preferida o mayor, la significancia económica es todavía de mayor importancia. Los novillos castrados complementados con OG durante 215 d tuvieron una tasa de USDA Preferida que fue del 81,91 %, en comparación con 76,40 para los novillos castrados de control. Con un margen Preferida / Selecta de 13,58\$ (11 de diciembre de 2014), esta diferencia en Preferida entre los dos grupos de tratamiento es el equivalente de ~ 850\$ de diferencia en el valor de la canal.

Tabla 3. Periodo de recepción y rendimiento de la unidad de engorde global y calidad de la canal para novillos castrados alimentados sin OG (CON), con OG durante el periodo de recepción (OG-28), o OG durante 215 d (OG-215)

Grupos de tratamiento ¹	Con	OG-28	OG-215	EEM	Valor de P
Punto					
Rendimiento de recepción					
BW inicial (kg)	259	256	262	3,2	0,82
BW final (kg) ²	300	304	306	3,6	0,43
DMI (kg/d)	7,5	7,7	7,6	0,4	0,76
ADG (kg/d) ³	1,44	1,54	1,58	0,15	0,32
G:F ⁴	0,9	0,9	0,09	-	0,35
Morbilidad (%) ⁵	6,9	2,0	3,0	3	0,12
Rendimiento de la unidad de engorde					
BW inicial (kg)	261	572	572	6	0,87
BW final kg) ⁵	649	642	643	11	0,59
DMI (kg/d)	9,80	9,80	9,88	0,3	0,89
ADG (kg) ⁷	1,81	1,79	1,79	0,04	0,66
G:F	0,18	0,18	0,18	-	0,90
Calidad de la canal					
HCW (lbs) (kg)	409 (185,5)	405 (183,7)	405 (183,7)	3,2 (1,5)	0,96 (0,4)
Área de LM (in ²) (cm ²)	94,78 (611,5)	91,36 (589,4)	94,06 (606,8)	1,61 (10,4)	0,31 (2,0)
YG calculado	3,09	3,28	3,09	0,14	0,52
Grasa de la 12ª costilla (cm)	1,37	1,42	1,40	0,08	0,86
Marmoleado ⁸	503	498	508	24	0,96
Óptima (%)	4,49	2,13	5,32	2,32	0,53
Preferida (%)	76,40	76,60	81,91	4,50	0,59
Selecta (%)	19,10	21,28	13,83	4,22	0,41

¹ CON: Sin OG; OG-28: OG durante la recepción, OG: OG durante 215 d.

² Límite alimentado al 2 % de BW durante 4 d antes del BW individual para determinar el BW final del periodo de recepción

³ Calculado a partir del BW final del periodo de recepción

⁴ Analizado como G:F, el recíproco de F:G.

⁵ Porcentaje global de novillos castrados tratados para enfermedad respiratoria bovina

⁶Calculado a partir del peso de la canal, ajustado al 63 % de porcentaje de faenado común.

⁷ADG para el periodo de alimentación completo (incluyendo periodo de recepción)

⁸Puntuación de marmoleado: 400 = Pequeño, 500 = Modesto, etc.

Para la exposición subcutánea a LPS, hubo un efecto del tratamiento ($P = <0,001$) y del tiempo ($P = <0,001$) para RT (FIG. 13). Ambos grupos de tratamiento respondieron a la exposición subcutánea a LPS, logrando ambos grupos de tratamiento una RT máxima aproximadamente 5 h después de la exposición (Control = 40,10 °C frente a OG = 39,92 °C; FIG. 13). Además, ambos mantuvieron patrones similares ($P = 1,00$) durante toda la exposición subcutánea a LPS. Los novillos castrados en el grupo de tratamiento de control tuvieron una RT promedio que fue superior a la del grupo de tratamiento con OG (39,22 °C y 39,07 °C, respectivamente). No hubo efecto del tratamiento ($P = 0,75$) o interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,99$) para el cambio en RT desde el nivel inicial (FIG. 14). Nuevamente, hubo un efecto del tratamiento para RT ($P = <0,001$), pero esta diferencia de tratamiento no se observó cuando se comparó el cambio en RT desde el nivel inicial entre los grupos de tratamiento (el cambio promedio desde el nivel inicial fue 0,03 °C para Control y 0,03 °C para OG).

Para la porción de exposición intravenosa a LPS del ensayo, hubo un efecto del tratamiento ($P = 0,002$) y del tiempo ($P = <0,001$), sin embargo no hubo interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,99$) para RT (FIG. 15). Los novillos castrados complementados con OG tuvieron una mayor RT cuando se compararon con Control (39,26 °C frente a 39,17 °C, respectivamente) durante la exposición intravenosa. Esta RT promedio es muy similar a la RT que se observó para los novillos castrados que se utilizaron en la exposición subcutánea a LPS. En términos de respuesta a la exposición intravenosa a LPS, ambos grupos de tratamiento respondieron a la exposición a LPS similarmente ($P = 0,99$). Para ambos grupos de novillos castrados, se observó RT máxima 2,5 h después de la administración intravenosa de LPS, y en el plazo de 6 h, la RT había vuelto a las temperaturas iniciales (-21 a 0 h antes de la exposición: FIG. 15). Tampoco hubo efecto del tratamiento ($P = 0,49$) o interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,99$) para el cambio en RT desde el nivel inicial (-21 a 0 h: FIG. 16). Las temperaturas del nivel inicial fueron diferentes ($P < 0,001$) entre los dos grupos de tratamiento, pero el cambio desde el nivel inicial fue similar ($P = 0,49$) entre los novillos castrados de control y complementados con OG (FIG. 16).

Para las concentraciones en suero de cortisol, hubo un efecto del tratamiento ($P = 0,005$) y del tiempo ($P = <0,001$); aunque no hubo interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,99$). Los novillos castrados complementados con OG tuvieron concentraciones de cortisol reducidas, cuando se compararon con los novillos castrados CON (25,5 frente a 29,2 ng/ml, respectivamente; FIG. 17). En términos de respuesta a la exposición intravenosa a LPS, ambos grupos de tratamiento respondieron similarmente ($P = 0,99$). Antes de la exposición a LPS, ambos grupos de tratamiento tuvieron concentraciones de cortisol inferiores a 10 µg/ml. Treinta min después de la exposición a LPS, las concentraciones de cortisol habían aumentado ($P = < 0,001$) por encima de 35 µg/ml; las concentraciones de cortisol para ambos grupos de tratamiento no volvieron a las concentraciones iniciales hasta 24 h después de la exposición a LPS (FIG. 18).

Se analizaron nitrógeno ureico en la sangre (BUN), ácidos grasos no esterificados y glucosa para evaluar las alteraciones metabólicas durante la exposición intravenosa a LPS. Para BUN, hubo un efecto del tratamiento ($P = < 0,001$) y del tiempo ($P = < 0,001$), pero no hubo interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,99$). Los novillos castrados de control tuvieron una mayor ($P = < 0,001$) concentración de BUN cuando se compararon con los novillos castrados complementados con OG (FIG. 19). Esta diferencia en BUN se observó antes ($P = 0,01$) y después de la exposición a LPS ($P = < 0,001$). Independientemente de la exposición a LPS, las concentraciones de BUN de novillos castrados de control fueron en promedio 12,4 mg/ml mientras que las concentraciones de BUN de novillos de novillos castrados complementados con OG fueron en promedio 11,5 mg/ml (FIG. 19). Hubo un efecto del tratamiento ($P = 0,009$) y del tiempo ($P = < 0,001$) para concentraciones de glucosa; ninguna interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,19$). Las concentraciones de glucosa en suero fueron mayores ($P = < 0,001$) para novillos castrados complementados con OG, cuando se compararon con novillos castrados de control (76,4 mg/ml frente a 72,4 mg/ml, respectivamente; FIG. 20). Esta diferencia en glucosa no fue evidente antes de la exposición a LPS, ya que las concentraciones iniciales (-2 a 0 h) fueron similares (0,62; FIG. 21). Sin embargo, tras la exposición a LPS, aunque ambos grupos de tratamiento tuvieron una disminución en la glucosa en suero, esta reducción en glucosa fue mayor ($P = 0,009$) en los novillos castrados de control, cuando se compararon con los novillos castrados complementados con OG (FIG. 21). Antes de la exposición a LPS, ambos grupos de tratamiento mantuvieron concentraciones de glucosa en suero superiores a 75 mg/ml. Sin embargo, tras la exposición a LPS (1 h después de la exposición a LPS), las concentraciones de glucosa en suero empezaron a reducirse, y continuaron reduciéndose hasta 3,5 h después de las administraciones de la exposición a LPS (FIG. 21). Durante esta disminución en las concentraciones de glucosa, las concentraciones en los novillos castrados de control disminuyeron a un mayor grado que los novillos castrados complementados con OG. Aunque esta disminución de concentraciones de glucosa no produjo una interacción tratamiento x tiempo, esta disminución produjo una diferencia del tratamiento global entre los dos grupos de tratamiento (FIG. 21). Hubo un efecto del tratamiento ($P = < 0,001$) y del tiempo ($P = < 0,001$), y una tendencia a una interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,007$) para concentraciones de NEFA en suero. Los novillos castrados dentro del grupo de tratamiento de control tuvieron mayores ($P = < 0,001$) concentraciones de NEFA en suero, cuando se compararon con novillos castrados complementados con OG (FIG. 22). Esta diferencia en las concentraciones de NEFA estuvo presente antes ($P = 0,006$) de la exposición intravenosa a LPS. Sin embargo, tras la exposición a LPS, estas diferencias fueron incluso mayores ($P = < 0,001$; FIG. 22). Antes de la exposición a LPS, las concentraciones de NEFA para novillos castrados de control fueron 0,10 mmol/ml aunque los novillos castrados

complementados con OG fueron 0,07. Sin embargo, tras la exposición a LPS, las concentraciones de NEFA en los novillos castrados de control aumentaron a 0,23 mmol/ml mientras que los novillos castrados complementados con OG solo aumentaron a 0,11 mmol/ml.

Hubo un efecto del tratamiento ($P = < 0,001$) y del tiempo ($P = < 0,001$) para la citocina pro-inflamatoria IFN- γ ; no hubo interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,77$). Los novillos castrados complementados con OG tuvieron una mayor producción de IFN- γ , cuando se compararon con los novillos castrados de control (FIG. 23). Antes ($P = 0,05$) y después ($P = < 0,001$) de la exposición a LPS, las concentraciones de IFN- γ fueron mayores en los novillos castrados complementados con OG, cuando se compararon con los novillos castrados de control (FIG. 23). También hubo un efecto del tratamiento ($P = 0,03$) y del tiempo ($P = < 0,001$) para TNF- α ; no hubo interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,42$). Las concentraciones globales en suero para TNF- α fueron mayores ($P = 0,03$) en los novillos castrados complementados con OG, cuando se compararon con los novillos castrados de control (FIG. 24). Para ambos grupos de tratamiento, antes de la exposición a LPS, no estuvieron presentes concentraciones detectables de TNF- α , y estas concentraciones no detectables continuaron hasta 0,5 h después de la exposición (FIG. 25). A 0,5 h, las concentraciones de TNF- α aumentaron espectacularmente ($P = < 0,001$) para ambos grupos de tratamiento. Las concentraciones de TNF- α volvieron a casi el nivel inicial (-2 a 0 h) aproximadamente 4 h después de la exposición a LPS (FIG. 25). Hubo solo un efecto del tiempo ($P = < 0,001$) para la citocina pro-inflamatoria IL-6 (FIG. 26). Al igual que con TNF- α , antes de la exposición a LPS, las concentraciones de IL-6 no fueron detectables. Sin embargo, 1 h después de la exposición a LPS, las concentraciones de IL-6 aumentaron espectacularmente ($P = < 0,001$); alcanzando concentraciones máximas 2 h después de la exposición a LPS. De 1 a 8 h después de la exposición a LPS, las concentraciones de IL-6 siguieron elevadas por encima de las concentraciones iniciales, y no volvieron a las concentraciones iniciales hasta 24 h después de la exposición a LPS (FIG. 26).

El análisis del hemograma completo medio (CBC) se informa en la Tabla 4. La complementación con OG no afectó los números de eritrocitos ($P = 0,45$) o el porcentaje de monocitos ($P = 0,26$). Las concentraciones de hemoglobina ($P = 0,008$), % de hematocrito ($P = 0,03$) y concentración de glóbulos blancos ($P = 0,001$) fueron mayores ($P = 0,008$) en novillos castrados de control, cuando se compararon con novillos castrados complementados con OG. El % de neutrófilos ($P = 0,04$) y la concentración de eosinófilos ($P = 0,02$) fueron mayores en novillos castrados complementados con OG, cuando se compararon con novillos castrados de control. Para el % de linfocitos, hubo una interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,006$). Antes de la exposición a LPS (-2 a 0 h), los novillos castrados de control tuvieron una mayor ($P = < 0,001$) concentración de linfocitos en comparación con los novillos castrados complementados con OG (FIG. 27). Una h después de la exposición, no hubo diferencia ($P = 0,35$) entre los grupos de tratamiento, y de 1 h a 8 h, no hubo diferencia ($P = 0,66$). Sin embargo, 24 h después de la exposición a LPS, los novillos castrados de control tuvieron una mayor ($P = 0,005$) concentración de linfocitos (FIG. 27). También hubo una interacción tratamiento x tiempo ($P = 0,006$) para la relación neutrófilos:linfocitos. Antes de la exposición a LPS, la relación neutrófilos:linfocitos era mayor ($P = < 0,001$) para novillos castrados con OmniGen, cuando se compararon con novillos castrados de control (FIG. 28).

Tabla 4. Valores del hemograma completo medio de novillos castrados recién recibidos complementados con OmniGen-AF a una tasa de 4 mg/cwt durante el periodo de recepción (OMN-28) o sin OmniGen - AF (CON) durante una exposición a lipopolisacáridos

Variables	OmniGen	Control	EEM	Valor de p		
				TRT	TIEMPO	TxT
Glóbulos rojos (mil/ μ l)	8,46	8,47	0,30	0,45	0,41	0,99
Hemoglobina (g/dl)	10,61	10,97	0,09	0,008	0,18	0,99
Hematocrito (%)	31,06	32,29	0,38	0,03	0,46	0,99
Glóbulos blancos (K/ μ l)	4,47	5,42	0,12	0,001	<0,001	0,88
Neutrófilos (%)	0,43	0,26	0,05	0,04	<0,001	0,34
Linfocitos (%)	3,02	3,63	0,09	<0,001	<0,001	0,006
Monocitos (%)	1,06	1,14	0,20	0,26	<0,001	0,23
Eosinófilos (K/ μ l)	0,07	0,04	0,005	0,02	0,76	0,76
Neutrófilos:Linfocitos	0,14	0,09	0,016	0,01	<0,001	0,006

Conclusiones: En este estudio, los novillos castrados estabulados recién recibidos complementados con OG durante un periodo de 28 d (periodo de recepción) o durante 215 d (periodo de alimentación completo) no afectaron el rendimiento de la unidad de engorde o la calidad de la canal. Aunque no hubo diferencia estadística en términos del porcentaje de canales que se clasificaron USDA Preferida o mayor, la significancia económica debe sopesar la falta de una diferencia estadística. Con un margen Elección / Preferida de \$13,58 (11 de diciembre de 2014), esta diferencia en Elección entre los dos grupos de tratamiento es el equivalente de -850\$ en el valor de la canal. Además, la complementación con OG altera la respuesta inmunitaria. Cuando se expone a lipopolisacárido, la complementación con OG parece sensibilizar la respuesta pro-inflamatoria (como es evidente por el aumento de las concentraciones de IFN- γ y TNF- α). Además, hubo una diferencia en el metabolismo que se observó. El aumento de las concentraciones de BUN y NEFA dentro de los novillos castrados de control indica una posible mayor necesidad de energía para iniciar y sostener una respuesta inmunitaria, cuando se compara con los novillos castrados complementados con OG. Este aumento en mayor demanda de energía se indica además ya que los novillos castrados complementados con OG tuvieron mayores concentraciones de glucosa en suero, cuando se compararon

con los novillos castrados de control. En general, estos resultados sugieren que la complementación con OG puede potenciar la respuesta inmunitaria de novillos castrados estabulados tras la entrada en la unidad de engorde.

Ejemplo 5

Se realizó un estudio para identificar genes expresados por células inmunitarias circulantes que están regulados por una realización comercial de la composición I. Se asignaron aleatoriamente ratas (n=6 por grupo) a la composición I y grupos de control. La composición I se complementó en la dieta al 0,5 % en el grupo de composición I. Se purificó ARN total de sangre completa y se analizó la expresión génica con el uso de la matriz de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Rat Innate and Adaptive Immune Responses RT2 Profiler (SABiosciences, Qiagen). Estuvieron presentes un total de 84 genes diana en la matriz. Se analizó la expresión génica de células inmunitarias circulantes siete, catorce, veintiún y veintiocho días desde la complementación de la composición I. La expresión de 67 genes cambió tras la complementación de la composición I a través de los momentos de tiempo. La Tabla 5 enumera los genes con expresión génica alterada tras la complementación de la composición I e incluye información que indica estimulación (+) o represión (-) de la expresión génica.

Tabla 5

Gen	Reprimido	Gen	Inducido	Genes de referencia
Crp	-	Ifnb1	+	Actb
Mbl2	-	Cd80	+	Ldha
Apcs	-	Tlr1	+	Rplp1
Il5	-	Tlr6	+	
Ifna1	-	Mapk8	+	
Ccl12	-	Nod2	+	
Csf2	-	Ccr8	+	
Il13	-	Irak1	+	
Il10	-	Cd1d1	+	
Gata3	-	Stat4	+	
Stat3	-	Il1r1	+	
C3	-	Faslg	+	
Tlr3	-	Irf3	+	
Ccl5	-	Ifnar1	+	
Mx2	-	Slc11a1	+	
Nfkb1	-	Tlr4	+	
Nfkb1a	-	Cd86	+	
Tlr9	-	Casp1	+	
Cxcl10	-	Ccr5	+	
Cd4	-	Icam1	+	
Il6	-	Camp	+	
Ccl3	-	Tlr7	+	
Ccr6	-	Irf7	+	
Cd40	-	Rorc	+	
Ddx58	-	Cd40lg	+	
1118	-	Tbx21	+	
Jun	-	Casp8	+	
Tnf	-	Il23a	+	
Traf6	-	Cd14	+	
Stat1	-	Cd8a	+	
		Cxcr3	+	
		Foxp3	+	
		Lbp	+	
		Mapk1	+	
		Myd88	+	
		Stat6	+	
		Agrin	+	
		IL33	+	

Ejemplo 6

La alimentación de OmniGen-AF® (composición I u OG; Prince Agri Products, Inc., Quincy, IL), un producto registrado de marca, al 0,5 % de la dieta soporta la función inmunitaria en ganado rumiante. El perfilado dirigido de genes inmunoasociados en sangre completa es una metodología establecida para evaluar la eficacia de los aditivos del pienso con propiedades que alteran la inmunidad. Los presentes inventores supusieron que puede requerirse la tasa de inclusión diaria de OG más alta del 0,5 % para optimizar la función inmunitaria. El objetivo de este estudio

era evaluar el efecto de la tasa de inclusión de OG dietética (1 % frente al 0,5 %) en el perfil de expresión de genes asociados con la inmunidad. Ratas CD macho (5/tratamiento) que pesaban 180-200 gramos tuvieron un acceso voluntario a una dieta con 0 (control), 0,5 (1×) o 1 % (2×) de OmniGen-AF® durante 28 días. Al final del periodo de alimentación, se recogió sangre completa. Se purificó ARN de muestras de sangre completa y se usó para generar ADNc que actuó de molde en la matriz de PCR *Rat Innate and Adaptive Immune Responses* RT² Profiler (SABiosciences). Usando PROC GLM, los presentes inventores compararon la abundancia de ADNc de genes asociados a la inmunidad entre grupos de control y complementados (0,5 o 1 %) con un valor de corte $P < 0,05$ para significancia. De los 79 genes asociados a la inmunidad que se expresaron por encima del límite de detección en todas las muestras, 16 (7 regulados por incremento) y 13 genes (8 regulados por incremento) se alteraron con el 0,5 % y 1 % de complementación con OG, la mayoría de los cuales (11 con 6 regulados por incremento) se alteraron a ambas tasas de inclusión de OG. Los genes que se regularon por incremento a ambas tasas incluyen IL13 (0,5 %: +3,16, 1 %: +3,70 veces de cambio), IL5 (0,5 %: +2,64, 1 %: +2,62), Irak1 (0,5 %: +2,50, 1 %: +1,98), Nod2 (0,5 %: +1,83, 1 %: +2,02), IFN α 1 (0,5 %: +1,81, 1 %: +2,10) y Cd80 (0,5 %: +1,77, 1 %: +2,47). Genes que se regularon por disminución a ambas tasas de inclusión incluyen TLR3 (0,5 %: -2,22, 1 %: -2,39), CxCL10 (0,5 %: -2,19, 1 %: -2,26), STAT1 (0,5 %: -2,07, 1 %: -1,99), STAT3 (0,5 %: -2,05, 1 %: -1,92) y NF κ b1 (0,5 %: -1,84, 1 %: -1,75). En conclusión, los presentes resultados sugieren que la tasa de inclusión de complementación con OG promueve independientemente la función inmunitaria a través de diversas vías que incluyen reconocimiento de patógenos, activación celular inmunitaria adaptativa, y diversos factores de transcripción.

Ejemplo 7

OmniGen-AF® (composición I u OG; Prince Agri Products, Inc., Quincy, IL) es un producto registrado de marca conocido por aumentar la función inmunitaria en rumiantes y otras especies. El perfilado dirigido de genes inmunoasociados en sangre completa es una plataforma eficaz para la identificación de múltiples marcadores de respuesta inmunitaria a aditivos del pienso con propiedades que alteran la inmunidad. El objetivo de este estudio era identificar múltiples marcadores de respuesta inmunitaria que son elevados por OG dietético a través de un periodo de complementación de 28 d. Los presentes inventores supusieron que varios genes asociados con la inmunidad en sangre completa eran coherentemente regulados por incremento durante un periodo de complementación de 28 d. Catorce ratas CD macho que pesaban 180-200 gramos tuvieron un acceso voluntario a una dieta que contenía 0 (control; n=5, solo 28 días) o 0,5 % de OG durante 7 (n=4) o 28 días (n=5). Se recogió sangre completa al final del periodo de alimentación. Se purificó ARN de muestras de sangre completa y se usó para generar ADNc que actuó de molde en la matriz de PCR *Rat Innate and Adaptive Immune Responses* RT² Profiler (SABiosciences). Usando PROC GLM, los presentes inventores compararon la abundancia de ADNc de genes asociados a la inmunidad entre grupos de control y complementados (7 o 28 d) con un valor de corte de $P < 0,05$ para significancia. De los 77 genes asociados a la inmunidad que se expresaron por encima del límite de detección en todas las muestras, 6 genes se regularon por incremento después de 7 d de complementación con OG y 4 genes se regularon por incremento después de 28 d de complementación con OG. Tres genes se regularon por incremento después de 7 d (Cd80: +2,40; Irak1: +2,25; Nod2: +2,08 veces de cambio), además de después de 28 d de complementación con OG (Cd80: +1,77; Irak1: +2,50; Nod2: +1,83 veces de cambio). En conclusión, los presentes resultados sugieren Cd80, Irak1 y Nod2 como marcadores de respuesta inmunitaria que son elevados por el OG dietético a través de un periodo de complementación de 28 d.

Ejemplo 8

Este estudio se diseñó para determinar el efecto de complementar los novillos castrados de la unidad de engorde con OmniGen-AF (composición I) en la respuesta de fase aguda a una exposición a lipopolisacárido (LPS). Los novillos castrados (n=18; 270 $\pm$ 5 kg de BW) se separaron en dos grupos de tratamiento (n=9/tratamiento): un grupo se alimentó con una dieta de recepción estándar (Control, Cont) y el otro grupo se alimentó con la misma dieta de recepción complementada con OmniGen-AF a 4 g/45,4 kg de BW durante 29 d (OmniGen-AF). En d27, los novillos castrados se proveyeron de cánulas yugulares permanentes y dispositivos de monitorización de la temperatura rectal (RT) y se pusieron en establos individuales. En d28, los novillos castrados se expusieron i.v. a LPS (0,5 μ g/kg de BW a 0 h). Se recogieron las puntuaciones del comportamiento de enfermedad (SBS) y dos muestras de sangre completa a intervalos de 30 min desde -2 a 8 h con respecto a la exposición a 0 h. Se recogió un vacutainer que contiene EDTA para el análisis de hemograma completo (CBC), y se recogió el segundo en tubo de suero Monovette de 9 ml; después de la recogida, el suero se aisló y se guardó a -80 °C hasta que se analizó para concentraciones de cortisol y citocina. La temperatura rectal, SBS y cortisol estuvieron afectados por el tiempo ($P < 0,001$). Antes de la exposición, RT fue mayor ($P < 0,001$) en los novillos castrados Cont (39,31 $\pm$ 0,03 °C) que en los novillos castrados con OmniGen-AF (39,14 $\pm$ 0,03 °C). Por tanto, tras la exposición se analizó la RT como el cambio en la respuesta desde los valores del nivel inicial. El cambio en RT con respecto a los valores del nivel inicial aumentó ($P < 0,001$) en ambos grupos en respuesta a la exposición a LPS, pero no estuvo afectado mediante el tratamiento ($P = 0,49$). Las puntuaciones del comportamiento de enfermedad aumentaron ($P < 0,001$) después de la exposición a LPS y tendieron ($P = 0,09$) a ser mayores en los novillos castrados de Control (1,57 $\pm$ 0,02) que en OmniGen-AF (1,51 $\pm$ 0,02). Las concentraciones de cortisol estuvieron afectadas por el tratamiento ($P = 0,005$) y tiempo ($P < 0,001$). Para ambos grupos, el cortisol aumentó ($P < 0,001$) en respuesta a la exposición a LPS. El cortisol fue mayor en los novillos castrados Cont (25,2 $\pm$ 0,9 ng/ml) que en OmniGen-AF (25,5 $\pm$ 0,9 ng/ml). Las concentraciones de glóbulos blancos y de linfocitos fueron mayores ($P \leq 0,004$) en novillos castrados Cont que en OmniGen-AF durante todo el

estudio. Disminuyeron los neutrófilos ($P = 0,04$) en novillos castrados Cont ($0,7 \pm 0,2$ K/ul) en comparación con novillos castrados OmniGen-AF ($1,3 \pm 0,2$ K/ul) antes de la exposición a LPS. Hubo un efecto del tratamiento ($P \leq 0,02$) y del tiempo ($P < 0,001$) para el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) e interferón- γ (IFN γ). Específicamente, aumentaron las concentraciones de TNF α y IFN γ ($P < 0,001$) en respuesta a la exposición a LPS. Además, disminuyeron las concentraciones de TNF α e IFN γ en ($P \leq 0,02$) en novillos castrados Cont en comparación con novillos castrados OmniGen-AF. Estos datos sugieren que la complementación con OmniGen-AF sirvió para sensibilizar el sistema inmunitario antes de la exposición a LPS, permitiendo una respuesta potenciada a la exposición a LPS.

10 **Ejemplo 9**

El uso de complementos de pienso probióticos para potenciar la salud animal y el crecimiento son de gran interés para la industria de la carne de vacuno. Estudios han demostrado que algunos complementos probióticos pueden afectar el metabolismo y, por tanto, influyen en una respuesta del animal a una exposición inmunitaria. Este estudio se diseñó para determinar el efecto de complementar novillos castrados de la unidad de engorde con OmniGen-AF (composición I) durante el periodo de recepción sobre la respuesta metabólica a una exposición a lipopolisacárido (LPS). Se obtuvieron y transportaron los novillos castrados ($n = 18$; 270 ± 5 kg de BW) a la unidad de engorde. Tras la llegada, los novillos castrados se procesaron y separaron en 2 grupos de tratamiento ($n = 9$ /tratamiento): un grupo se alimentó con una dieta de recepción estándar (Control; Cont) y el otro grupo se alimentó con la misma dieta de recepción complementada con OmniGen-AF a 4 g/45,4 kg de BW/d durante 29 d (OmniGen-AF). En d 27 los novillos castrados se proveyeron de cánulas yugulares permanentes y se pusieron en establos individuales. En el d 28, los novillos castrados se expusieron i.v. a LPS ($0,5 \mu\text{g/kg}$ de BW a 0 h) y se recogieron muestras de sangre a intervalos de 30 min desde -2 a 8 h y 24 h después de la exposición. Se aisló el suero y se guardó a -80°C hasta que se analizó para concentraciones de glucosa, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y nitrógeno ureico en la sangre (BUN). Las concentraciones de glucosa fueron afectadas mediante el tratamiento ($P = 0,009$) y tiempo ($P < 0,001$). La glucosa fue mayor en novillos castrados OmniGen-AF en comparación con novillos castrados Cont ($76,4 \pm 1,1$ mg/dl frente a $72,4 \pm 1,0$ mg/dl). Para concentraciones de NEFA, hubo un efecto del tratamiento ($P < 0,001$) y tiempo ($P < 0,001$). Específicamente, novillos castrados Cont ($0,210 \pm 0,007$ mmol/l) tuvieron mayores concentraciones de NEFA que novillos castrados OmniGen-AF ($0,101 \pm 0,010$ mmol/l). Hubo una tendencia ($P = 0,07$) para una interacción tratamiento x tiempo de forma que las concentraciones de NEFA fueron mayores ($P \leq 0,03$) en novillos castrados Cont que novillos castrados OmniGen-AF de 3 a 8 h después de la exposición a LPS. Para BUN, hubo un efecto del tratamiento ($P < 0,001$) de forma que las concentraciones fueron mayores en novillos castrados Cont ($12,4 \pm 0,1$ mg/dl) que novillos castrados complementados con OmniGen-AF ($11,5 \pm 0,1$ mg/dl) durante todo el estudio, y no estuvieron afectados por el tiempo ($P = 0,28$). Estos datos sugieren que la complementación de OmniGen-AF modula la respuesta metabólica a una exposición a LPS y proporciona una indicación de que la complementación de novillos castrados de la unidad de engorde con OmniGen-AF puede prevenir la rotura de otros sustratos (por ejemplo, proteína y grasa) para energía durante una exposición inmunitaria.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende glucano, sílice, arcilla mineral y manano para su uso en un método de promoción de la reducción del estrés inducido por el calor en un animal que tiene o está en riesgo de desarrollar estrés inducido por el calor, en la que administrar la composición al animal durante un periodo de tiempo eficaz promueve la reducción del estrés inducido por el calor.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición comprende entre 15 % y 40 % de sílice, entre 50 % y 81 % de arcilla mineral, entre 1,0 % y 5,0 % de β -glucanos y entre 1 % y 8,0 % de manano.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición comprende además una endoglucanohidrolasa.
4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en la que la composición consiste esencialmente en entre 15 % y 40 % de sílice, entre 50 % y 81 % de arcilla mineral, entre 1,0 % y 5,0 % de β -glucanos, entre 0,05 % y 3,0 % de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1 % y 8,0 % de manano.
5. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el animal es una especie de mamífero o una especie aviar, opcionalmente un perro, gato, conejo, oveja, cabra, vaca, reno, bisonte, búfalo, llama, caballo, burro, cerdo, pollo, pavo, ganso, pato, gallina de Cornualles, perdiz, faisán, gallina de Guinea, avestruz, emú, cisne o paloma.
6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el animal está inmunodeprimido antes de la administración de la composición.
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición se administra al animal a intervalos fijos durante el periodo de tiempo eficaz, en una cantidad de 1 mg/kg de peso corporal por día a 20 g/kg de peso corporal por día, opcionalmente en la que el periodo de tiempo eficaz es al menos 1 día, al menos 3 días, o de un día a 200 días.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición se administra al animal cuando un índice de temperatura-humedad es, o se espera que sea, superior a 68, superior a 75 o ≥ 79 ; opcionalmente en la que:
 - (i) una cantidad de la composición administrada al animal aumenta si se espera que aumente el índice de temperatura-humedad; o
 - (ii) una cantidad de la composición administrada al animal disminuye si se espera que disminuya el índice de temperatura-humedad.
9. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el animal se administra con una cantidad de la composición eficaz para alterar un indicador de estrés por calor en comparación con un animal que no ha sido administrado con la composición, opcionalmente en la que el indicador de estrés por calor es el consumo de alimentos, consumo de agua, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, rendimiento de la leche, grasa de la leche, proteína de la leche, un biomarcador inmunitario, o cualquier combinación de los mismos.
10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que:
 - (a) se mide el indicador de estrés por calor; y se selecciona una cantidad de la composición administrada al animal basándose al menos en parte en la medición del indicador de estrés por calor; o
 - (b) se administra diariamente una primera cantidad de la composición al animal durante un primer periodo de tiempo; se mide el indicador de estrés por calor; y se administra diariamente una cantidad ajustada de la composición al animal durante un periodo de tiempo posterior, en la que la cantidad ajustada se basa al menos en parte en la medición del indicador de estrés por calor.
11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el animal es una vaca.
12. La composición para el uso de la reivindicación 11, en la que la vaca es una vaca lechera y la composición se administra a la vaca lechera antes de la aparición de la lactancia, opcionalmente
 - (i) en la que la composición se administra a la vaca lechera durante un periodo de 100 días antes de la aparición de la lactancia a 1 día antes de la aparición de la lactancia; y/o
 - (ii) en la que la composición se administra a la vaca lechera durante la lactancia.

13. La composición para el uso de la reivindicación 11 o 12, en la que

(i) la vaca es una vaca lechera y la composición se administra a la vaca lechera después de la aparición de la lactancia; y/o

(ii) la composición se administra a la vaca durante 40 días a 100 días después de parir.

14. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el animal se administra con un proceso terapéutico para aliviar el estrés por calor, un agente terapéutico para tratar el estrés por calor, o una combinación de los mismos, opcionalmente

en la que el proceso terapéutico o agente terapéutico es provisión de sombra al animal, uso de un rociador de agua para administrar externamente agua al animal, uso de un ventilador para proporcionar movimiento del aire, adición de grasas de derivación al pienso para el animal, meloxicam, un corticosteroide, una composición que comprende uno o más electrolitos, un agente alcalinizante, un microbiano de alimentación directa, o una combinación de los mismos.

15. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que:

(a) la composición se administra a un grupo de animales que tienen o están en riesgo de desarrollar estrés inducido por el calor durante un primer periodo de tiempo;

se mide posteriormente un indicador de estrés por calor de al menos un animal del grupo de animales; y se administra una cantidad ajustada de la composición al grupo de animales durante un periodo de tiempo posterior, en la que la cantidad ajustada se basa al menos en parte en la medición del indicador de estrés por calor;

o

(b) se evalúa al menos un indicador de estrés por calor de animales individuales en un grupo de animales; se hace una determinación de si uno o más de los animales individuales está sufriendo o no estrés por calor; y se administra la composición al uno o más animales individuales que están sufriendo estrés por calor.

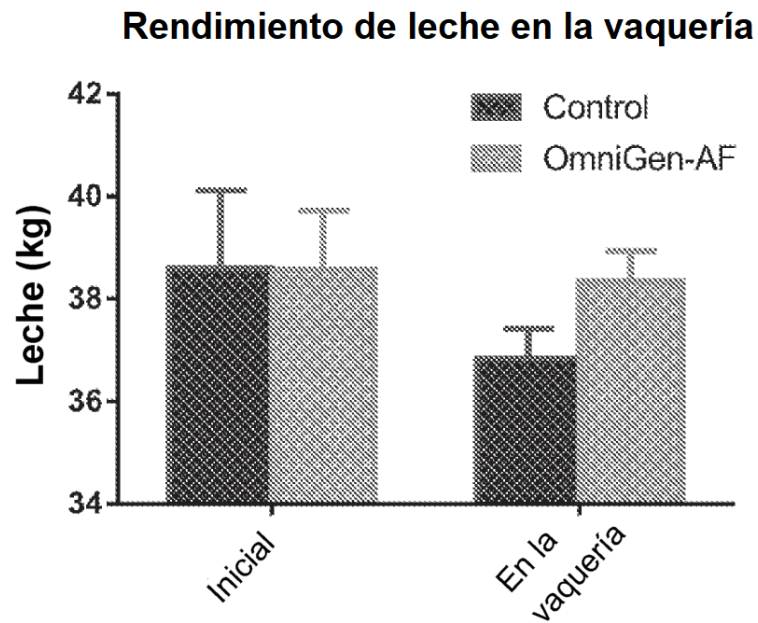


FIG. 1

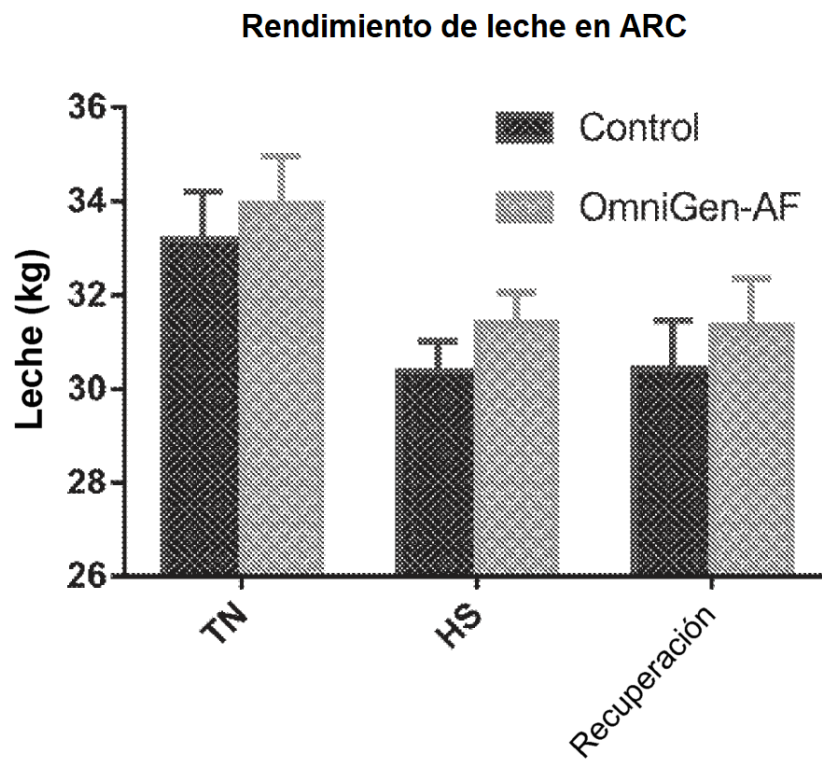


FIG. 2

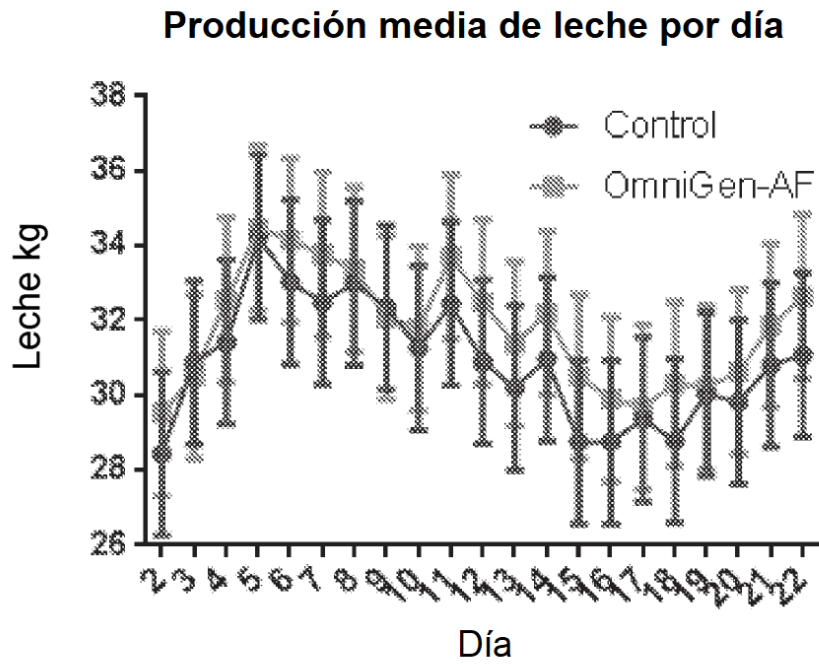


FIG. 3

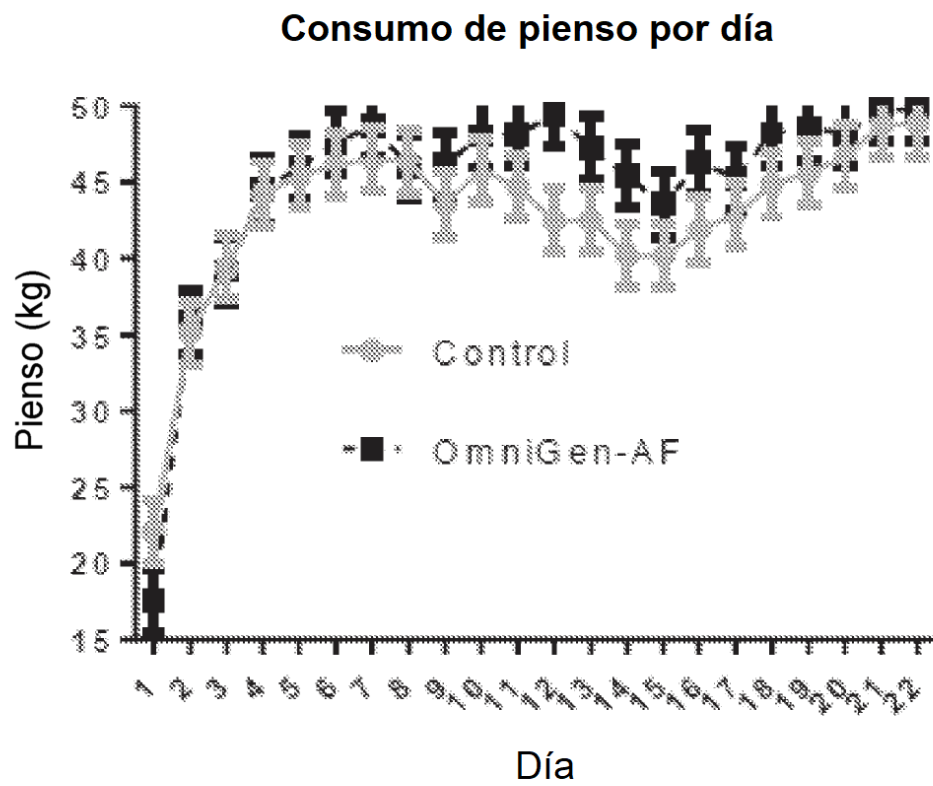
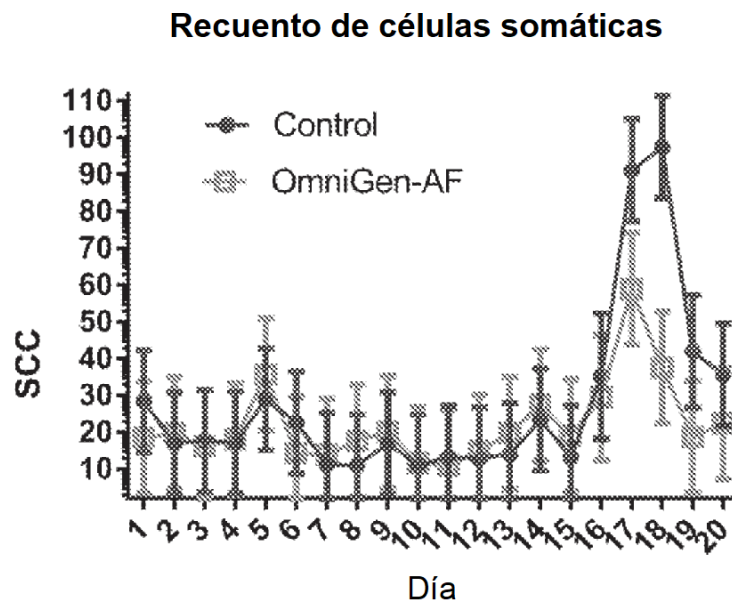
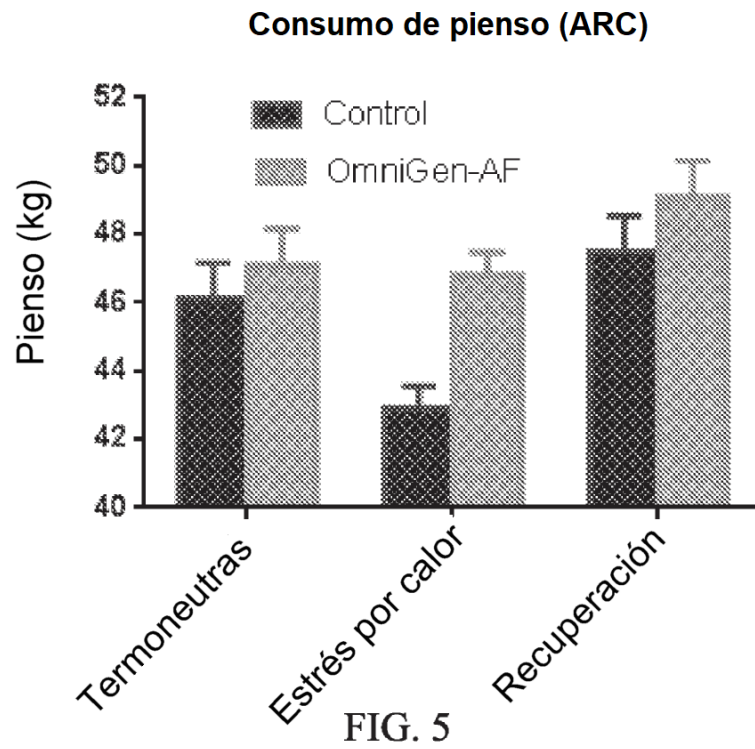
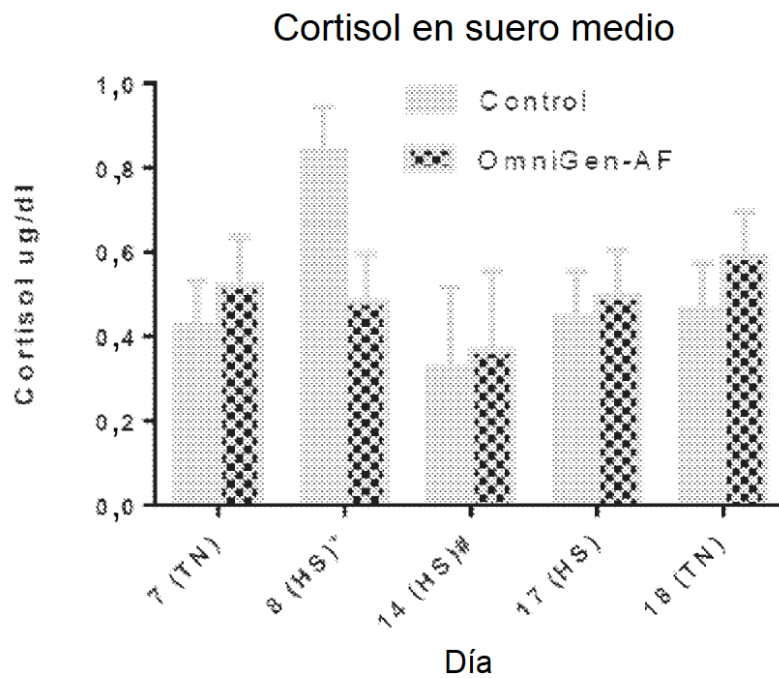


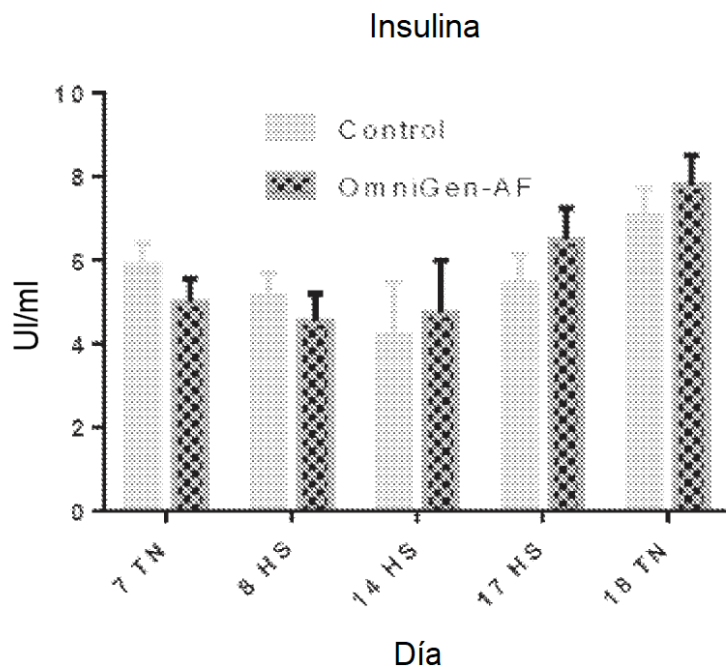
FIG. 4





El día 14 es el momento de tiempo individual a 20:00 h

FIG. 7



El día 14 es el momento de tiempo individual a 20:00 h

FIG. 8

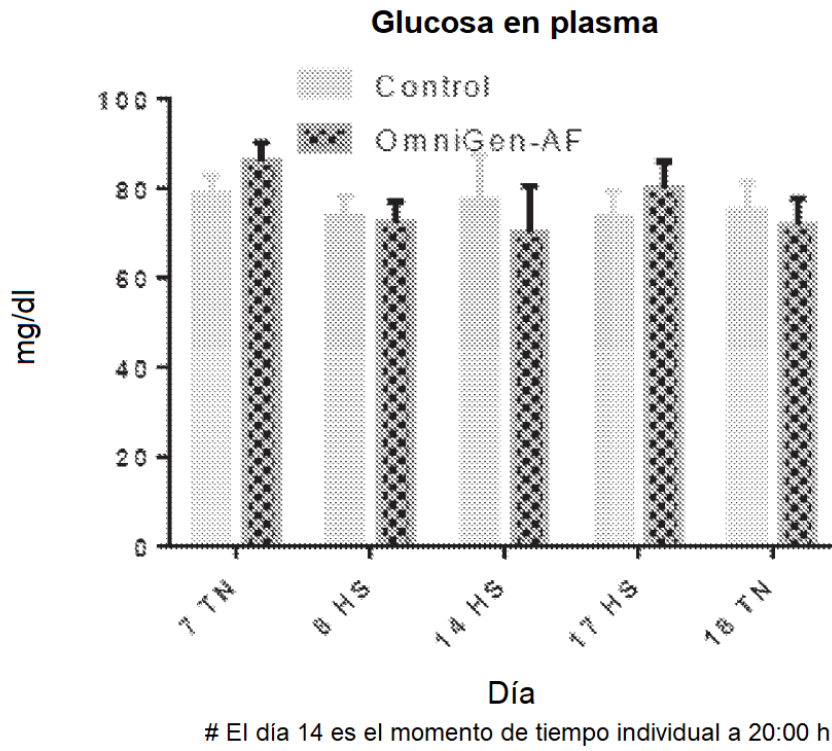


FIG. 9

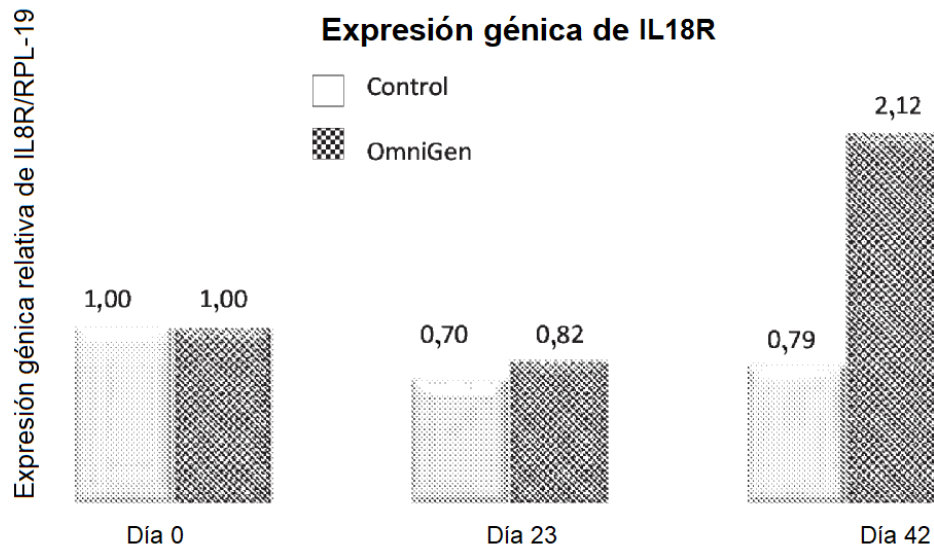


FIG. 10

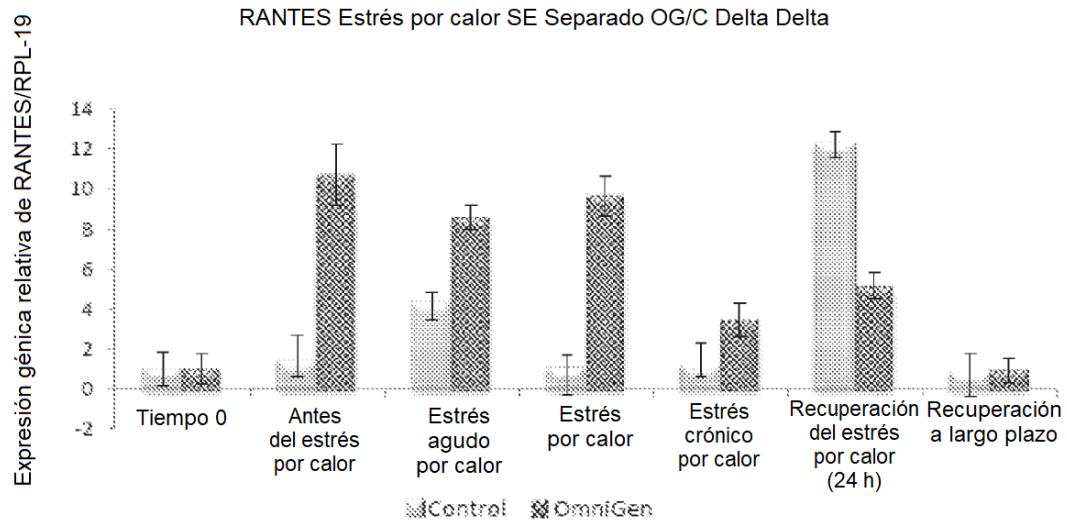


FIG. 11

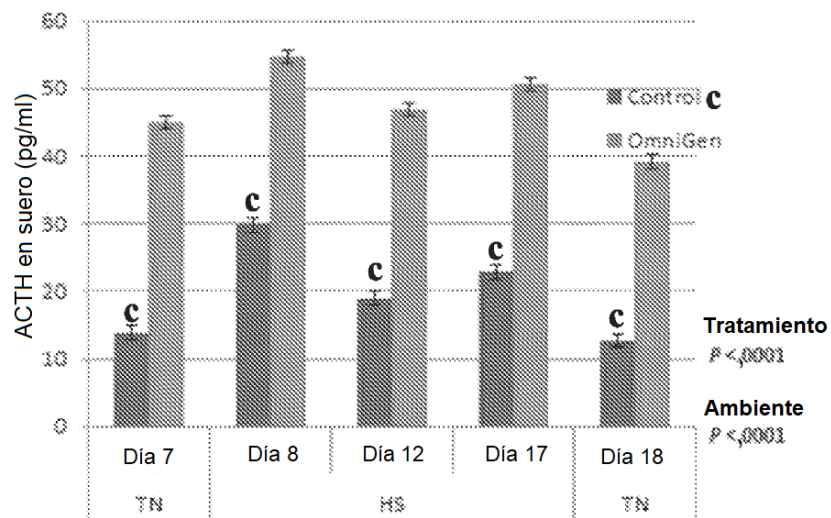


FIG. 12

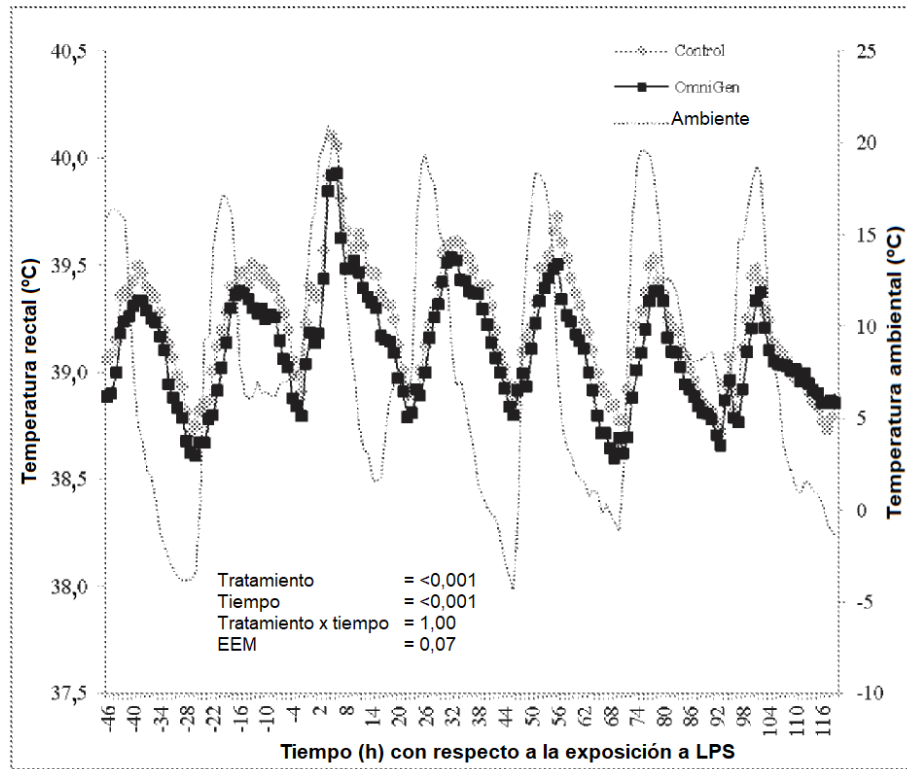


FIG. 13

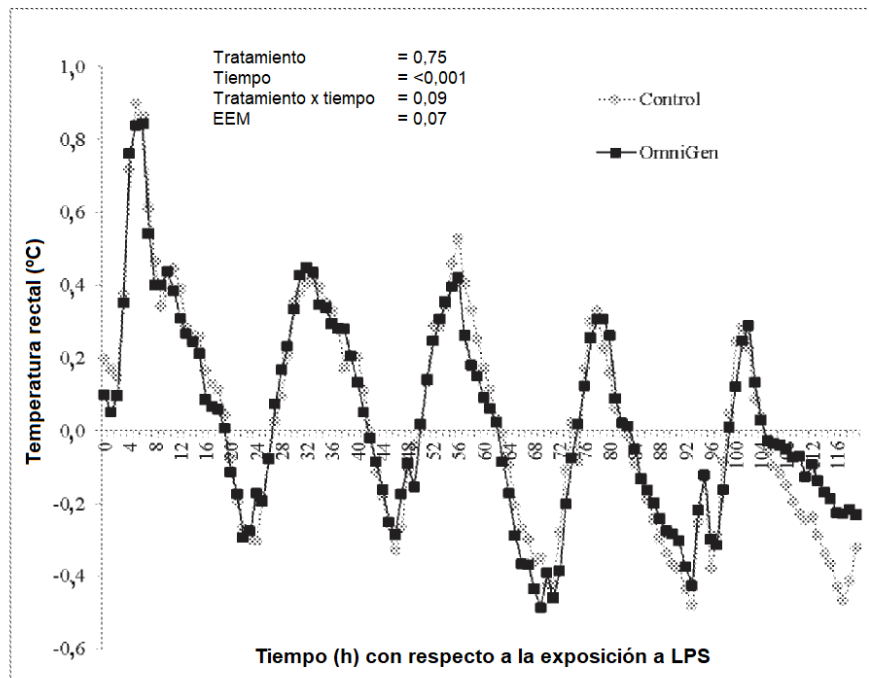


FIG. 14

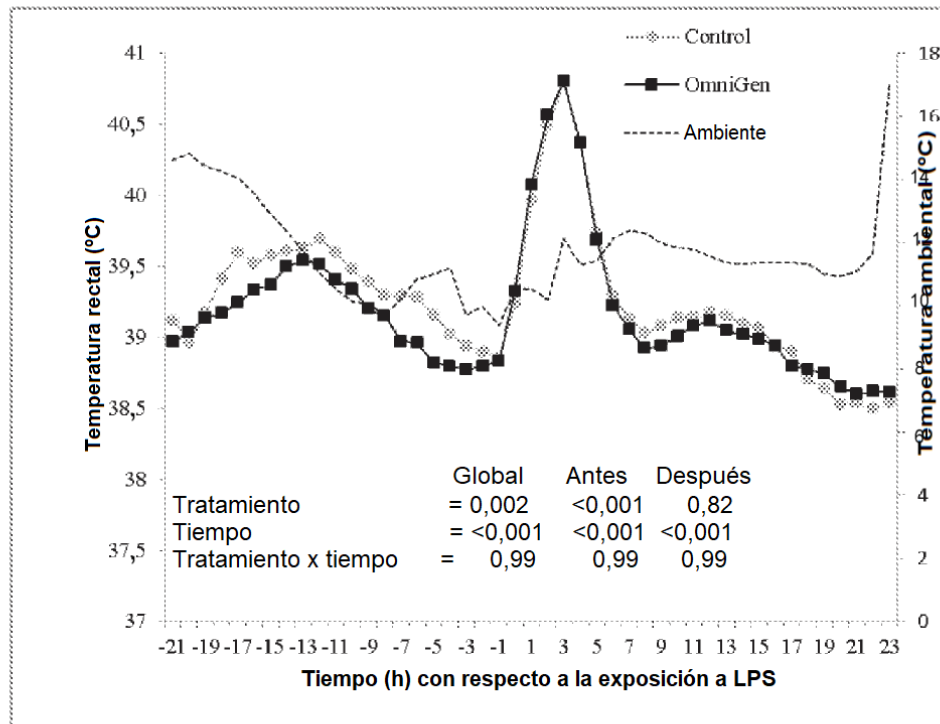


FIG. 15

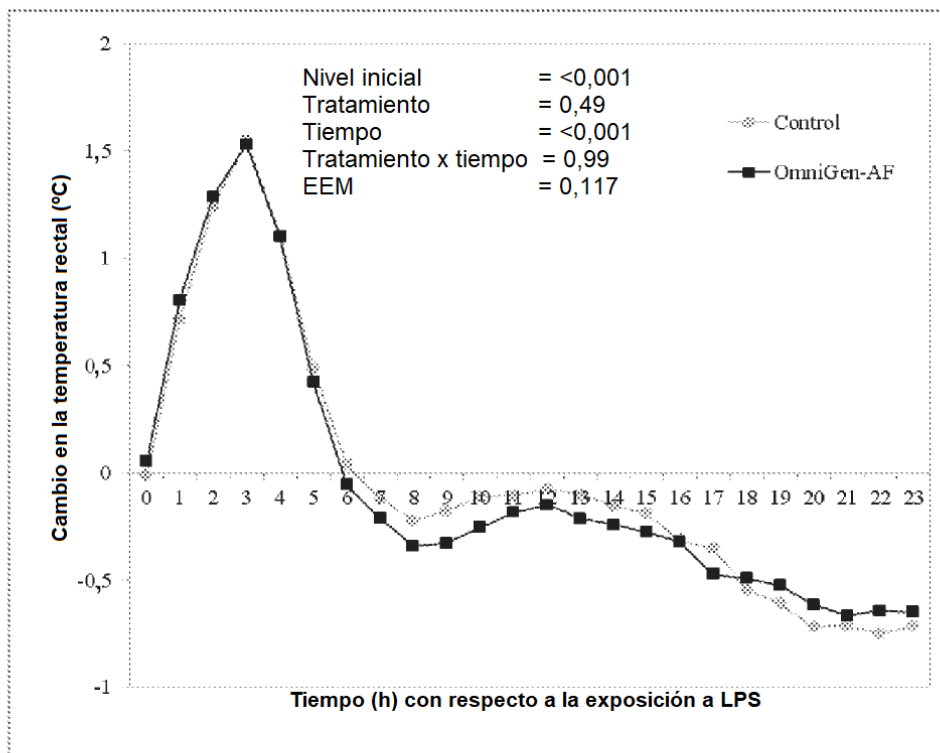


FIG. 16

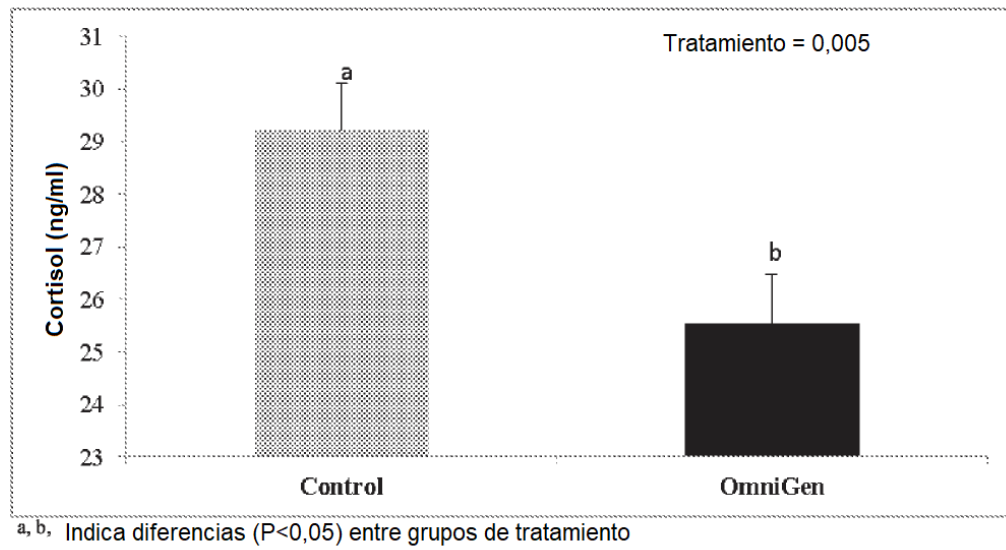


FIG. 17

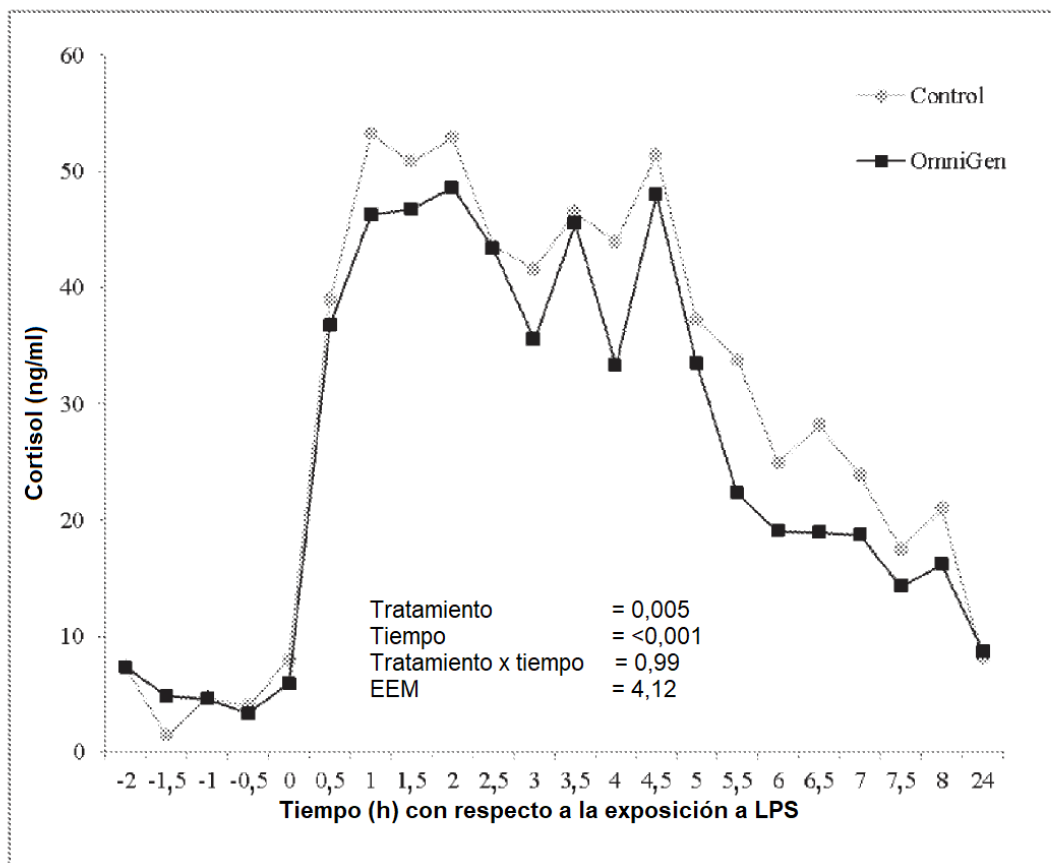


FIG. 18

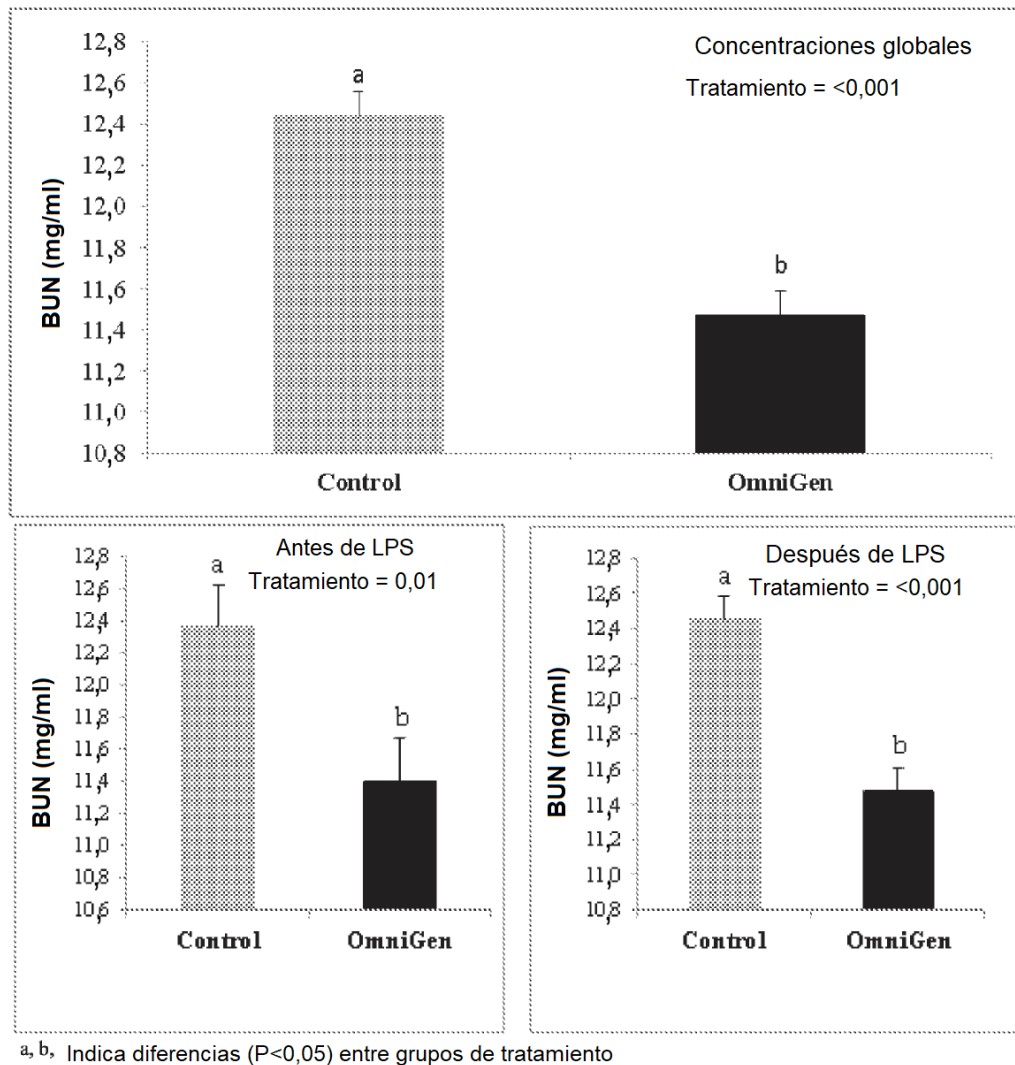


FIG. 19

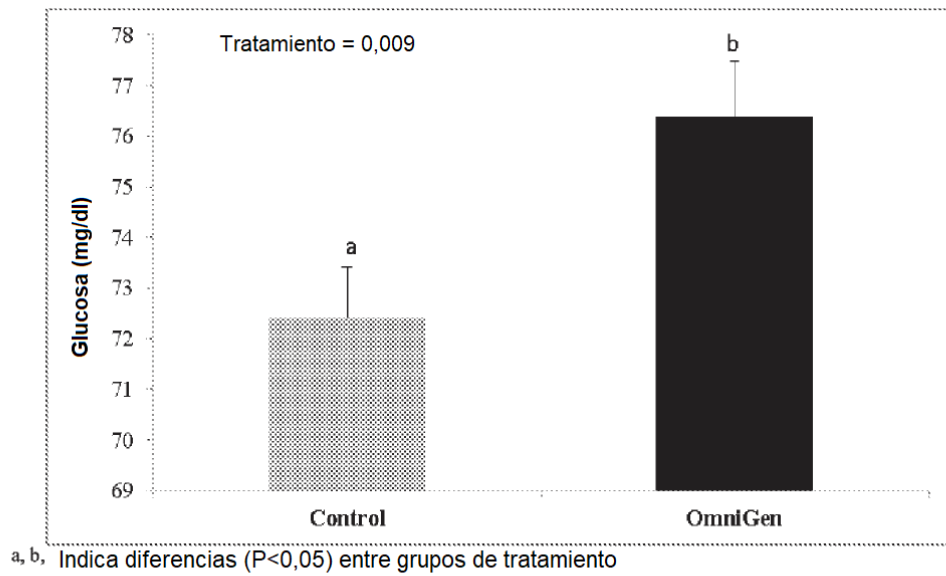


FIG. 20

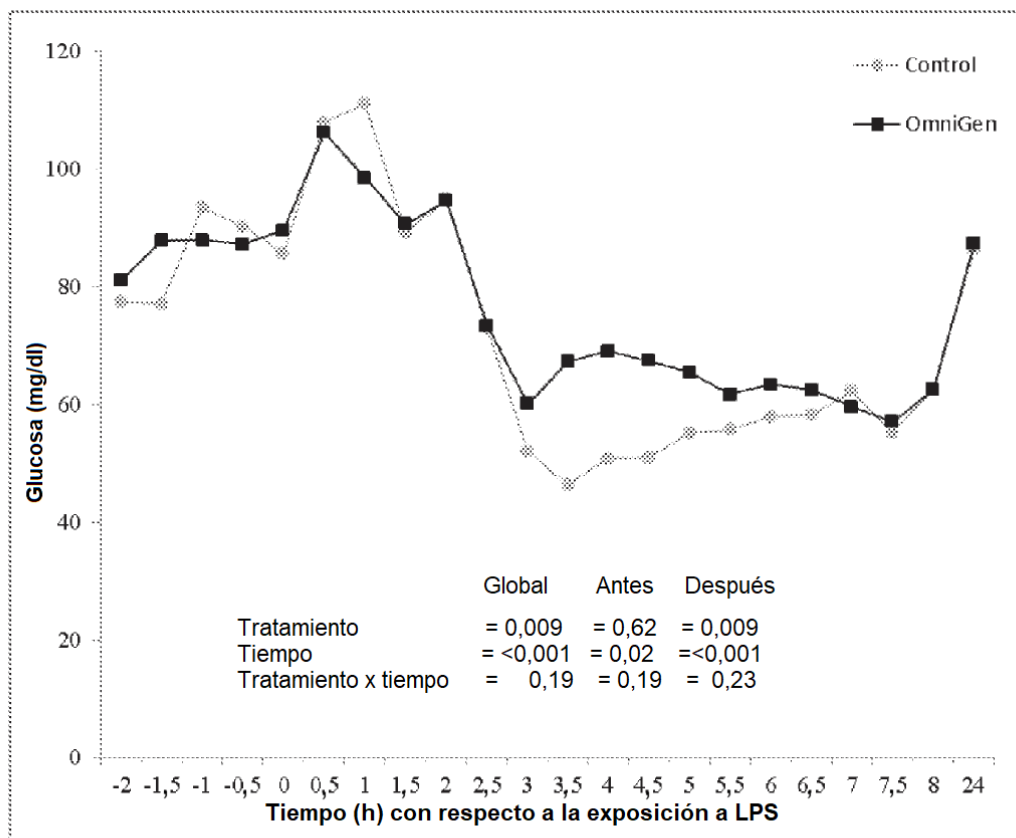


FIG. 21

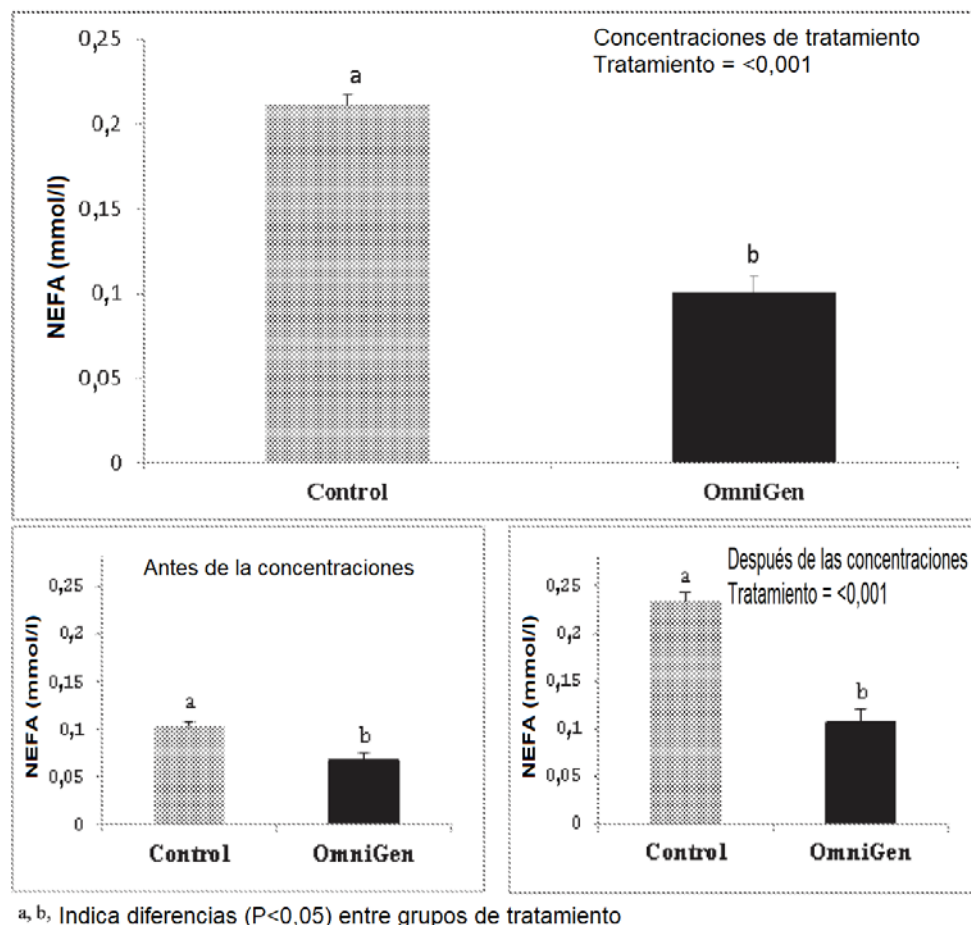


FIG. 22

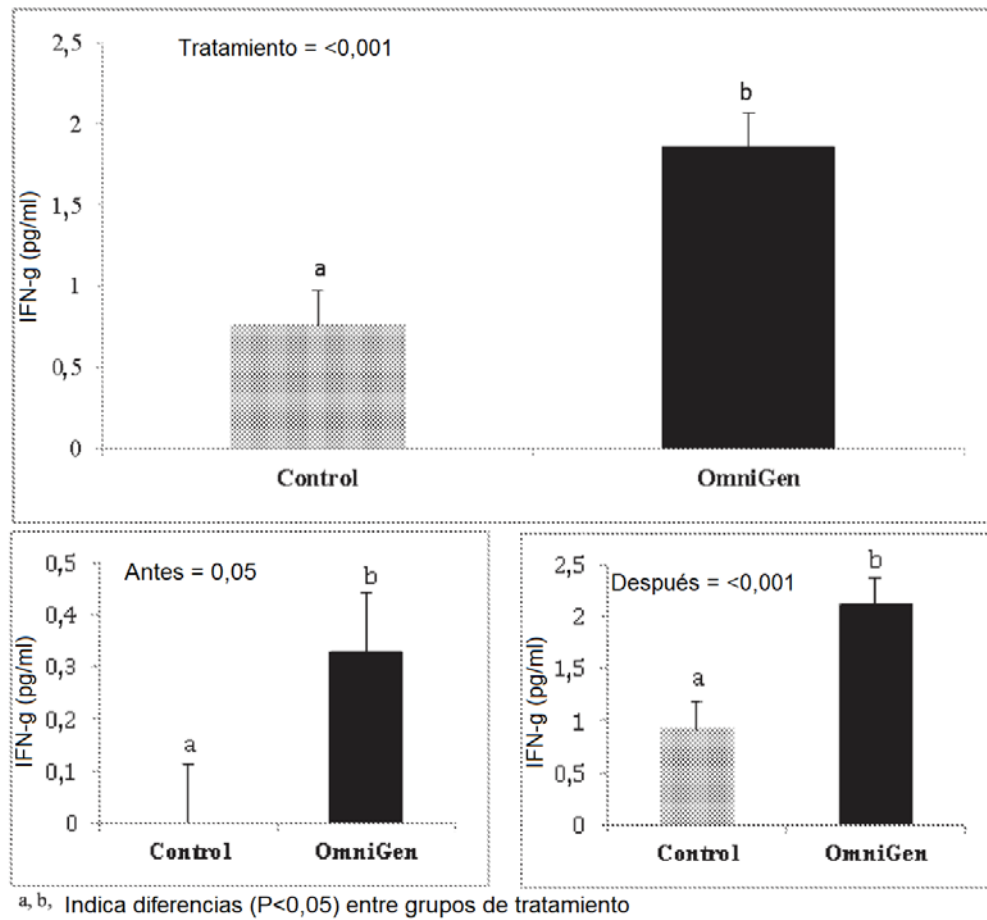
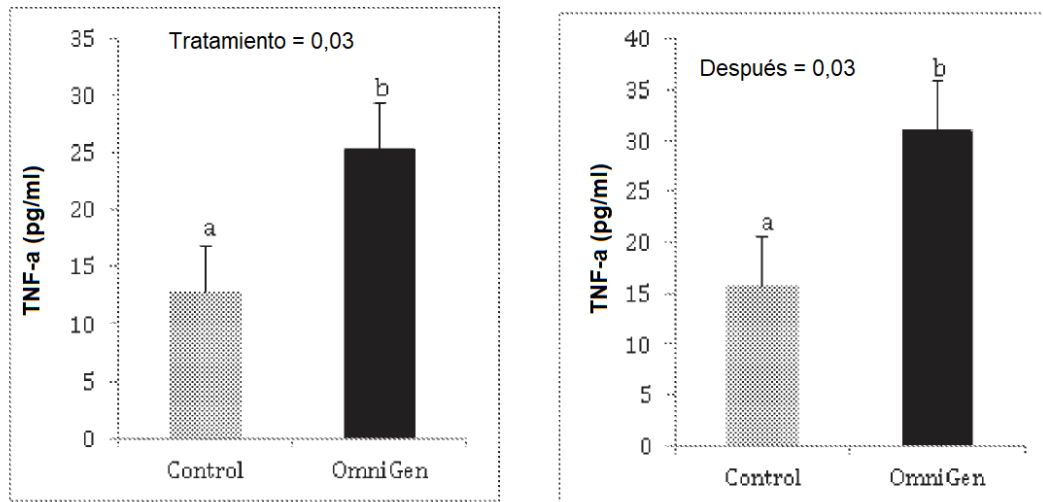


FIG. 23



a, b, Indica diferencias ($P < 0,05$) entre grupos de tratamiento en momentos de tiempo específicos

FIG. 24

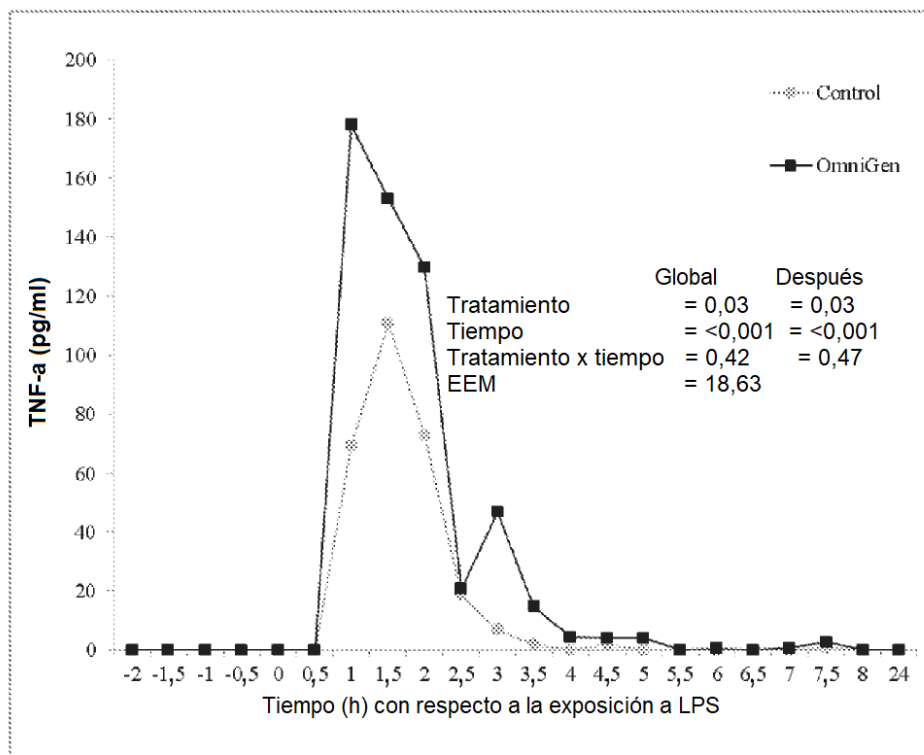


FIG. 25

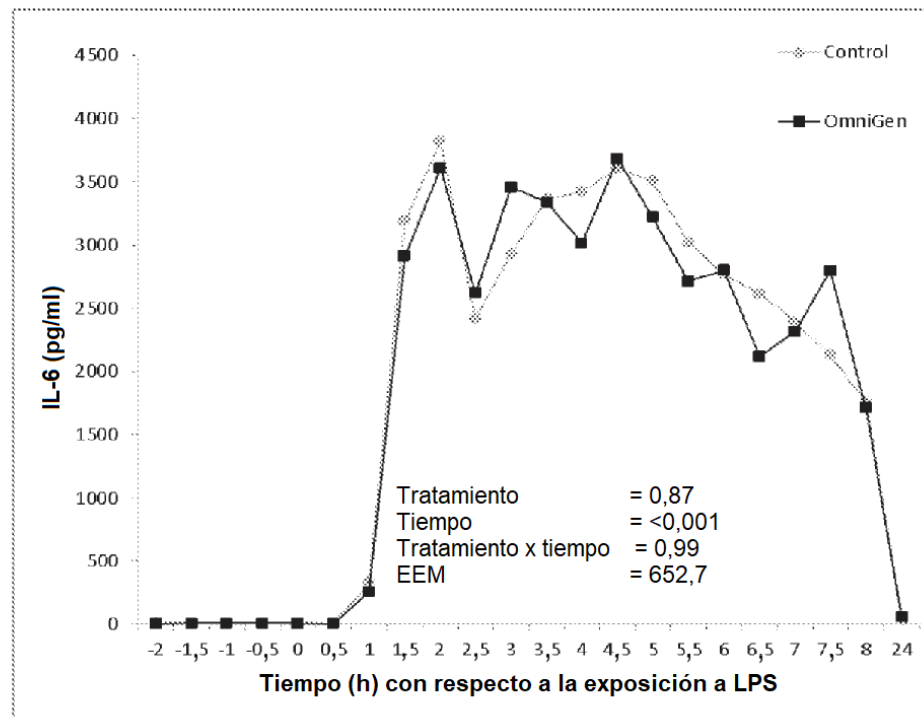
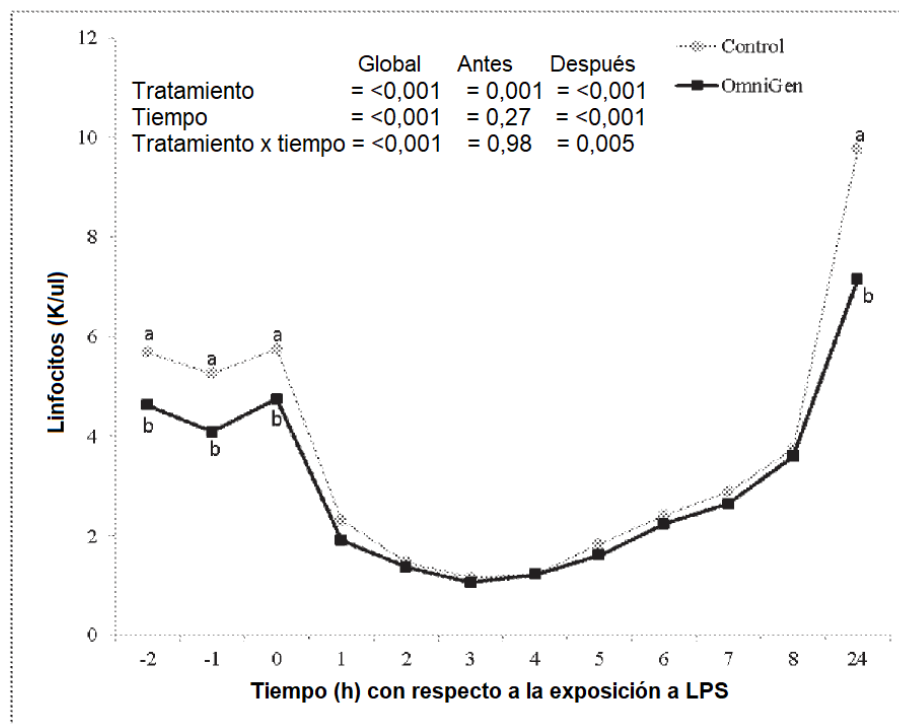


FIG. 26



a, b, Indica diferencias ($P < 0,05$) entre grupos de tratamiento en momentos de tiempo específicos

FIG. 27

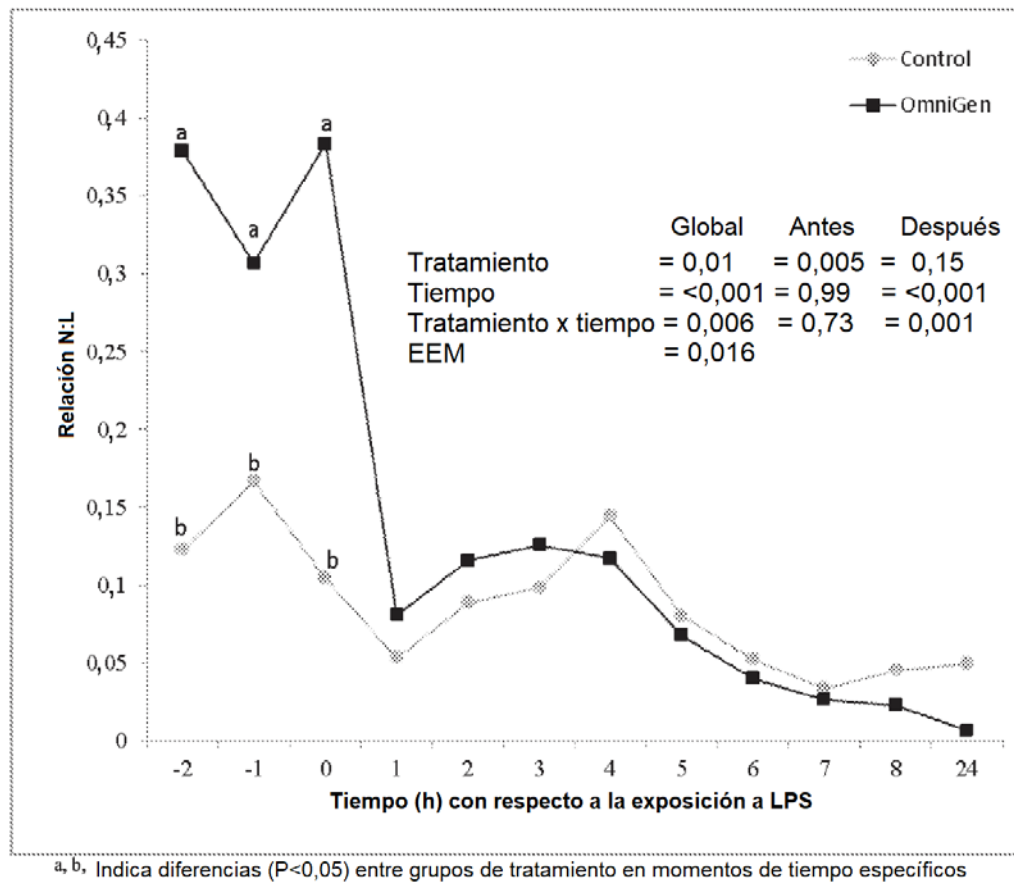


FIG. 28