



**UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY**



**Facultad de Veterinaria**  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**OSTEOMALACIA EN BOVINOS  
DEL URUGUAY**

**CARLOS OMAR SCHILD HORNUS, M.V., MSc.**

**TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2022**





UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**OSTEOMALACIA EN BOVINOS**

**DEL URUGUAY**

**CARLOS OMAR SCHILD HORNUS, M.V., MSc.**

---

**Franklin Riet-Correa DMV, MSc, PhD**  
**Director de Tesis**

---

**Martín Jaurena Ing Agr, MSc, PhD**  
**Codirector**

**2022**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Andrés Gil, DVM, MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay**

**Ana Lucia Schild, DVM, MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Federal de Pelotas  
Brasil**

**Juan Micheloud, DMV, PhD  
Grupo de Salud Animal  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
Argentina**

**2022**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

## FACULTAD DE VETERINARIA

### Programa de Posgrado

### ACTA DE APROBACION DE TESIS

### DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

“Osteomalacia en Bovinos del Uruguay”

**Director:** Franklin Riet-Correa

**Codirector:** Martín Jaurena

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** plataforma zoom, 8/7/2022

**TRIBUNAL:** Andrés Domingo Gil (Presidente), Ana Lucia Schild (Segundo Miembro), Juan Francisco Micheloud (Tercer Miembro)

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
6135802-4	Carlos Omar Schild Hornus	S.S.S.	12

**NOTA:** La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

Juan Francisco Micheloud

Ana Lucia Schild

Andrés D. Gil

**Fallo del Tribunal:**

**APROBADA CON MENCIÓN**

Montevideo,  
Viernes 8 de julio de 2022

## **COPYRIGHT**

Título: Osteomalacia en bovinos de Uruguay

Autor: Carlos Omar Schild

© C.O. Schild, 2022. Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede reproducirse de ninguna forma ni por ningún medio, ya sea de forma electrónica, mecánica, mediante fotocopia, grabación o de otro modo, sin el permiso previo de los propietarios de los derechos de autor.

Impreso en “Amanecer”, Basavilbaso, Entre Ríos – Argentina

Encuadernado por Hugo Caballero, Tacuarembó - Uruguay

<p>Schild, Carlos Omar Osteomalacia en Bovinos de Uruguay. Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Tacuarembó – Uruguay, Julio del 2022, pp 92.</p>
---

## DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS

Para mis hijos Milo & Eloy

...*"la vida es como andar en bicicleta, para encontrar el equilibrio hay que seguir andando"* ...

Albert Einstein (1879 – 1955)

Quiero agradecer:

A Dios por guiarme en este camino y por darme fuerza para levantarme en cada tropiezo.

A mi Familia por su incondicional contención, apoyo, empatía y voluntad para perseguir el mismo sueño "*nuestro hogar*". Sin Uds. no hubiese valido la pena.

A mi mentor el Dr. Franklin Riet-Correa por darme la oportunidad de aprender caminando, por dejarme ser parte del sueño de la Plataforma de Salud Animal de Colonia y del Núcleo de Salud Animal de Tacuarembó y sobre todo por enseñarme que "*la verdadera creación del conocimiento es colectiva, multidisciplinaria y participativa, sin alumnos, sin profesores y sin jefes; todos aprendiendo juntos con humildad y generosidad para alcanzar las mismas metas y objetivos*". Llegue hasta acá gracias a vos y fue un honor haber compartido estos 7 años juntos. ¡Gracias Maestro!

Al Ing. Agr. Dr. Martín Jaurena e Ing. Agr. Dr. Robert Dixon por su grandes aportes y colaboraciones en cada uno de los capítulos de esta Tesis. Gracias a ambos por destinar parte de su valioso tiempo en mi formación.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) de la Universidad de la República (UDELAR) por las becas de para hacer y finalizar el Doctorado.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación del proyecto que dio origen y permitió realizar los trabajos involucrados en esta tesis de Doctorado.

A mis compañeros de trabajo: Anderson Saravia; Alejandra Custodio; Luiz Olivera; Fabiana Boabaid; Marlon Riso; Cecelia Miraballes; Tatiana Saporitti; Martín Lucas; Manuel Taño; Ernesto Lemos; Mizaël Machado; Ana Vildoza; Mariana Barrios y Sabrina Pimentel por compartir una multiplicidad de viajes de diagnóstico, necropsias y ensayos fortaleciendo con críticas constructivas mi desarrollo personal y profesional.

A mis compañeros de la Plataforma de Salud Animal de INIA LE de Colonia por el constante apoyo.

A los estudiantes del practicantado de Tacuarembó: Sol André; Sebastián Eastman; Matías Campos; Cintia Sanguinett; Agustina Rovira; Juan Tafernaberry y Lucas Udaquiola, por su colaboración en los muestreos y experimentos.

A el Ing. Agr. Juan “lolo” Algorta, y la Barraca Deambrosi S.A. por su gran colaboración, apoyo y valiosos aportes es varios de los capítulos y trabajos realizados en esta tesis.

Al personal técnico de INIA y DILAVE: Saulo Días; Mauricio Silveira; Alfonzo Albornoz; Pablo Fraga; Julio Larronda; Daniel Basaund; Rodolfo Piriz; Manuel Viera; Luis Moreno; Fabiana Paula; Blanca Díaz; Cristina Perera; Florencia Buroni y Fabiana López por colaboración con el procesamiento de muestras.

A los Médicos Veterinarios Dres.: Rafael Martínez; Karina Cresi; Sol André; Agustín Martínez; Andrea Álvez; Marcelo Villagran; Ximena González; Oscar Da Silva; Martin Álvez; Andrés Sosa; Pablo Castro; Rafael Carriquiry y al todo el Centro Médico Veterinario de Tacuarembó, por su colaboración e invaluable aporte a la casuística al Núcleo de Salud Animal de Tacuarembó.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA .....	5
3. HIPÓTESIS.....	6
4. OBJETIVOS .....	6
Objetivo general .....	6
Objetivos específicos.....	6
5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
6. CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA CARENCIA CRÓNICA DE FÓSFORO EN BOVINOS.....	9
6.1. RESUMEN.....	9
6.2. BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA ENFERMEDAD .....	10
6.3. FUNCIONES Y METABOLISMO DEL FÓSFORO .....	11
6.4. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA .....	11
Deficiencia de fósforo en otras especies .....	12
6.5. SIGNOS CLÍNICOS.....	13
6.6. LESIONES.....	17
6.6. PATOGENIA.....	20
6.7. DIAGNÓSTICO .....	22
Factores in vivo y preanalíticos que pueden afectar la concentración fósforo inorgánico en sangre .....	22
6.8. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.....	23
7. CAPITULO 2. OSTEOMALACIA POR DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN VACAS DE CRÍA PASTOREANDO CAMPOS NATURALES DEL NORTE DE URUGUAY .....	27
7.1. RESUMEN.....	27
7.2. INTRODUCCIÓN .....	28
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Datos epidemiológicos.....	29
Colecta de muestras y análisis de laboratorio .....	30
Análisis estadísticos .....	31
7.4. RESULTADOS .....	31
7.5 DISCUSIÓN .....	39
7.6. CONCLUSIÓN.....	41
7.7. AGRADECIMEINTOS .....	41
7.8. FINANCIACIÓN.....	41
7.9. MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 2 .....	42

8. CAPÍTULO 3. RESPUESTAS DE VACAS CON OSTEOMALACIA A LA SUPLEMENTACIÓN CON FÓSFORO OFRECIDO EN MEZCLAS MINERALES SUELTAS O MEZCLAS MINERALES COMPRIMIDAS EN BLOQUES .....	45
8.1. RESUMEN.....	45
8.2. INTRODUCCIÓN .....	46
8.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
Diseño del experimento y suplementos minerales usados.....	46
Colecta de muestras.....	47
Análisis de laboratorio .....	48
Análisis estadístico.....	48
8.4. RESULTADOS .....	48
8.5. DISCUSIÓN .....	55
8.6. CONCLUSIÓN.....	56
8.7. AGRADECIMEINTOS .....	56
8.8. FINANCIACIÓN.....	56
9. CAPITULO 4. DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN VACAS DE PRIMERA CRÍA QUE PASTAN EN CAMPOS NATURALES DE 32 ESTABLECIMIENTOS GANADEROS DEL NORTE DE URUGUAY.....	58
9.1. RESUMEN.....	58
9.2. INTRODUCCIÓN .....	59
9.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	62
Selección de establecimientos.....	62
Colecta de muestras .....	62
Análisis de laboratorio .....	62
Análisis estadísticos .....	63
9.3. RESULTADOS .....	64
9.4. DISCUSIÓN .....	69
9.5. CONCLUSIÓN.....	71
9.6. AGRADECIMIENTOS .....	71
9.7. FINANCIACIÓN.....	71
9.8. MATERIAL SUPLEMENTARIO DE CAPÍTULO 4 .....	72
10. DISCUSIÓN GENERAL.....	74
11. CONCLUSIONES GENERALES .....	76
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
13. ANEXOS.....	85
13.1. PUBLICACIONES .....	85

## RESUMEN

La tesis consta de 4 capítulos relacionados a la ocurrencia, tratamiento y prevención de la deficiencia crónica de fósforo (P) en los bovinos criados de forma extensiva en campos naturales del norte de Uruguay. En el capítulo 1 se realizó una revisión bibliográfica de la deficiencia de P en los bovinos incluyendo una reseña histórica de la enfermedad en el Sur de Sudamérica, aspectos epidemiológicos, signos clínicos, lesiones, diagnóstico, tratamiento y prevención; adicionalmente, se construyó un diagrama que explica el desarrollo de las lesiones, así como las alteraciones clínico-patológicas frecuentemente reportadas. En el capítulo 2 se realizó la descripción de 4 brotes de osteomalacia en bovinos que ocurrieron en los departamentos de Artigas, Cerro Largo y Tacuarembó entre los años 2018 y 2021. En el norte de Uruguay, actualmente, la enfermedad ocurre debido a la falta y/o incorrecto uso de sales mineral con P. Los signos clínicos y lesiones fueron similares a las previamente descritos, adicionalmente observamos atrofia de paratiroides en 2 de 3 vacas severamente afectadas. Este hallazgo no estaba reportado en la literatura. En el capítulo 3 se evaluaron las respuestas a la suplementación con P administrado en forma de mezcla mineral suelta (MMS) o mezcla mineral comprimida en bloque (MMB) en 20 vacas con osteomalacia. El 90 % de las vacas se recuperaron en 3 meses con ambas mezclas minerales; sin embargo, las MMS fueron más efectivas para revertir la enfermedad debido a que, en el mismo período de tiempo, permitieron una mayor deposición de P en las costillas. En el capítulo 4 se realizó un muestreo en 32 establecimientos del norte de Uruguay para detectar regiones o áreas con mayor o menor deficiencia de P y evaluar estrategias preventivas de suplementación con P. En una gran área del norte de Uruguay se detectó deficiencia de P en el suelo, forraje de los campos naturales y animales, tanto en primavera como en verano, limitando la producción de las vacas de primera cría. Para prevenir la deficiencia de P o para obtener un mayor retorno económico la suplementación mineral con P debería realizarse en la primavera cuando no hay otras limitantes aparentes. Adicionalmente, en establecimientos con antecedentes de osteomalacia, la suplementación mineral con P preventivamente debería extenderse hasta el fin del verano en vacas en lactación para evitar nuevos casos de osteomalacia e incrementar las reservas óseas de P. En regiones con severa deficiencia de P (<1.5 g/kg MS) en forraje deberían usarse sales minerales comerciales que contengan altas concentraciones de P (80-100 g P/kg) y en regiones con una deficiencia marginal de P en el forraje (1.5 – 2.0 g/kg MS) deberían usarse sales con menores concentraciones de P (60-80 g P/kg).

## SUMMARY

The thesis consists of 4 chapters related to the occurrence, treatment, and prevention of chronic phosphorus (P) deficiency in cattle grazing native grasslands in northern Uruguay. In chapter 1, a bibliographic review of P deficiency in cattle was carried out, including a historical review of the disease in the South of South America, epidemiological factors, clinical signs, lesions, diagnosis, treatments, and prevention. Additionally, a diagram was built to explain the development of the lesions and the clinicopathological finding reported. In chapter 2, we described 4 outbreaks of osteomalacia in cattle that occurred in the departments of Artigas, Cerro Largo, and Tacuarembó between 2018 and 2021. In Uruguay, the disease currently occurs due to the lack and or incorrect use of mineral mix with P. Clinical signs and lesions were similar to previous reports, but also, we observed parathyroid atrophy in 2 of 3 severely affected cows. This finding had not been previously reported in the literature. In chapter 3, the responses to supplementation with P administered in the form of a loose mineral mix (MMS) or compressed in blocks (MMB) were evaluated on 20 cows with osteomalacia. Ninety percent of the cows recovered in 3 months with both mineral mixes; however, the MMS were more effective because they allowed a more significant deposition of P in rib bones. In chapter 4, sampling was carried out in 32 beef cattle ranches in the north of Uruguay to detect regions with greater or lesser P deficiency and to evaluate preventive strategies for supplementation with P. In a large area in the north of Uruguay has P deficiency in the soil, forage and blood of cows both in spring and summer, limiting the production of the animals. To prevent P deficiency or to obtain a higher economic return, mineral supplementation with P should be carried out in the spring when there are no other apparent limitations. Additionally, in ranches with a history of osteomalacia outbreaks, preventive mineral supplementation with P in lactating cows should be extended until autumn with the aim to prevent new osteomalacia outbreaks and to increasing P bone reserves. In regions with severe P deficiency in forage (<1.5 g/kg DM) commercial mineral mixes containing high P concentrations (e., 80-100 g P/kg) should be used; and in regions, with marginal P deficiency in forage (1.5 – 2.0 g/kg DM) should be used mineral mixes with lower P concentrations (e., 60-80 g P/kg).

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La carencia o deficiencia de minerales puede generar severas implicancias en la salud, bien estar y producción animal (Underwood, 1983; Radostits et al., 2011). En la cría de bovinos en condiciones de pastoreo extensivo cuya dieta son los pastizales naturales, las principales deficiencias de minerales son la de fósforo (P) y la de sodio (Na), seguidas de cobalto (Co), yodo (I), selenio (Se), cobre (Cu), zinc (Zn) y ocasionalmente magnesio (Mg) (Underwood, 1983; Mufarrege, 1999; Tokarnia et al., 2000; Constable et al., 2017).

En Uruguay, los pastizales o ‘campos naturales’ abarcan aproximadamente 11,2 millones de hectáreas representando entre 64-82% de la superficie del País (Cortelezzi & Mondelli, 2014; DIEA, 2020). Estos pastizales son la principal fuente nutricional para 6 millones de vacas de cría y 3,8 millones de ovejas en Uruguay (DIEA, 2020). A pesar de que tradicionalmente estos sistemas de producción permiten obtener un producto animal remunerable, en diversas circunstancias la producción ganadera se encuentra limitada no solo por enfermedades infecciosas, parasitarias o tóxicas y/o por escasas forrajeras, sino también por las deficiencias minerales, las que se hacen más evidentes cuando hay abundante producción de forraje con adecuada concentración de proteína y energía (Underwood, 1983; Tokarnia et al., 2000).

En Uruguay, una de las principales y la primera deficiencia mineral estudiada fue la carencia de P, también denominada ‘osteomalacia’ (debido al reblandecimiento de los huesos), o ‘mal de las paletas’ (debido al aspecto que adquiere la espina de la escapula, tras la atrofia muscular que los animales desarrollan). Los primeros trabajos nacionales datan de 1928, y fueron realizados por el Dr. M.C. Rubino, en los cuales se describen las condiciones epidemiológicas, signos clínicos, lesiones macroscópicas, y posiblemente el primer reporte de las lesiones microscópicas en costillas de bovinos en la región y en el mundo ya que Sir Arnold Theiler, recién reporta las lesiones microscópicas de la ‘afosforosis’ en 1931 (Rubino, 1928; Theiler, 1931). Además, los trabajos del Dr. M.C. Rubino fueron pioneros en la determinación de P en suelo y huesos (Rubino, 1934). Posteriormente, desde 1940 y hasta 2010, se realizaron importantes contribuciones profundizando las mediciones de P en el suelo, plantas y sangre, así como evaluando los efectos de la suplementación mineral con P en la reproducción y/o ganancias de peso de los animales (Montedónico et al., 1939; Nores & Santoro, 1940; Spangenberg et al., 1941; Nores, 1944; Spangenberg, 1944; De León Lora, 1963; Schiersmann, 1965; CIAAB, 1971; Cuenca, 1981; Pittaluga et al., 1980; Pittaluga, 1980, 1986, 2007; Gómez Haedo & Amorín, 1982; Arroyo & Mauer 1982; Barrios et al., 1984; Fernández Liñarez et al., 1985; Guerrero & Colucci, 1987; Uriarte et al., 2000; Quintans et al., 2005; De Nava et al., 2008). Luego, con el inicio de la revista ‘Archivos Veterinarios del Este’ editada por el Dr. Dutra, comienzan a reportarse importantes brotes de osteomalacia en el País principalmente en 2009 y 2011. Sin embargo, debido a que la enfermedad es conocida por productores y veterinarios muchos de los brotes no fueron comunicados a los laboratorios de diagnóstico como por ejemplo los brotes ocurridos en los años 1969 y 1970 en Tacuarembó (comunicación personal Franklin Riet-Correa).

Recientemente se han realizado nuevos estudios regionales evaluando la respuesta de terneras suplementadas con sales fosfatadas en ambientes con severa o marginal carencia de P (Tafernaberry & Udaquiola, 2021). También se han evaluado factores preanalíticos que pueden afectar la concentración de fósforo inorgánico (Pi) durante o post-extracción de la muestra (Campos & Sanguinetti, 2021) y hemos descripto un brote de raquitismo en terneros asociado a la severa deficiencia de P (Schild et al., 2021b). Estos 3 últimos trabajos se originaron durante el desarrollo de esta tesis de doctorado y fueron plasmados en dos tesis de grado y un resumen a congreso.

Además de la osteomalacia, hay en Uruguay estudios que evidencian las deficiencias de otros minerales (Na, Mg, Zn, Cu, Se y I) en los suelos y pastizales (Ungerfeld, 1998, Uriarte et al., 2000),

así como también hay reportes de carencias de Ca, Mg, Se y Cu en animales (Podesta et al., 1976; Guerrero & Colucci, 1987; Dutra, 2016; Doncel et al., 2019; Rodriguez et al., 2018; Doncel et al., 2021).

## 2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La carencia crónica de fósforo (P) es una enfermedad que mundialmente afecta en mayor medida a los bovinos criados en campos naturales con baja concentración de P en los suelos y pasturas. En Uruguay esta es una de las principales deficiencias minerales. Los signos clínicos, la epidemiología, las lesiones, el diagnóstico, el tratamiento y el control de esta enfermedad son mundialmente conocidos desde hace más de un siglo. Apesar de ello la regulación endocrina de P sigue en estudio y no hay trabajos que expliquen globalmente los mecanismos relacionados al desarrollo de las lesiones de la carencia crónica de P en los bovinos.

Existen varios estudios realizados en Uruguay que evidencian mejores ganancias diarias de peso y mejores índices reproductivos en animales suplementados con P, sin embargo, hay controversias respecto a las condiciones en que hay mayor respuesta a la suplementación con P. Esto conlleva a una falta de información y por ende falta o incorrecto uso de esta tecnología. Adicionalmente, no hay estudios que evidencien la respuesta animal y/o eficiencia de la suplementación con P, según la presentación comercial del suplemento, en vacas con osteomalacia. Tampoco hay estudios que permitan identificar regiones o áreas de Uruguay con mayor o menor grado de deficiencia en los suelos y pasturas; y por ende el tipo de suplemento mineral a usar; y/o estudios que ayuden a tomar mejores decisiones en la suplementación mineral con P en diferentes condiciones de suelo y pasturas. Estos estudios son importantes para que los técnicos asesores y productores puedan controlar la enfermedad y adoptar futuras medidas profilácticas.

Algunas de las preguntas a ser respondidas con esta Tesis son: ¿Cuál es el mecanismo patogénico de la carencia crónica de P en las vacas de cría?, ¿En qué situaciones ocurre, actualmente esta enfermedad?, ¿En qué regiones habría mayor o menor de deficiencia de P? y ¿Qué indicadores ayudarían a definir una estrategia de suplementación mineral con P en nuestra región? ¿Cuán rápida y efectiva puede ser la respuesta a la suplementación mineral fosfatada en vacas con severa deficiencia de P?

### **3. HIPÓTESIS**

La carencia crónica de fósforo (P) ocurre durante épocas de sequía y se asocia a la falta o ineficiente suplementación mineral con P.

La suplementación mineral con 100 g de P/kg, vía oral usando mezclas minerales sueltas es más efectiva que la misma mezcla mineral comprimida en bloque para recuperar vacas con osteomalacia.

En el norte de Uruguay, donde la deficiencia de P es endémica, existen regiones en las que pueden distinguirse principalmente dos áreas (i) con severa y/o (ii) marginal deficiencia de P en el suelo y forraje. En estas regiones el uso de suplementos minerales comerciales que contienen altas (ej., 80-100 g de P/kg) y moderadas (ej., 60-80 g de P/kg) concentraciones de P previenen la deficiencia de P en los animales de las áreas con severa y marginal deficiencia de P respectivamente.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Estudiar la carencia crónica de fósforo en bovinos que pastan campos naturales del norte de Uruguay y generar un modelo de respuesta animal a la suplementación mineral con P.

#### **Objetivos específicos**

1. Revisar los antecedentes de osteomalacia en bovinos en el mundo.
2. Caracterizar las condiciones epidemiológicas, clínicas, patológicas y bioquímicas de la carencia crónica de P en Uruguay.
3. Definir estrategias de suplementación mineral con P en vacas que están cursando con la enfermedad.
4. Definir estrategias de prevención con la suplementación mineral de P en regiones del norte de Uruguay con severa o marginal deficiencia de P en el ambiente (suelo y forraje).

## 5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se realizó una revisión de la de la literatura disponible sobre ‘osteomalacia’, la cual fue plasmada en el **Capítulo 1**. Para el estudio y descripción de las condiciones actuales relacionadas a la ocurrencia de la deficiencia de fósforo (P), todos los casos con sospecha de osteomalacia o carencia crónica de P que fueron recibidos durante 2018-2021 en el Núcleo de Salud Animal de Tacuarembó (NUSAT) fueron sistemáticamente examinados y descriptos en el **Capítulo 2**. Para definir estrategias de control en vacas que cursaron la enfermedad, se diseñó y realizó un experimento para evaluar la eficiencia del tratamiento con mezclas minerales con P en animales con signos de osteomalacia. Este estudio fue plasmado en **Capítulo 3**. Para definir estrategias de prevención en función al grado de deficiencia de P en el ambiente (suelo y forraje) se realizó un muestreo de suelo, forraje, y sangre en 32 establecimientos que nunca habían usado suplementación mineral, no habían fertilizado con P los campos, no habían realizado mejoramientos forrajeros en los pastizales de los campos naturales (ej., implantar leguminosas) y tenían antecedentes de alotrofagia (pica) o sospecha de carencia de P. Este estudio fue plasmado en el **Capítulo 4**.



## 6. CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA CARENCIA CRÓNICA DE FÓSFORO EN BOVINOS

### 6.1. RESUMEN

La carencia crónica de fósforo (P) es una enfermedad que en los bovinos es conocida desde inicios del siglo XX. Esta deficiencia ocurre principalmente en vacas en lactación durante estaciones secas y que pastan en suelos y forrajes que tienen bajas concentraciones de P (<5 mg/kg y <2 g/kg MS respectivamente). Consecuentemente las vacas tienen bajas concentraciones de P en sangre (<1 mmol/L) y en huesos (<120 mg/mL). Esta deficiencia cursa clínicamente con alotrofia (pica) y/o avidez por la ingesta de huesos (osteofagia), dificultad en la marcha, cifosis, dificultad para levantarse, tendencia a pasar mayor tiempo en decúbito y/o fracturas espontáneas. Como consecuencia de la osteofagia los animales también pueden tener atragantamientos con huesos o adquirir botulismo. Sin embargo, las mayores pérdidas son subclínicas debido al retraso en el crecimiento, bajas ganancias de peso y baja fertilidad de los rodeos. Durante las necropsias es común observar múltiples fracturas o callos óseos de reparación, correspondientes a fracturas previas principalmente en las costillas, además pueden haber marcada fragilidad y/o deformaciones óseas. Microscópicamente en los huesos se observa osteomalacia con o sin osteoporosis. Complementariamente, las radiografías, la relación Ca/P sanguínea y la concentración de P en cenizas óseas pueden ayudar al diagnóstico. Sin embargo, la medición de la concentración de P en sangre asociado a la presencia de signos clínicos y la presencia de osteopenia determinado por la prueba de la aguja en las apófisis transversas de vértebras lumbares siguen siendo, en conjunto, las mejores herramientas para diagnosticar la enfermedad a campo. La administración de P oral *ad libitum* es el mejor tratamiento para el control de esta enfermedad en animales con severa osteomalacia. En este sentido es necesario suministrar sales minerales con  $\geq 100$  g de P/kg durante 3-4 meses acompañado del destete de los terneros para bajar los requerimientos diarios de P en las vacas. En establecimientos con antecedentes de carencia de P pueden usarse preventivamente sales minerales con 60 a 100 g P/kg dependiendo de la disponibilidad de P en el forraje, durante el período de mayor demanda y/o época del año en que la deficiencia de P es la principal limitante para la producción.

**Palabras claves:** carencia crónica de fósforo, osteofagia, osteomalacia, pérdidas subclínicas, bovinos

## 6.2. BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA ENFERMEDAD

Los primeros estudios de la carencia crónica de fósforo (P) en bovinos datan de 1859 donde en Noruega observaron que la enfermedad (de causa aún desconocida en ese momento) se exacerbaba en años secos y con pocas lluvias causando importantes brotes o epizootias de 400-2700 muertes, sin embargo, en algunos distritos de ese País llamados ‘*osteomalacius district*’ la enfermedad se comportaba de forma enzoótica habiendo pocos casos, independientemente del régimen de lluvias (Tuff, 1923). Contemporáneamente, Sir Arnold Theiler en 1911 describía en Sudáfrica una enfermedad similar y con el mismo comportamiento, sin embargo, no fue hasta 1924 que este autor asocia la enfermedad ‘*styfsiekte*’ a una deficiencia de P, llamándola ‘*afosforosis*’ (Theiler, 1911; 1912; Theiler et al., 1924). En Sudamérica a pesar de que los primeros reportes oficiales se realizaron por el Dr. Rubino en 1928 en Uruguay, en Argentina en el libro “Instrucción del Estanciero” (Hernandez, 1884) se publica un capítulo completo titulado “animales que comen hueso”. En este libro se describe que los bovinos que empezaban a comer hueso al tiempo iniciaban a manquear o renguear y luego comenzaban a «*secarse de los cuartos hasta quedar completamente entecados y morir*». Además, Hernandez (1884) afirma que estos animales buscaban en los huesos elementos faltantes en los pastos y aguas; y también describe una epizootia de 500 muertes en vacas que consumían hueso, recomendando (ya en esa época) el uso de sales minerales debido a que aparentemente influían en la salud de los animales y disminuían las epizootias asociadas al consumo de hueso.

Dada las bajas tasas de mortalidad (< 2,5 %) que generalmente se describe en los brotes de osteomalacia (Tokarnia et al., 1970a; Dutra, 2011b; Schild et al., 2021a), es probable que muchas de estas grandes mortandades históricas como las observadas en Noruega y Argentina hallan ocurrido no solo por la carencia crónica de P, sino también posiblemente debido a la intoxicación con toxina botulínica como luego se confirmó en Sudáfrica (Theiler et al., 1924). Condiciones similares han ocurrido en Brasil donde algunos brotes de botulismo fueron asociados a la deficiencia P dado que los animales afectados tenían osteofagia e incluso bajas concentraciones de P en sangre y hueso (Tokarnia et al., 1970b; Lisbôa et al., 1996; Riet-Correa & Gevehr Fernandez, 2002; Riet-Correa et al., 2012).

La carencia crónica de P, afosforosis u osteomalacia mundialmente así denominada también fue conocida con varios nombres regionales por ejemplo en Australia fue llamada “*stiffs*”, “*pegleg*”, “*crepples*” (Rose 1927, 1954), en Brasil como “*caranga*”, “*entrevá*”, “*enrola*” o “*mal da paleta*” (Tokarnia, et al., 2010), en Sud África como “*styfsiekte*” (Theiler et al., 1924), en USA como “*stiffs*”, “*sweeny*”, “*creeps*” (Black et al., 1943), en Argentina “*chichaca*” o “*mal de las paletas*” (Mufarрге, 1999) y en Uruguay “*mal de las paletas*” (Rubino, 1928). Todas tenían en común la falta de P en los suelo y pastos, la presencia de animales comiendo huesos, alteraciones en la marcha y el reblandecimiento de huesos. En Uruguay existe un paraje y arroyo llamado “Las Rengas” (debido a la condición que las vacas presentaban) ubicados en la 2da seccional policial del departamento de Durazno, donde actualmente se encuentran las ruinas de la estancia del Gral. Ignacio Oribe (líder uruguayo que participó en las guerras de la independencia y civiles a mediados del siglo XIX) y región en las que el Dr. Rubino realizó varios de sus estudios.

La lesión histológica de osteomalacia (excesiva cantidad de tejido osteoide no mineralizado) fue descrita por primera vez en humanos por un patólogo alemán llamado Gustav Pommer, en 1885 y recién en 1920 se la asoció principalmente a una deficiencia de Vitamina D (McDowell, 2003; Bhan et al., 2010), sin embargo, no fue hasta 1928 que el Dr. Rubino y en 1931 que Sir Arnold Theiler describen lesiones similares en los huesos de los bovinos con carencia de P (Rubino, 1928; Theiler, 1931).

### 6.3. FUNCIONES Y METABOLISMO DEL FÓSFORO

El P es de gran importancia en el organismo ya que es un componente del ADN, ARN y de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares. Interviene en la formación de complejos enzimáticos involucrados en funciones tales como la utilización y transferencia de energía mediante ADP, ATP y AMP lo cual se refleja directamente sobre la glicolisis, gluconeogénesis, transporte de ácidos grasos, síntesis de aminoácidos y actividad de la bomba sodio y potasio entre otras (Ternouth, 1990; Greco & Stabenfeldt, 2004; Grünberg, 2014). También, el P está involucrado en la formación ósea, en la regulación del pH, en la regulación del equilibrio osmótico, en el control del apetito y eficiencia de utilización de los alimentos (Kerridge, 1990; Suttle, 2010; Mattioli, 2013; Grünberg, 2014; Dixon et al., 2019a). En los bovinos el P es un nutriente esencial para los microorganismos ruminales ya que es requerido para la fermentación de la celulosa y para la síntesis de proteína microbiana (Grünberg, 2014).

La absorción de P ocurre en el intestino en forma de fosfato, con un coeficiente que varía entre el 65% y el 80% (Dixon et al., 2020a), sin embargo, en animales con severa deficiencia este coeficiente de absorción podría alcanzar el 100% (Mattioli, 2013). Esta absorción puede estar favorecida por el Na y la forma activa de la Vitamina D<sub>3</sub> [1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>], o puede ser perjudicada por altos niveles de Ca, Mg y/o Fe debido a la formación de fosfatos insolubles (Mufarrege, 1999; Suttle, 2010; NRC, 2016). Las principales vías de excreción de P son las heces y la leche, seguida por las demandas fetales (último tercio de la gestación) y la orina (Grünberg, 2014; Dixon et al., 2020a). Además, la saliva merece una mención especial ya que una gran cantidad del P es allí excretada y a pesar de que esta fracción de P no se pierde, porque el 80% se reabsorbe en intestino, la misma no está disponible para ser utilizada por el animal (Grünberg, 2014).

Una vaca de cría de 450 kg de peso vivo (p.v.) tiene ~3000 g de P, de los cuales un 80-85% se encuentra en el esqueleto (como parte fundamental de los huesos y dientes) y el 20-15% restante se encuentra principalmente en tejidos blandos en combinación con proteínas, grasas y/o sales inorgánicas (Suttle, 2010; Grünberg, 2014; Dixon et al., 2020a). Normalmente en determinadas situaciones (ej., último tercio de gestación o primeros meses de lactación), los bovinos, pueden movilizar hasta el 30% de las reservas óseas, las cuales dependiendo el peso vivo de las vacas (450 kg p.v.) equivalen a ~700 g totales de P o 7 g de P/día o 1/3 de los requerimientos diarios (~21 g P/día) durante los 4 meses con mayores demandas (Dixon et al., 2020a). Estas reservas fisiológicas de P son importantes para los períodos con mayor deficiencia de P en los forrajes (Dixon et al., 2017; 2020a).

La regulación endocrina de P está siendo estudiada, y aún no está del todo comprendida. En el organismo el balance de P principalmente depende del equilibrio entre el P ingresado, el P excretado y el P intercambiado desde el espacio intra y extracelular (Grünberg, 2014). Clásicamente la parathormona (PTH) y la vitamina D<sub>3</sub> activa tienen importantes roles en la excreción renal, absorción intestinal y reabsorción ósea de P (Craig et al., 2016); la insulina y los estrógenos también contribuyen en el intercambio de P desde el espacio extra al intracelular (Grünberg, 2014). Estudios recientes han demostrado que el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FCF-23) y una proteína de membrana llamada 'Klotho' tienen un rol importante en la excreción renal de P (Razzaque, 2009).

### 6.4. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

La deficiencia crónica de P es una enfermedad metabólica caracterizado desde el punto de vista bioquímico por un descenso progresivo de la concentración de P en la sangre (<1 mmol P/L o 3,1 mg P/dL) y en los huesos (<120 mg P/mL o cc), así como también un descenso paulatino de las cenizas óseas (<500 mg/mL) con disminución del espesor del tejido óseo cortical (osteopenia)

asociado a fallas en la mineralización del tejido osteoide (osteomalacia) y/u osificación endocondral (raquitismo) (McDowell, 2003; Suttle, 2010; Craig et al., 2016; Coates et al., 2016; Dixon et al., 2020a). La principal causa de esta deficiencia en los bovinos es el constante (al menos 4 - 6 meses al año) y bajo aporte dietético de P (Call et al., 1986; Dixon et al., 2020b). Sin embargo, bajas concentraciones de vitamina D<sub>3</sub> o excesos de Fe, Ca y/o Mg pueden desencadenar secundariamente deficiencias de P en los animales (Suttle, 2010; Constable et al., 2017).

La osteomalacia tiene una marcada distribución geográfica ya que generalmente ocurre en áreas con bajas concentración de P en el suelo (< 4-5 mg/kg) y en el forraje (< 2 g kg/MS) (Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020a). También, debido a que las concentraciones de P son menores en las gramíneas que en las leguminosas, y en los forrajes secos (senescentes) que en los forrajes verdes, la enfermedad se ve con mayor frecuencia en campos naturales con predominio de gramíneas perenes y en épocas de sequías o estaciones secas (Judkins et al., 1985; Ungerfeld, 1998; Dixon et al., 2020a). Sin embargo, también se ha reportado, la deficiencia de P en animales, en años con régimen de lluvias normales y/o por encima de la media (Tuff, 1923; Rubino, 1934; Schild et al., 2021a). La deficiencia crónica de P en los bovinos fue descrita en todas las edades (Cseh et al., 2008; Bomjardim et al., 2015; Constable et al., 2017), pero se observa con mayor frecuencia en animales que tienen altos requerimientos de P como las vacas de primera cría en el último tercio de la gestación y/o primer tercio de la lactación (Rubino, 1934, Dixon et al., 2020a).

#### Deficiencia de fósforo en otras especies

La deficiencia primaria y crónica de P, también puede ocurrir en pequeños rumiantes (Suttle, 2010; Tokarnia et al., 2010; Constable et al., 2017; Barbosa et al., 2018) aunque con mucho menos frecuencia y probablemente debido al mayor consumo de alimento y menores requerimientos en función de peso vivo y el hábito más selectivo de consumo. Es por ello que la deficiencia de P en las ovejas y cabras parecerían ser más resistentes que las vacas (Riet-Correa, 2004; Suttle, 2010; Tokarnia et al., 2010; Craig et al., 2016) y dado los escasos reportes de esta carencia en equinos, estos parecerían ser los más resistentes (Craig et al., 2016). Deficiencias primarias de P también pueden ocurrir en cerdos y aves cuyas dietas o raciones tienen bajas concentraciones de P debido a excesivas concentraciones de fitatos y/o bajos niveles de fitasas (Suttle, 2010). En los carnívoros la deficiencia primaria de P es prácticamente imposible que ocurra debido a que las raciones generalmente contienen adecuadas concentraciones de P, sin embargo, se han reportado casos de raquitismo y osteomalacia, en perros, con alergia alimenticia, que comían dietas desbalanceadas o perros que comían dietas bajas en P que especialmente fabricadas para animales con patologías renales (Craig et al., 2016).

En humanos, la deficiencia de P está asociada principalmente a pérdidas renales de P debido a fallas hereditarias (ej., raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante, raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo, raquitismo hipofosfatémico hereditario con hiper calciuria y síndrome de Fanconi), tumor mesenquimal productor de FGF-23 y/o insuficiencia renal crónica. También la hipofosfatemia ocurre como complicación secundaria de deficiencia de vitamina D, acidosis sistémicas, excesivo uso de antiácidos, neoplasias (carcinomas, mielomas o leucemias), enfermedades gastroentéricas y/o enfermedades hepato biliares que impiden una correcta absorción de P y/o funcionamiento de la vitamina D<sub>3</sub> (Francis & Selby, 1997; Razaque, 2009; Burtis & Bruns, 2015).

## 6.5. SIGNOS CLÍNICOS

En los bovinos son reportados dos cuadros o presentaciones clínicas-patológicas distintas: (i) carencia crónica de P (osteomalacia y raquitismo) y (ii) la carencia aguda de P o hipofosfatemia aguda.

Las vacas de cría con carencia crónica de P evidencian alteraciones en el comportamiento ingestivo como disminución en el consumo voluntario y apetito depravado (alotrofagia o pica) con especial interés en osamentas (osteofagia, **Figura 1**) (Theiler et al., 1924; Rubino, 1928; Tokarnia et al., 1970a; Dixon et al., 2019a), pobre condición corporal, abdomen retraído, emaciación, desmejoramiento del manto piloso, debilidad, tendencia a pasar más tiempo en decúbito, dificultad para incorporarse adoptando posturas antiálgicas (los animales más afectados pasan varios minutos apoyados sobre los carpos), dificultad en la marcha con pasos lentos, cortos y rígidos (**Figura 2**), cifosis, fracturas espontáneas, deformaciones esqueléticas y/o hemoglobinuria posparto (Theiler et al., 1924; Mufarregge, 1999; Tokarnia et al., 2010; Constable et al., 2017). En estos animales la muerte puede ocurrir debido a las fracturas o muchas veces debido a las consecuencias de la osteofagia como la obstrucción esofágica o botulismo (Riet-Correa & Gevehr Fernandez, 2002; Suttle, 2010; Tokarnia et al., 2010; Riet-Correa et al., 2012). En los animales jóvenes con raquitismo asociado a la deficiencia de P se observa, además de los signos ya descritos para adultos, moderado engrosamiento de múltiples articulaciones (**Figura 3**) más evidente en las uniones costo-condrales, anormal curvatura de los huesos largos y retraso e irregular erupción de los dientes con pobre mineralización que pueden conducir a dificultades en la oclusión de la boca y/o prensión de los alimentos (Constable et al., 2017; Schild et al., 2021b).

A pesar de todos los signos antes mencionados las mayores pérdidas de la carencia crónica de P son subclínicas incluyendo: disminución de la resistencia contra enfermedades parasitarias (Tokarnia et al., 2010); retraso en el crecimiento con menor peso al nacer (~10%) (Read et al., 1986a), menor peso al destete (20-40 kg) (Read et al., 1986a; Coates et al., 2019; Dixon et al., 2020a,b) y menor tasa de destete (4-35%) (Mufarregge, 1999); incremento de la tasas de mortalidad (25-30%) debido a la pobre estado corporal (Read et al., 1986a; Dixon et al., 2020a); bajas ganancias o pérdidas de peso (20-120 kg) (Read et al., 1986a; Coates et al., 2019; Dixon et al., 2020a,b); menor producción de leche (~2 kg/día) (Tokarnia et al., 1970a; Dixon et al., 2020b); baja fertilidad de los rodeos con incremento del intervalo entre partos ( $\geq 2$  años) (Tokarnia et al., 1970a; Judkins et al., 1985; Call et al., 1986; Mufarregge, 1999; Coates et al., 2019) y menor tasa de preñez (25-45%) (Mufarregge, 1999; Uriarte et al., 2000; Coates et al., 2019) y/o bajo rendimiento o valor de las carcasas en los frigoríficos (Tokarnia et al., 2010). Todas estas pérdidas están asociadas principalmente a la disminución del consumo voluntario (20-30%) (Kerridge et al., 1990; Dixon et al., 2020a) y conllevan a una disminución de la rentabilidad de esos sistemas ganaderos (Holmes, 1990).

Aunque no es objetivo de este capítulo, brevemente se describe la presentación aguda de la enfermedad o hipofosfatemia aguda. Esta presentación se caracteriza desde el punto de vista bioquímico, por un descenso brusco de la concentración sanguínea de P ( $<0,5$  mmol P/L o  $<1,5$  mg P/dL) y desde el punto de vista clínico por una paresia (incapacidad para generar la marcha o soportar peso) de los miembros posteriores o anteriores con imposibilidad de recuperar la estación, con o sin hemoglobinuria e incluso muerte (**Figura 4**) (Call et al., 1987; Perna, 2009; Mattioli, 2013; Grünberg, 2014; McFarlane & Fleming, 2016). Generalmente, esta presentación ocurre en vacas lecheras en el periparto, con una prevalencia de 35-57% en las vacas caídas, sin embargo, en una base de datos de Inglaterra y Alemania también se ha detectado hipofosfatemia aguda en vacas clínicamente sanas con una prevalencia del 10-15% (Grünberg, 2014). Adicionalmente la hipofosfatemia aguda también se ha descrito en ganado de carne en cualquier momento de su ciclo reproductivo (Perna, 2009).



**Figura 1. Carencia de fósforo en bovinos. A-C.** Vacas con buena condición corporal que están comiendo huesos (osteofagia), indicando que este es uno de los primeros signos clínicos en aparecer. **D.** La vaca está lamiendo la pared, note las depresiones imprimidas a causa de este hábito. **E-F.** Las vacas y un novillo están lamiendo piedras. Las fotografías A, B, C y D fueron tomadas en establecimientos del departamento de Artigas, mientras que las fotografías E y F fueron tomadas en establecimientos del departamento de Tacuarembó.



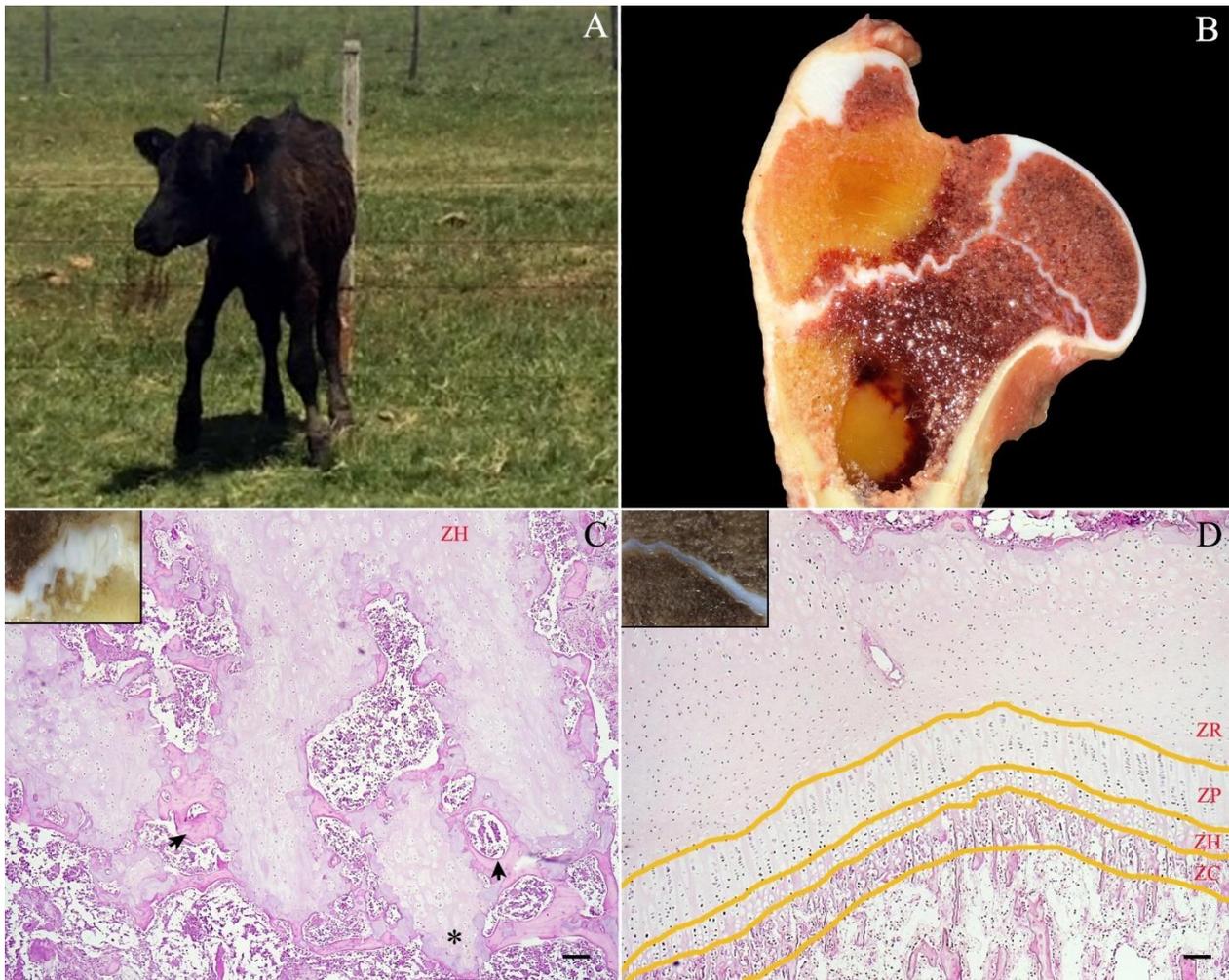
**Figura 2. Vacas con severa osteomalacia.**

**A.** La vaca evidencia pobre condición corporal, abdomen retraído, cifosis y una postura antiálgica debido al dolor. La fotografía es una cortesía del Dr. Franklin Riet-Correa, tomada durante un brote que ocurrió en 1969 en Tacuarembó, Uruguay.

**B. Fotografía obtenida del artículo original escrito por Theiler et al., 1927.**

La vaca evidencia la clásica postura antiálgica conocida como arrodillamiento que frecuentemente se observa previo a la muerte.





**Figura 3. Raquitismo debido a carencia de fósforo.** **A.** Ternera de 10 meses de edad. El animal evidencia emaciación, pobre desarrollo, pelo opaco, engrosamiento de las articulaciones y aumento del plano de sustentación debido a la debilidad y/o dificultad para desplazarse. **B. Húmero.** Las placas de crecimiento están focalmente engrosadas y tortuosas y la médula ósea multifocalmente esta hiperémica. **C. Placa fisiaria raquíutica.** Se evidencia pérdida de la arquitectura con severo engrosamiento de la zona hipertrófica (ZH) formando proyecciones digitiformes e islas (\*) de condrocitos desorganizados e hipertróficos retenidos en la metáfisis. Note la presencia de matriz osteoide no mineralizada (flechas negras). Coloración HE. Barra = 100  $\mu$  m. En la esquina superior izquierda se evidencia una magnificación macroscópica de la microfotografía. **D. Placa fisiaria normal.** Se evidencia la arquitectura fisiaria normal de una ternera de similar edad. Esta ternera fue criada sobre suelo y pastura con valores adecuados de P (19,6 mg P extraíble en bicarbonato de sodio/kg en el suelo y 2,6 g P/kg MS en forraje). En la placa se pueden distinguir (separadas por líneas amarillas) las 4 zonas clásicas del cartílago de crecimiento: de reserva (ZR), proliferativa (ZP), hipertrófica (ZH) y de calcificación (ZC). Coloración HE. Barra = 100  $\mu$  m. En el recuadro superior izquierdo se evidencia una magnificación macroscópica de la microfotografía.



**Figura 4. Hipofosfatemia aguda en vacas lecheras. A-B.** La misma vaca en estación (A) y caída en (B), evidenciando también debilidad, cifosis y aumento del plano de sustentación. **C-D.** Vacas severamente afectadas evidencian decúbito lateral (C) y hemoglobinuria (D). Las fotos son una Cortesía del Dr. Martín Allassia y del Dr. Emanuel Angelli del Hospital de Grandes Animales de Facultad de Ciencias Veterinarias de Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina.

## 6.6. LESIONES

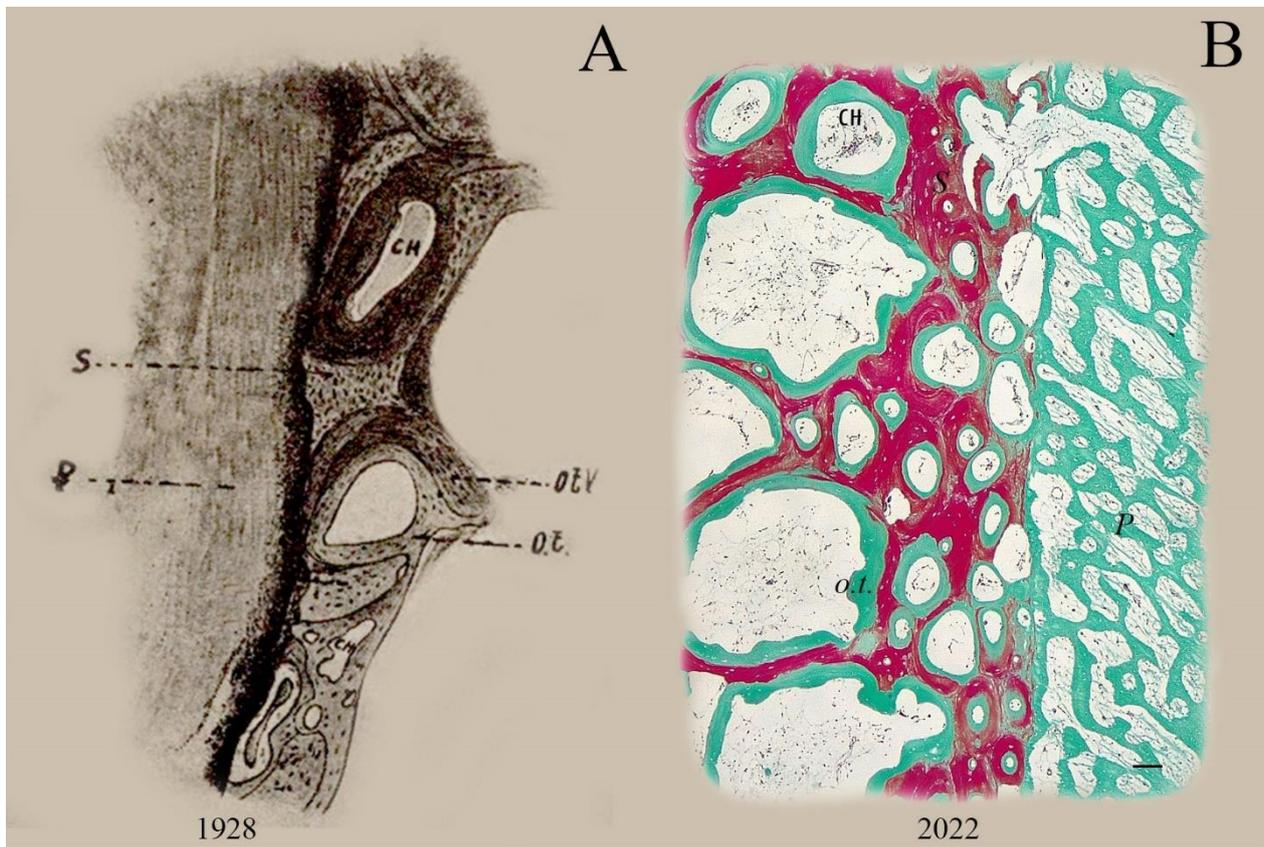
En la deficiencia crónica de P, los animales adultos tienen múltiples fracturas y/o callos óseos de reparación correspondientes a fracturas previas (más frecuentes de observar en las costillas, **Figura 5a**), irregularidades de la superficie articular con erosión del cartílago y del tejido óseo subyacente con o sin formación de osteofitos (**Figura 5b**) (Rubino, 1928; Rose 1954; Tokarnia et al., 1970a; Shupe et al., 1988; Dutra, 2011b; Schild et al., 2021a). Además, hay un aumento de fragilidad de los huesos al punto que los mismos se quiebran con facilidad o se cortan con un cuchillo, y debido a la baja densidad o peso específico, después de macerados, los huesos pueden flotar en agua (**Figura 5c**). En los animales severamente afectados se pueden observar deformaciones óseas del esqueleto (**Figura 5d**) (Tokarnia et al., 2010). En algunos huesos largos como las costillas, escapula, y/o húmero es posible apreciar una marcada disminución del espesor del hueso cortical y/o aumento del diámetro de la cavidad medular (Tokarnia et al., 2010; Coates et al., 2016; Constable et al., 2017). Debido a que la carencia crónica de P en los animales jóvenes produce retraso en crecimiento es posible que la severidad de las lesiones sea menor en comparación con otras causas de raquitismo (Craig et al., 2016). Sin embargo, en los animales severamente afectados las lesiones se pueden observar en la región epifisaria de los huesos largos y uniones costo-condrales. En estas regiones las placas de crecimiento están tortuosas, irregulares, con segmentos engrosados, lengüetas,

proyecciones digitiformes y/o islas de cartílago retenidos en la metáfisis (**Figura 3b-c**) (Tokarnia et al., 2010; Craig et al., 2016).

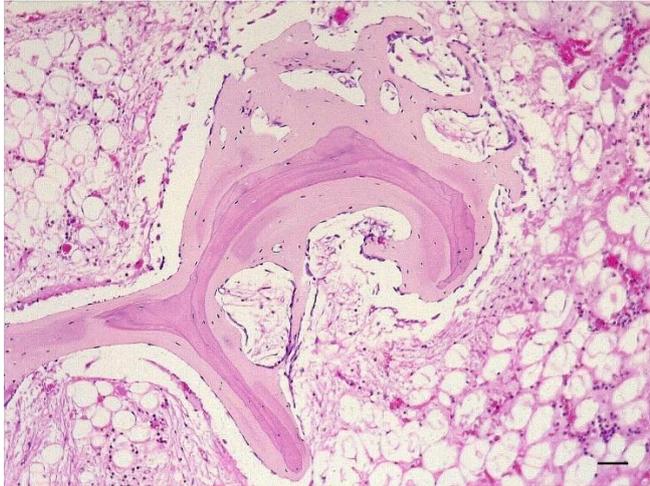


**Figura 5. Hallazgos macroscópicos de la carencia de P en animales adultos. Todas las Fotografías fueron obtenidas de Tokarnia et al. (2010). A. Equino. Note los callos óseos de fracturas en reparación en múltiples costillas. B. Búfalo. La cabeza de fémur tiene acentuada erosión de la superficie articular. C. Ovino. La tibia y fémur (post maceración) flotando en agua debido al bajo peso específico de los huesos. D. Búfalo. Acentuada escoliosis en S de la columna vertebral (post maceración).**

Microscópicamente en el tejido óseo de los animales adultos suele haber marcada osteopenia con hiperplasia del periostio e incluso hiperostosis no mineralizada. Los canales Haversianos están severamente dilatados o expandidos y cubiertos de matriz osteoide no mineralizada de un grosor anormal de color rosado claro con Hematoxilina y Eosina y de color verde con Tricrómico de Masson-Goldner en tejido descalcificado (**Figura 6**). En las áreas más afectadas es posible ver ‘lagunas de Howship’, que son túneles o canales de reabsorción ósea, en los cuales se ven múltiples osteoclastos, osteoblastos activos y osteocitos de revestimiento. La anormal deposición de tejido osteoide no mineralizado (de exagerado grosor y con bordes ondulantes o festoneados) rodeado de osteoblastos también se aprecia en las delgadas trabéculas mineralizadas (**Figura 7**). Este incremento exagerado de tejido osteoide no mineralizado puede ser medido o cuantificado con estudios histomorfométricos, donde en animales con severa deficiencia de P es esperable observar >30 % de tejido osteoide no mineralizado (Olson & Carlson, 2017; Dixon et al., 2020b). En los animales jóvenes con raquitismo además de los cambios arriba descritos, en las placas de crecimiento, se observa un aumento del número de condrocitos (desorganizados, hipertróficos con degeneración y/o necrosis) en la zona hipertrófica que forman proyecciones digitiformes y/o islas que llegan hasta la metáfisis y que pueden estar rodeados o no de tejido osteoide no mineralizado (**Figura 3**) (Craig et al., 2016).



**Figura 6. Osteomalacia en Bovinos. A.** Costilla coloreada con Azul de Unna obtenida de Rubino, 1928. En la imagen se nota el engrosamiento de periostio (P), delgado espesor del hueso cortical, dilatación de los canales de Havers (CH), los cuales están rodeados de tejido osteoide no mineralizado (o.t., otv) y áreas de tejido óseo normal o sano (S). **B.** Costilla con las mismas lesiones en el hueso cortical. El periostio evidencia hiperostosis no mineralizada. Coloración con Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 100  $\mu$  m.



**Figura 7. Deficiencia crónica de fósforo en bovinos. Costilla.** La delgada trabécula mineralizada es cubierta de una exagerada cantidad de tejido osteoide no mineralizado (rosado claro) cuyos bordes libres son festoneados, flameantes y/o espinosos. HE. Barra = 100  $\mu$  m.

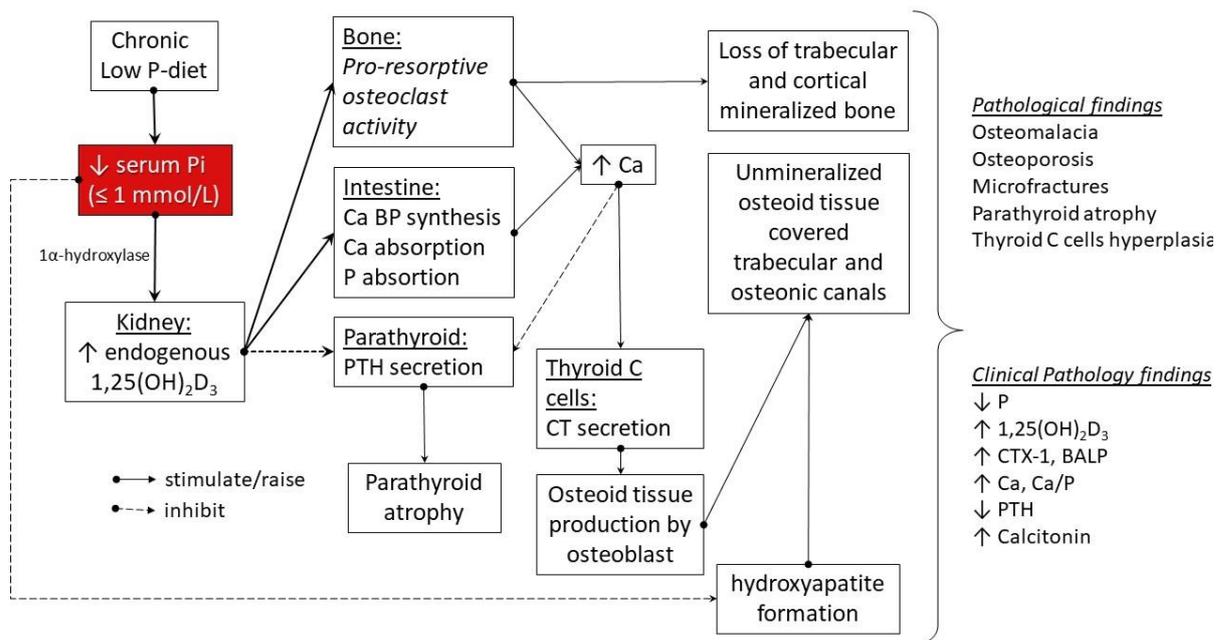
## 6.6. PATOGENIA

En la osteomalacia de los bovinos el constante bajo aporte dietético de P y las altas demandas metabólicas del mineral principalmente durante el crecimiento, último tercio de gestación y/o lactación, desencadenan una reabsorción y/o movilización ósea de P con el fin de aliviar la deficiencia de este mineral. Si el animal es suplementado con cantidades adecuadas de P, cubriendo o excediendo los requerimientos diarios de P, el proceso patológico se detiene y la situación progresivamente se revierte.

Los bajos aporte dietéticos de P, durante un periodo prolongado, conllevan a bajas concentraciones sanguíneas de P inorgánico ( $P_i$ ), esta condición posiblemente estimula un incremento en activación de Vitamina  $D_3$  vía  $1\alpha$ -hidrolasa renal (Ternouth, 1990; Burtis & Bruns, 2015; Anderson et al., 2017). Este incremento de las concentraciones de Vitamina  $D_3$  activa, tiene varios efectos: (i) en los huesos estimula la diferenciación y activación osteoclástica mediante la estimulación osteoblástica del “*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B [NF $\kappa$ B] ligand – RANKL*” (Burtis & Bruns, 2015; Rosol & Gröne, 2016, Nakamichi et al., 2018). Cuando el RANKL se une estrechamente al “*membrane receptor RANK*” presente en células progenitoras de osteoclastos (derivadas de la médula ósea) se produce la diferenciación y activación osteoclástica, responsables de la importante reabsorción ósea observada. (ii) en el intestino estimula la absorción intestinal de P y Ca (Ternouth, 1990; Anderson et al., 2017; Miller, 2017) y (iii) en la glándula paratiroidea inhibe la producción y liberación de parathormona (PTH) dada la retroalimentación negativa (McGrath et al., 2013; Burtis & Bruns, 2015; Rosol & Gröne, 2016). En Uruguay, la gran mayoría de los campos naturales contienen altas o normales concentraciones de Ca y bajas de P (Ungerfeld, 1998); en estas condiciones y asociado a un aumento (no tóxico) de la vitamina  $D_3$  endógena activa, es frecuente que las vacas tengan hipercalcemia o niveles normales de Ca con hipofosfatemia. Los niveles elevados de Ca también ejercen un efecto de retroalimentación negativa en la secreción de PTH, y estimulan las células C de tiroides a producir calcitonina (CT) (McGrath et al., 2013; Rosol & Gröne, 2016, Anderson et al., 2017). La CT posiblemente estimule la producción osteoblástica de matriz osteoide (Rodríguez Vieyetz, 1995); sin embargo, en estas condiciones dada la apropiada concentración de Ca, pero baja concentración de P, los osteoblastos no pueden iniciar el proceso de mineralización con la consecuente acumulación de osteoide no mineralizado. Estas adaptaciones endocrinas y/o metabólicas que las vacas desarrollan ante la deficiencia crónica de P inducen cambios patológicos en el organismo que se traducen en osteomalacia (defectiva mineralización), con o sin osteoporosis

(cantidad anormal) y atrofia de glándula paratiroides con o sin hiperplasia de las células de C de tiroides, un resumen del mecanismo patogénico se detalla en la **Figura 8**.

Varios estudios en Australia realizados en vacas que consumían dietas deficientes en P evidenciaron bajas concentraciones de P y PTH y altas concentraciones Ca, relación Ca/P, Vitamina D<sub>3</sub> activa y otros indicadores de reabsorción ósea (ej. carbono terminal del teleopeptido de colágeno tipo I -CTX-I- y fosfatasa alcalina ósea -BALP-) en sangre (Anderson et al., 2017; Dixon et al., 2020b). Adicionalmente, algunos artículos científicos describen similares hallazgos clínico-patológicos en humanos que desarrollaron hipofosfatemia crónica (Francis & Selvy, 1997; Bhan et al., 2010; Burtis & Bruns, 2015) reforzando de esta manera la patogenia planteada para los bovinos.



**Figura 8.** Mecanismo patogénico de la deficiencia crónica de fósforo en bovinos. Las flechas (↓) y (↑) corresponden a bajas o altas concentraciones respectivamente.

Un interrogante que surge al desarrollar e interpretar este cuadro es la ausencia de la inhibición osteoclástica mediada por la CT, considerando que los osteoclastos son las células óseas con mayor cantidad de receptores de CT (Rodríguez Vieyetz, 1995; Rosol & Gröne, 2016). Dos posibles hipótesis podrían responder esta pregunta, dado un ambiente con bajo P y alta (no tóxica) concentración de Vitamina de D<sub>3</sub> activa: (i) es posible que esta Vitamina D<sub>3</sub> disminuya la expresión génica de receptores de CT en los osteoclastos y/o (ii) es posible que esta Vitamina D<sub>3</sub> induzca la producción de ligandos, receptores o proteínas que bloqueen los receptores osteoclásticos para CT. Estas hipótesis deben ser estudiadas con mayor profundidad.

En la hipofosfatemia aguda no está muy clara la patogenia, pero Perna (2009) plantea que: debido a fallas en la rápidas movilización ósea del mineral y/o excesivas pérdidas (ej., durante la lactación) sumado a la falta de aporte dietético de P (forraje o suplemento), se desencadena un rápido descenso de la fosfatemia que compromete funciones vitales como transferencia y uso de energía mediada por ATP, ADP; AMP cíclico, fosfato de creatina y/o GTP (guanosin trifosfato), las cuales se traducen en una insuficiencia del sistema muscular que se manifiestan con debilidad, caídas e incapacidad para levantarse.

## 6.7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad es fundamental para su control y prevención. En animales con osteomalacia o raquitismo la evaluación conjunta de signos como alotrofia, osteofagia y fracturas espontáneas, osteopenia (pérdida de masa ósea) determinada por la prueba de la aguja y la determinación de la concentración de P en sangre, son excelentes herramientas para el diagnóstico de la enfermedad (Schild et al., 2021a).

La prueba de la aguja es una excelente herramienta de diagnóstico de rodeo, y se utiliza para evaluar el grado de mineralización de las apófisis transversas de las vértebras lumbares, indicando la presencia o no de severa osteopenia en los animales (Tokarnia et al., 2010). La prueba consiste en intentar atravesar las apófisis transversas de las vértebras lumbares con una aguja 18G (Tokarnia et al., 2010; Malafaia et al., 2018); si se logra penetrar la apófisis traspasándola fácilmente (con una fuerza similar a la aplicación de un inyectable intramuscular) los animales tendrán 'severa osteopenia'. Si no es posible traspasar la apófisis los animales no tendrán 'severa osteopenia', sin embargo, este último resultado no significa un estatus adecuado de P, ya que los animales pueden tener deficiencia subclínica. (Schild et al., 2022).

Bioquímicamente, en la sangre de los animales afectados hay una marcada disminución de concentración de P y PTH asociado a incrementos de las concentraciones de Ca, relación Ca/P, Vitamina D<sub>3</sub> activa, BALP y CTX-1 (Anderson et al., 2017; Dixon et al., 2020b). Sin embargo, estos últimos 3 son menos usados rutinariamente por los laboratorios clínicos veterinarios. Otros análisis complementarios que pueden ayudar a orientar el diagnóstico, es la observación de una menor densidad ósea en las radiografías (mayor radio lucidez) o la presencia de >30% de tejido osteoide no mineralizado en los estudios histológicos (Shupe et al., 1988; Craig et al., 2016; Dixon et al., 2020b). La concentración de P en hueso es un buen indicador, sin embargo, también presenta algunas limitaciones como la obtención y el procesamiento de las muestras, por lo que generalmente se restringe su uso para investigación o para diagnóstico en animales muertos (Little, 1972; Read et al., 1986b; Grünberg, 2014; Malafaia et al., 2017). La respuesta a un tratamiento específico y/o realización de experimentos o ensayos de prueba usando una mezcla de sales con el mineral deficiente o sospechoso de ser deficiente también puede considerarse otra forma de diagnóstico (Tokarnia et al., 2000).

Ante un brote de osteomalacia también se debe determinar o estimar la concentración de P en el forraje con el objetivo de definir el tratamiento más apropiado (Schild et al., 2021a). En casos de obtener valores adecuados de P en las pasturas (> 2 g P/kg MS) sería necesario realizar mediciones de otros minerales que pueden afectar la absorción de P como el Ca, Mg y Fe o evaluar otro diagnóstico diferencial que curse con signos y lesiones similares como la deficiencia de vitamina D; sin embargo, en esta deficiencia hay hipocalcemia y altas concentraciones de PTH debido al hiperparatiroidismo nutricional secundario (Dittmer & Thompson, 2011; Constable et al., 2017). Otro diagnóstico diferencial es la intoxicación crónica con flúor caracterizado principalmente por hipoplasia de esmalte dental, osteoporosis con atrofia de osteoblastos y concentraciones tóxicas de F en la ceniza ósea. (Riet-Correa et al., 1983; Jubb & Crough, 1988).

### Factores in vivo y preanalíticos que pueden afectar la concentración fósforo inorgánico en sangre

Dada la sencillez, rapidez y bajo valor económico, el análisis de la concentración de fósforo inorgánico (Pi) de un grupo de 10-15 animales sigue siendo una excelente herramienta para el diagnóstico de la carencia crónica de P (Read et al., 1986c; Dixon et al., 2020a). Concentraciones <1 mmol de P/L en sangre son sugestivas de severa deficiencia crónica de P; sin embargo, hay factores

*in vivo* o *preanalíticos* (durante o post extracción de la muestra) que deben ser considerados para interpretar los resultados correctamente (Fletcher et al., 2016; Dixon et al., 2020a; Campos & Sanguinett, 2021). En cuanto a los primeros, los factores *in vivo*, el estado fisiológico debe ser considerado ya que las vacas en las últimas semanas de gestación y primeras semanas de lactancia tienen valores más bajos de Pi que en otros estadios fisiológicos y que otras categorías de animales (ej. terneros en crecimiento) (Sharifi et al., 2007; Benvenuti et al., 2015; Krsmanovic et al., 2015). Por otro lado, como el contenido de P de la dieta se refleja en la concentración de Pi en sangre (Suttle, 2010; Quigley et al., 2015) el manejo de la dieta, previo a la extracción, es otro factor a considerar a la hora de interpretar las concentraciones de Pi. Por ejemplo, animales que pastorean praderas fertilizadas con P, o con alta proporción de leguminosas o cuya dieta es complementada con granos y/o suplementos minerales con P, tienen concentraciones sanguíneas de Pi mayores que animales que pastan en praderas con bajas concentraciones de P con predominio de gramíneas nativas, sin fertilización fosfatada y/o sin suplementación mineral (Coates, 1994; Suttle 2010). Además, algunas enfermedades que causan lesiones renales crónicas, crisis hemolíticas (ej. leptospirosis, babesiosis, intoxicación con Cu, etc.), desbalances dietéticos de la relación Ca:P (ej. urolitiasis), excesos de Vitamina D (ej., intoxicación con: *Solanum glaucophyllum*, *Nierembergia rivularis*, etc.) y/o deficiencia de vitamina D pueden evidenciar cambios en concentración de Pi (Cantón et al., 2008; Odriozola, 2008; Dittmer & Thompson, 2011; Sacco & Souza Lopez, 2011; Schild et al., 2021c).

En cuanto a los factores ‘preanalíticos’, debido a que la concentración de P en el interior de los eritrocitos es mayor que en el plasma o suero (Grünberg, 2014), la hemólisis o hidrólisis de los glóbulos rojos, deriva en una mayor cantidad de Pi libre (Little et al., 1971; Sharifi et al., 2007; Grünberg, 2014). En este sentido aquellos factores que durante y después de la toma de las muestras generen hemólisis podrían modificar la verdadera concentración de Pi y por ende la interpretación de los resultados (Campos & Sanguinett, 2021). Estudios recientes evidenciaron diferencias en las concentraciones de Pi medida en suero o plasma, así como diferencias en las concentraciones de Pi entre las muestras obtenidas de vena yugular en comparación de las muestras obtenidas de la vena coccígea del mismo animal (Montiel et al., 2007; Fletcher et al., 2016; Campos & Sanguinett, 2021). También se han observado aumentos de las concentraciones de Pi en función del tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra en los corrales hasta su procesado en el laboratorio, menos evidente con el uso de ácido tricloroacético al 5% bufferado (Little et al., 1971; Campo & Sanguinett, 2021). En Uruguay no se observaron diferencias significativas entre el Pi obtenido del suero y el obtenido del plasma (Campos & Sanguinett, 2021). Grünberg (2014) asoció las bajas concentraciones de Pi de las muestras obtenidas de la vena yugular a una mayor retención de P para ser excretado en las glándulas salivales; sin embargo, Campos & Sanguinett (2021) lo asociaron a un menor grado de hemólisis debido al mayor calibre de la vena yugular.

## 6.8. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Las mezclas minerales sueltas comúnmente conocidas como “sales minerales”, mezclas comprimidas en bloques o mezclas minerales para ser disueltas en el agua, todas, son excelentes métodos para administrarle P a las vacas de cría; sin embargo, el mayor desafío es lograr una adecuada ingesta de P (Winks, 1990; Karn, 2001; Dixon et al., 2003). Adicionalmente, hay que considerar la fuente o la calidad de P ofrecido ya que los fosfatos monocálcicos (FMC), fosfatos di o bicálcicos (FDC), fosfatos tricálcicos (FTC) y/o roca fosfórica tienen distinta solubilidad y biodisponibilidad. La solubilidad *in vitro* medida en ácido cítrico o citrato de amonio solamente puede usarse para evaluar la calidad de la fuente de P ya que no son suficientemente reales para evaluar la biodisponibilidad de P (Dixon et al., 2020a).

Ante un brote de osteomalacia el tratamiento utilizado consiste en administrar sales con  $\geq 80 - 100$  g P/kg de buena calidad (ej., FDC con  $\geq 90\%$  de solubilidad en ácido cítrico) vía oral *ad libitum* suministrada como mezcla suelta que cubra y/o exceda los requerimientos diarios durante al menos 3-4 meses (Schild et al., 2022). Hay que considerar, que debido a las avanzadas lesiones en el sistema locomotor algunas de las vacas severamente afectadas (5-20%) no consumirán o consumirán menos sales minerales que el resto de los animales, por lo que es necesario prolongar el tratamiento u ofrecerles fórmulas más atractivas (ej., con bajo cloruro de sodio o con melaza) (Dixon et al., 2003). A estos animales se los puede separar del rodeo facilitándoles el acceso a las sales minerales, también se debe evitar el encierro o paso por los corrales, tubos o mangueras ya que corren riesgo de fracturarse. Las vacas caídas con incapacidad para levantarse tienen mal pronóstico, principalmente si se evidencian fracturas, igualmente es indispensable proporcionarles confort y cambiarlos de posición varias veces al día para evitar complicaciones o daño por compresión (Perna, 2009). En Australia, los super-jugos de P mezclados con el alimento también permitieron la recuperación clínica en un alto porcentaje de vacas enfermas (Jubb & Crough, 1988), mientras que el uso de formulaciones inyectables (recomendadas para la presentación aguda de la enfermedad) no son efectivas para revertir la presentación crónica de la enfermedad (Soto & Reinoso, 2012; Mattioli, 2013; Schild, et al., 2021a).

Otras medidas de manejo deben realizarse conjuntamente tal como el destete de los terneros, ya que de esta forma se logra bajar los requerimientos diarios de P de las vacas afectadas durante la lactancia (Rubino, 1934; Schild et al., 2022). En este sentido, debe considerarse que el destete abrupto de los terneros podría desencadenar en un incremento de nuevos casos en comparación con el destete gradual con tablillas nasales. Esto se debe a que las vacas de cría, cuyos terneros fueron destetados abruptamente, pasan 2 o 3 días buscando sus hijos sin comer y con mayor actividad física. Con el objetivo de no retrasar la recuperación de los animales, otra medida de manejo a implementar sería la suplementación con otros nutrientes esenciales, si los forrajes son escasos y además tienen de moderada a baja calidad energética y proteica (Dixon et al 2020a). Cuando se prevean años de sequías siempre que sea posible es aconsejable bajar la carga animal de los campos para que los animales dispongan de una adecuada oferta de alimento (Miller et al., 1990).

Para prevenir la carencia de P, en establecimientos con antecedentes de osteomalacia, o establecimientos donde se sospecha de la enfermedad, la mejor herramienta es la suplementación oral con sales minerales fosfatadas administradas *ad libitum* durante el periodo donde la concentración de P en las dietas sea la principal limitante (Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020a). En nuestra región este periodo generalmente ocurre en primavera e inicio de verano, coincidiendo con las mayores demandas de P en las vacas. La concentración de P en el suplemento mineral a usar estará en el rango de 60 - 100 g P/kg, dependiendo de la disponibilidad de P del forraje. El uso de sales minerales, sin el correcto asesoramiento técnico posiblemente no producirá la respuesta esperada, generando así recurrentes errores en la suplementación mineral y desconfianza en su efectividad (Peixoto et al., 2005; Dixon et al., 2011). También se debe considerar, en el uso de sales minerales, la presencia de elementos peligrosos como el flúor (máximo aceptable hasta 30-50 mg/kg), Cu, Se y/o S (Jubb & Crough, 1988) que vienen incluidos en las formulaciones y pueden ser riesgosas sin el correcto asesoramiento técnico.

Otras estrategias preventivas incluyen la fertilización fosfatada del campo natural y/o uso de praderas con las cuales se logra marginalmente aumentar la producción forrajera y un importante incremento en la concentración de P de la dieta (Winks, 1990; Coates, 1994; Mufarregue, 1999). Sin embargo, su uso es limitado debido a escasa respuesta económica y a que en ciertas áreas no es posible ingresar maquinarias. Adicionalmente el uso indiscriminado de la fertilización con P y sin un correcto

asesoramiento técnico también puede acarrear consecuencias ambientales como la eutrofización de las aguas con sobrecrecimientos de las algas e incorporación o aumento de metales pesados como cadmio, arsénico, plomo y/o mercurio en los suelos, aguas, plantas y animales (Suttle, 2010). En situaciones en que la concentración de P en los forrajes de los campos naturales es extremadamente baja (ej., <0,5 g P/kg MS) es probable que no sea posible cubrir los requerimientos diarios de P de los animales con los clásicos suplementos minerales orales que contienen altas concentración de P (100 - 120 g P/kg) y aun destetando los terneros. En este contexto sería necesario evaluar estrategias integradas (suplementación oral con P, fertilización fosfatada y/o mejoramiento forrajero) para superar la carencia de P.



## 7. CAPITULO 2. OSTEOMALACIA POR DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN VACAS DE CRÍA PASTOREANDO CAMPOS NATURALES DEL NORTE DE URUGUAY

<https://doi.org/10.1177/10406387211025828>

### 7.1. RESUMEN

En este capítulo, describimos la investigación de 4 brotes de osteomalacia que sucedieron entre los años 2018 y 2021. Todos los brotes ocurrieron debido a una severa deficiencia de fósforo (P) afectando principalmente a vacas de cría en lactación que pastaban en campos naturales. Las vacas exhibieron alotrofia, dificultad para pararse y caminar, fracturas de costillas y pérdida progresiva de peso (89 kg,  $P = 0,001$ ) incluso con una adecuada disponibilidad de forraje (~1500 kg/MS). En el examen patológico de 3 vacas, observamos osteomalacia, osteoporosis, atrofia de la paratiroides e hiperplasia de las células C de la tiroides. Las concentraciones de P en el suelo (3,5 mg/kg), P en el forraje verde (1,1 g/kg), P inorgánico (Pi) en suero (0,89 mmol/L) y P en las costillas (81 mg/mL) fueron todas bajas. Aunque suplementos minerales inyectables o mezcla mineral en bloques o suelta habían proporcionado P adicional en 2 de los 4 brotes, estas cantidades suplementarias fueron insuficientes para prevenir y/o controlar la deficiencia de P. El P ofrecido en la dieta (pasto y suplementos minerales) solo habría proporcionado el 20-55% de los requerimientos diarios de P de las vacas (~21 g P/día). En todos los brotes, la osteomalacia ocurrió como resultado de una severa deficiencia de P en el suelo y el forraje, y en 2 brotes además estuvo asociado a una suplementación inadecuada de P. La presencia de signos clínicos, osteopenia determinada por la prueba de la aguja y el análisis de Pi en suero, juntas, son excelentes herramientas de diagnóstico para la deficiencia de P. Además, para el control de la deficiencia de P en las vacas de cría que pastan en campos nativos es necesario la estimación de la concentración de P en el forraje para poder suplementar el P adicional necesario para cubrir los requerimientos diarios de los animales.

**Palabras claves:** deficiencia de fósforo, osteomalacia, pasturas naturales, vacas de cría, Uruguay

## 7.2. INTRODUCCIÓN

La ‘osteomalacia’ o ‘mal de las paletas’ es una enfermedad que ocurre en muchas especies de animales y que está asociada a una falla en la mineralización del tejido óseo (Dittmer & Thompson, 2011; Burtis & Bruns, 2015). En los bovinos, usualmente, la osteomalacia es causada por una deficiencia dietética de P (Craig et al., 2016). Los principales signos clínicos de osteomalacia en los bovinos son alotrofagia o pica (habito de lamer o roer piedras y/o huesos), severa pérdida de peso, dificultad para levantarse y caminar, fracturas óseas y ocasionales muertes. Sin embargo, las principales pérdidas son subclínicas debidos a los bajos pesos y baja fertilidad llevando, a una disminución de la rentabilidad de los sistemas de producción ganadera (Holmes, 1990; Uriarte et al., 2000; Coates et al., 2019; Dixon et al., 2020b).

La osteomalacia asociada a la deficiencia de P, como la observada en bovinos de carne criados en campos naturales, ocurre cuando los suelos y pastos contienen menos de 4-5 mg de P/kg y < 2,0 g de P/kg de materia seca (MS), respectivamente (Dixon et al., 2020a). Estas deficiencias de P son frecuentes en pastos de bajos recursos forrajeros como en ciertas regiones de Argentina (Mufarрге, 1999), Australia (Rose, 1927), Brasil (Tokarnia et al., 2010), Estados Unidos, (Shupe et al., 1988) y Sudáfrica (Read et al., 1986a). En Uruguay, esta deficiencia de P fue reconocida al inicio del siglo pasado (Rubino, 1928), afectando generalmente a las vacas en lactación que comen forrajes de los campos naturales, los cuales comprenden ~11,2 millones de hectáreas y sustentan a ~5,9 millones de vacas y vaquillonas (DIEA, 2020). Estos pastos nativos típicamente tienen bajas concentraciones de P en el suelo (2.5–9 mg P/kg) (CIAAB, 1971) y forrajes (0.2–4.2 g P/kg) (Ungerfeld, 1998).

En Uruguay, la osteomalacia fue descrita por primera vez por el Dr. Acosta Churruca antes de 1917, momento en que el Dr. Rubino comenzó a estudiar la enfermedad exhaustivamente (Rubino, 1928, 1934). Desde entonces hasta la fecha se han descrito en la literatura nacional al menos 9 brotes de osteomalacia con una morbilidad promedio de 7,2% y mortalidad de 0,8%. La enfermedad fue descrita en los departamentos Cerro Largo, Durazno, Flores, Lavalleja, Río Negro, Rocha, Tacuarembó, y Treinta y Tres tanto en periodos de sequía como lluviosos (Rubino, 1928, 1934; Dutra, 2009a,b, 2011a,b). Debido a que la enfermedad es bien conocida por los productores y veterinarios, es probable que muchos brotes no fueron notificados a los laboratorios de diagnóstico y/o publicados en la literatura. Adicionalmente, sin reportar brotes de enfermedad, otros estudios nacionales evidencian bajas concentraciones de P en sangre de los animales además de bajas concentraciones de P en suelo y forraje (Pittaluga et al., 1980; Cuenca et al., 1981; Guerrero & Colucci, 1987; Uriarte et al., 2000; Pittaluga, 2009; Carriquiry & Frade 2017). Por esto, es posible que, en varias regiones del país donde se cría ganado vacuno de forma extensiva, los requerimientos de P aún no sean debidamente cubiertos por el campo natural, limitando severamente la producción.

En áreas endémicas con deficiencia de P, la suplementación mineral con P y/o fertilización con P puede prevenir la osteomalacia y mejorar la producción ganadera (Coates, 1994; Mufarрге, 1999; Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020a). Sin embargo, existen algunas limitantes o errores en el manejo de las sales minerales, por ejemplo, la suplementación mineral puede no ser efectiva debido a (i) inadecuada ingesta del P suplementario, (ii) administración insuficiente, y/o (iii) administración suficiente de P, pero por un corto período (Peixoto et al., 2005; Dixon et al., 2011). La falta de uso de sales minerales y/o el incorrecto uso de éstas pueden ser el origen de la ocurrencia de brotes de osteomalacia en Uruguay. En este capítulo describimos 4 brotes de osteomalacia en vacas de cría de establecimientos ganaderos de Uruguay.

### 7.3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de los brotes se realizó a partir de las consultas, de los Médicos Veterinarios, recibidas en el Núcleo de Salud Animal de Tacuarembó entre marzo 2018 y marzo de 2021. Durante ese período fueron registrados 4 brotes de carencia crónica de P en animales adultos. En cada establecimiento se registraron los datos epidemiológicos y se inspeccionaron clínicamente los animales enfermos. Adicionalmente, se registraron los pesos, las categorías afectadas, presencia de osteopenia según la clasificación la prueba de la aguja en la apófisis transversa de vértebras lumbares (descrita más abajo) y se colectaron muestras de sangre de animales con y sin signos clínicos. También, se colectaron muestras de forraje y suelo de los potreros donde ocurrieron los brotes y se realizaron 3 necropsias.

#### Datos epidemiológicos

Todos los brotes ocurrieron en vacas que pastaban en potreros de campo natural dominado por gramíneas perenes C4 y que nunca habían sido fertilizados con P. En 2 de los 4 establecimientos se realizaba suplementación mineral al ganado.

El brote 1 ocurrió en febrero de 2019 en un rodeo Aberdeen Angus y sus cruza de un establecimiento ganadero ubicado en el departamento de Cerro Largo, Uruguay. El establecimiento tenía un lote de 350 vacas primíparas y multíparas en lactación, de 3 a 8 años de edad y con terneros al pie (3½ a 6 meses de edad) que pastaban en un potrero de 700 ha. Desde abril de 2017 hasta diciembre de 2018, cada 30 días, aproximadamente, todas las vacas habían recibido individualmente 10 mL (0,7-1 g de P) de suplemento mineral inyectable vía subcutánea (Tabla suplementaria 1, suplementos A y B). Adicionalmente, desde septiembre de 2018 hasta febrero de 2019, se administró a todo el rodeo, cada 15 días, sales minerales en bloques (4 a 8 bloques de 10 kg) que contenían 40-55 g P/kg (Tabla suplementaria 1, suplemento C) y con un consumo estimado de 10-11 g de sal (0,4-0,6 g de P). Desde enero hasta febrero de 2019 todas las vacas enfermas, además de los bloques, recibieron individualmente, cada 3-4 días, 20-40 mL (1,8-3,6 g de P) del suplemento mineral inyectable arriba mencionado.

El brote 2 ocurrió en enero de 2020 en un rodeo Hereford y sus cruza de un establecimiento ganadero ubicado en el departamento de Tacuarembó, Uruguay. El establecimiento tenía un lote de 205 vacas primíparas y multíparas en lactación, de 5-6 años de edad y con terneros al pie (2½ a 6 meses de edad) que pastaban en un potrero de 470 ha. En septiembre de 2019 y enero de 2020, todas las vacas recibieron 10 mL (0,7-1 g de P) de suplemento mineral inyectable, arriba mencionado, vía subcutánea. Adicionalmente, desde diciembre de 2019 y por 45 días se administró a todo el rodeo, sales minerales sueltas (600 kg) que contenían con 36-44 g P/kg (Tabla suplementaria 1, suplemento D) estimando un consumo diario de 65 g de sal (2,3-2,8 g de P).

El brote 3 ocurrió en enero de 2021 en un rodeo Hereford y sus cruza de un establecimiento ganadero ubicado en el departamento de Tacuarembó, Uruguay. El establecimiento tenía un lote de 30 vacas primíparas en lactación, de 2 a 3 años y con terneros al pie (2½ a 5 meses de edad) que pastaban en un potrero de 60 ha. No se usaban sales minerales en el establecimiento.

El brote 4 ocurrió en febrero de 2021 en un rodeo Hereford de un establecimiento ganadero ubicado en el departamento de Artigas, Uruguay. El establecimiento tenía un lote de 205 vacas primíparas en lactación, de 2 a 3 años y con terneros al pie (2½ a 5 meses de edad) que pastaban junto con 1000 lanares en un potrero de 500 hectáreas. No se usaban sales minerales en el establecimiento.

En Uruguay en los últimos 30 años el promedio anual de precipitaciones acumuladas fue de 1112 milímetros/año. Para este mismo período, en verano el promedio de precipitaciones acumuladas,

al final de dicha estación, fue de 312 milímetros (GRAS, 2022). En 2019 el promedio anual de precipitaciones acumuladas fue de 1327 mm y al final de la época donde ocurrió el brote 1, las precipitaciones acumuladas fueron 369 milímetros. En 2020 el promedio anual fue de 784 milímetros y al final de la época donde ocurrió el brote 2, las precipitaciones acumuladas fueron 171 milímetros. En 2021 el promedio anual fue de 1047 milímetros y al final de la época donde ocurrió el brote 3 y 4, las precipitaciones acumuladas fueron 346 milímetros. (GRAS, 2022).

### Colecta de muestras y análisis de laboratorio

#### Suelo y forraje

Todas las muestras fueron colectadas en 30 sitios distintos seleccionados aleatoriamente de los mismos potreros donde estaban pastoreando las vacas con signos clínicos. Las muestras de suelo fueron obtenidas de una profundidad de 15 cm (Cuadro, 2019). Las muestras de forraje fueron obtenidas por el método hand plucking (De Vries, 1995) y separadas manualmente en una fracción verde y otra senescente. La disponibilidad de forraje fue medida usando el método comparativo de doble muestreo (Haydock & Shaw, 1975). Las concentraciones de P extraíble en bicarbonato ( $P_B$ ) en suelo y P total en forraje fueron determinadas colorimétricamente por el método de molibdenato de amonio (McKean, 1993) usando un espectrofotómetro (10S VIS, Thermo Fisher Scientific, USA). Además, en los 2 últimos brotes (3 y 4) se determinó en el forraje la concentración total de Ca por absorción atómica (7300 DV, Perking-Elmer, USA) (Jackson, 1964) y la concentración de proteína cruda (PC) utilizando el coeficiente 6,25 x nitrógeno (N) total, el cual fue determinado por el método Kjeldahl (Cabrera et al., 2019).

#### Sangre

Las muestras fueron colectadas de la vena yugular usando jeringas descartables con agujas 18 G, aleatoriamente fueron seleccionadas vacas con signos clínicos de osteomalacia ( $n = 38$ , rango de animales muestreados por establecimiento: 5-14) y sin signos clínicos de osteomalacia ( $n = 39$ , rango de animales muestreados por establecimiento: 6-12). Las muestras de sangre fueron transferidas a tubos de 5 mL con acelerador de la coagulación, centrifugadas ( $2450 \times g$ , a  $4^\circ C$ , 10 minutos) y el suero fue almacenado a  $-20^\circ C$  por 5-7 días. La concentración de P inorgánico ( $P_i$ ) y Ca en suero fueron determinadas por el método phospho-molibdato y reacción de o-cresolphthalein complejone usando un espectrofotómetro automático (Dimension Rxl Max, Siemens Diagnostics - USA).

#### Prueba de la aguja

La mineralización de las apófisis transversas izquierdas de las vértebras lumbares (L4-L5) fueron evaluadas según la técnica descrita por Tokarnia et al, (2010). Las vacas fueron clasificadas como 'con severa osteopenia (pérdida de masa ósea)' si la apófisis era fácilmente atravesada con una aguja 18G haciendo una fuerza similar a la requerida para introducir una aguja en una inyección intramuscular; o como 'sin severa osteopenia' si la aguja no penetraba en el hueso.

#### Necropsia y análisis en huesos

En total 3 necropsias fueron realizadas (2 en el brote 1, y 1 en el brote 3) y en cada una múltiples muestras de tejidos fueron colectadas y fijadas en formol bufferado al 10% durante 48 horas; luego fueron procesadas rutinariamente y coloreados con hematoxilina y eosina (HE) para estudios histopatológicos. Fragmentos óseos (costilla y húmero) luego de haber sido fijados en

formol, fueron cortados a 0,5 cm y descalcificados con EDTA al 12% por 20-30 días. Todos estos fragmentos fueron procesados rutinariamente y colorados con HE y tricrómico de Masson-Goldner. Muestras de la 12<sup>va</sup> costilla izquierda completa o ‘full-core bone sample’ (que incluía tejido óseo cortical externo, tejido trabecular y tejido óseo cortical interno) fueron colectadas frescas, pesadas, secadas a 100 °C, cenizadas a 700 °C y la ceniza fue disuelta en ácido clorhídrico 5N (Little, 1972). La concentración de P y Ca fue medida mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP) (MP4200, Agilent - USA) y calculado por unidad de volumen (según desplazamiento del menisco de agua) de hueso fresco.

#### Análisis estadísticos

Un ANOVA factorial fue realizado para comparar el peso, concentración de Pi, Ca y la relación Ca/P en suero según la ‘presencia’ o ‘ausencia’ de signos clínicos, clasificación de la prueba de la aguja (‘con’ o ‘sin severa osteopenia’), categoría animal (‘primíparas’ o ‘múltiparas’) y la interacción entre éstas 2 últimas variables (prueba de la aguja x categoría). Se calculó la prevalencia de la enfermedad como el número de individuos de la población que tenía hipofosfatemia (<1mmol Pi/L) en un tiempo determinado (visitas a los establecimientos). Los animales fueron considerados como la unidad experimental y los datos fueron analizados usando Stata v. 14.0 (StataCorp, USA).

#### 7.4. RESULTADOS

Las tasas de morbilidad (animales con signos clínicos), mortalidad, letalidad, la prevalencia de hipofosfatemia y la clasificación de los animales según la prueba de la aguja se evidencian en la **Tabla 1**. Es importante destacar que no todas las vacas con signos clínicos fueron clasificadas ‘con severa osteopenia’ y ninguna de las vacas sin signos clínicos fue clasificada ‘con severa osteopenia’ de acuerdo con la prueba de la aguja. Esto pone en evidencia la capacidad de la técnica para detectar animales afectados con mayor severidad.

**Tabla 1.** Tasas de morbilidad, mortalidad, letalidad, prevalencia de animales con hipofosfatemia y proporciones de los animales enfermos que fueron clasificados ‘con’ o ‘sin severa osteopenia’ según la prueba de aguja en las apófisis transversas de las vértebras lumbares realizada durante las visitas a los establecimientos.

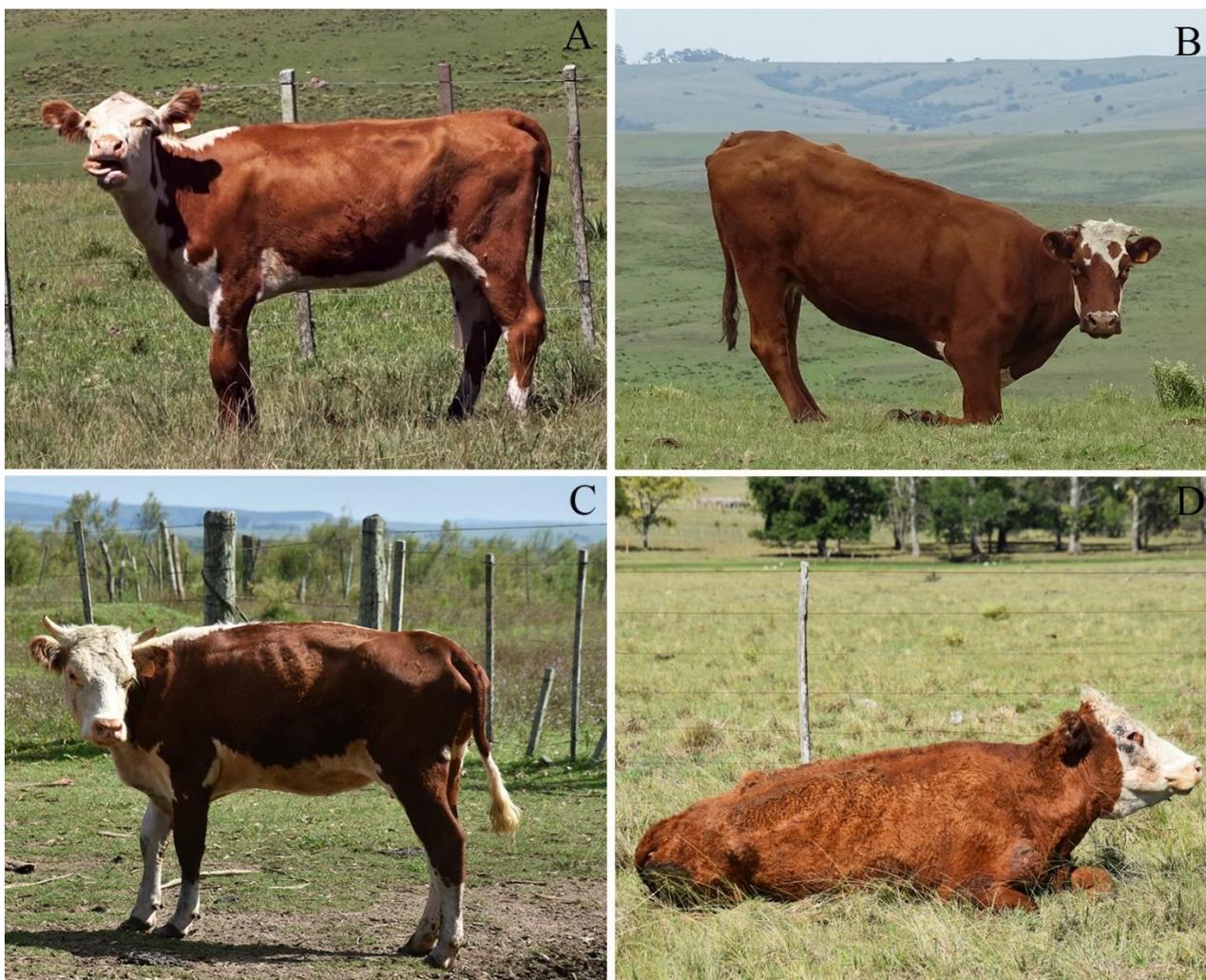
	Unidad	Brotos				Media ± E.E.
		Brote 1	Brote 2	Brote 3	Brote	
<u>Tasas</u>						
Morbilidad	%	16,8	5,3	13,3	7,3	10,7 ± 2,6
Mortalidad	%	1,4	0	6,7	1,5	2,4 ± 1,5
Letalidad	%	8,5	0	50	20	19,6 ± 10,9
Prevalencia de animales con hipofosfatemia	%	84,6	95,5	33,3	71,4	72,7 ± 13,7
<u>Clasificación de la prueba de la aguja en animales con signos clínicos</u>						
Con severa osteopenia	%	51,2	72,7	100	73,3	74,3 ± 9,9
Sin severa osteopenia	%	48,8	27,3	0	26,7	25,7 ± 9,9

Referencias: error estándar de la media (EE)

Las vacas afectadas tenían al menos uno de los siguientes signos: alotrofagia (pica, **Figura 1a**); dificultad en la marcha con pasos lentos, cortos y rígidos; dificultad para levantarse pasando 1-3 minutos apoyadas sobre sus carpos (**Figura 1b**) y posturas antiálgicas (**Figura 1c-d**) como: cabeza y

cuello estirados, miembros anteriores adelantados y/o miembros posteriores remetidos; y cifosis. Las vacas severamente afectadas tenían emaciación, marcada debilidad, incapacidad para levantarse (**Figura 1d**) y ocasionalmente en las costillas se podían ver fracturas reparadas con callos exuberantes. Este último hallazgo fue constatado en 25,5% (11/43), 25% (1/4) y 13,3% (2/15) de las vacas afectadas en los brotes 1, 3 y 4 respectivamente. Incluso en el brote 4 se pudo apreciar la presencia de callos óseos en osamentas encontradas en el campo (**Figura 2**).

La concentración de  $P_B$  en suelo y  $P$  en forraje estaban bajas en todos los establecimientos donde ocurrieron los brotes (**Tabla 2**). La disponibilidad forrajera, proporción de forraje verde y senescente, concentración de  $PC$  y concentración de  $Ca$  en el forraje verde, se evidencian en la **Tabla 2**.



**Figura 1. Osteomalacia o ‘Mal de las Paletas’ en vacas de cría. A.** Vaca lamiendo una piedra (pica). **B.** Vaca evidenciando severa dificultad para levantarse, con los miembros torácicos flexionados y apoyados sobre sus carpos. **C.** Vaca con pobre condición corporal, cifosis y que no descarga peso en miembro anterior derecho. **D.** Vaca en decúbito con sensorio normal, marcada emaciación y edema submandibular.



**Figura 2. Osamentas de vacas con osteomalacia.** **A.** En todas las costillas hay fracturas óseas más evidente en el recuadro de la esquina inferior izquierda. **B.** La costilla de la izquierda corresponde a la misma osamenta de (A), note el leve abultamiento correspondiente a un callo óseo de reparación. En la costilla derecha en un corte longitudinal se aprecia un callo óseo de reparación correspondiente a una de las vacas brote 1 con buen estado de preservación postmortem.

**Tabla 2.** Concentración de fósforo extraíble en bicarbonato ( $P_B$ ) en suelo y concentración de fósforo (P), calcio (Ca) y proteína cruda (PC) en forraje correspondiente a los potreros donde ocurrieron los brotes de osteomalacia.

	Unidad	Brote 1	Brote 2	Brote 3	Brote 4	Valores Esperados
<b>Suelo</b>						
$P_B$	mg/kg	4,0	4,1	5,1	1,0	> 8
<b>Pastura</b>						
Disponibilidad de forraje	kg MS/ha	1560	1642	749	1051	> 1200
Forraje verde	g/kg	613	536	471	590	
Forraje senescente	g/kg	387	464	529	410	
PC en el forraje	g/kg MS	---	---	82	94	
<i>P en el foraje</i>						> 2
Muestra entera	g/kg MS	0,9	1,0	0,9	1,5	
Forraje verde	g/kg MS	1,1	1,3	1,2	1,8	
Forraje secente	g/kg MS	0,6	0,7	0,7	0,9	
Ca en el forraje verde	g/kg MS	---	---	3,9	4,9	> 3

Las vacas con signos clínicos pesaron  $311 \pm 7$  kg, 89 kg (rango: 81-130) menos ( $P = 0,001$ ), que las vacas sin signos que pesaron  $399 \pm 7$  kg. Adicionalmente, las vacas primíparas pesaron ( $296 \pm 7$  kg) menos ( $P > 0,001$ ) que las vacas múltiparas, las que promediaron  $401 \pm 6$  kg. No se observaron diferencias ( $P = 0,127$ ) de peso en cuanto a la clasificación de la prueba de la aguja (con o sin severa osteopenia) en las 38 vacas con signos clínicos, tampoco hubo efectos en la interacción prueba de aguja x categoría ( $P = 0,959$ )

La media de la concentración de Pi en sangre fue baja en los 4 los brotes (**Tabla 3**) y en el total de vacas evaluadas ( $n = 77$ ) la media fue de  $1,23 \pm 0,08$  mmol/L. Adicionalmente, el 66,2% ( $n = 51$ ) de las vacas tenía severa hipofosfatemia ( $< 1,0$  mmol/L). La concentración de Pi fue ( $P = 0,001$ ) más baja en los animales con signos clínicos ( $n = 38$ ;  $0,94 \pm 0,12$  mmol/L) que en animales sin signos clínicos ( $n = 39$ ;  $1,51 \pm 0,12$  mmol/L). Respecto a la clasificación de la prueba de la aguja de los animales con signos clínicos las vacas clasificadas ‘con severa osteopenia’ ( $n = 33$ ) tuvieron ( $P = 0,001$ ) menos Pi ( $0,85 \pm 0,06$  mmol/L) que las vacas clasificadas ‘sin severa osteopenia’ ( $n = 5$ ) que promediaron  $1,30 \pm 0,16$  mmol/L. Adicionalmente, a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,108$ ), las vacas primíparas tuvieron menor concentración de Pi ( $1,06 \pm 0,14$  mmol/L) que en las vacas múltiparas ( $1,35 \pm 0,12$  mmol/L). No hubo efecto en concentración de Pi en la interacción entre la clasificación de prueba de la aguja y la categoría animal ( $P = 0,245$ ).

En cuanto a la concentración de Ca, la media en cada uno de los 4 brotes estaba en el rango de los valores esperados (2,25-2,60 mmol/L) (**Tabla 3**) y en el total de vacas evaluadas ( $n = 77$ ) la concentración promedio de Ca fue de  $2,41 \pm 0,04$  mmol/L. Sin embargo, el 23,4% ( $n = 18$ ) de las vacas tenía hipercalcemia ( $> 2,60$  mmol/L). A pesar de ello, no hubo diferencias estadísticas según la presencia de signos clínicos ( $P = 0,854$ ), clasificación de la prueba ( $P > 0,767$ ), la categoría ( $P > 0,734$ ) y/o la interacción prueba de la aguja x categoría ( $P > 0,839$ ).

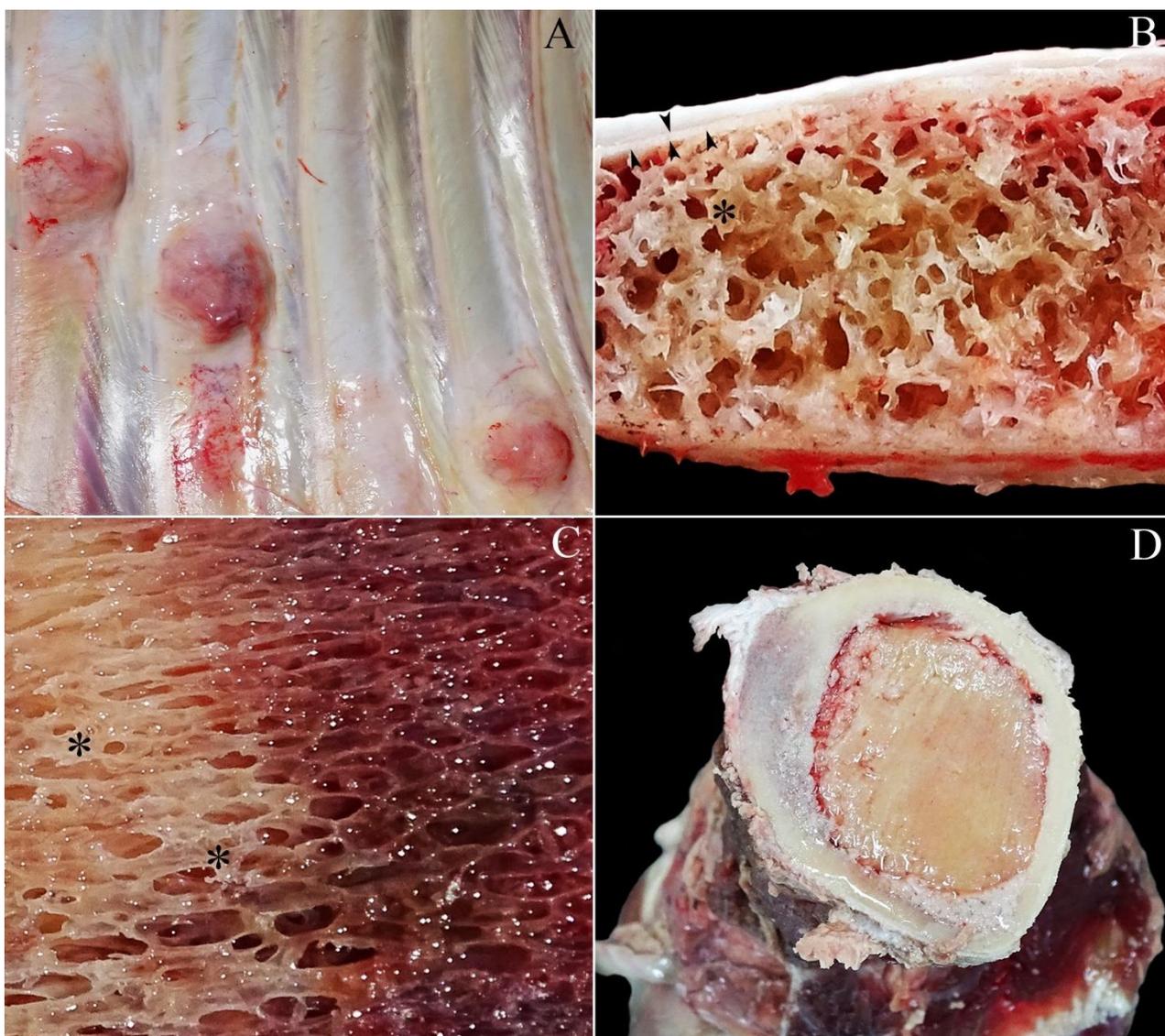
La relación Ca/P fue alta en todos los brotes (**Tabla 3**) promediando  $2,66 \pm 0,15$  en todas las vacas evaluadas ( $n = 77$ ). A pesar de que no hubo diferencias estadísticas, aunque si una tendencia ( $P = 0,071$ ), las vacas con signos clínicos tuvieron relaciones Ca/P más altas ( $2,93 \pm 21$ ) que las vacas sin signos clínicos ( $2,40 \pm 0,21$ ). Similarmente, respecto a la clasificación de la prueba de la aguja en las vacas con signos clínicos ( $n = 38$ ) aquellas clasificadas ‘con severa osteopenia’ ( $n = 33$ ) tuvieron ( $P = 0,082$ ) mayores relaciones Ca/P ( $3,03 \pm 0,18$ ) que las vacas clasificadas ‘sin severa osteopenia’ ( $n = 5$ ) que promediaron  $2,25 \pm 0,45$ . No se observaron diferencias estadísticas según la categoría animal ( $P = 0,423$ ) y/o la interacción prueba de la aguja x categoría ( $P = 0,693$ ).

En los 3 animales necropsiados, había bajas concentraciones de P, Ca y ceniza en los huesos (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Medias y error estándar de peso vivo (p.v.), concentración de fósforo inorgánico (Pi), calcio (Ca) y relación Ca/P en suero sanguíneo de las vacas evaluadas en cada uno de los brotes de osteomalacia. También se evidencia la concentración de ceniza, P y Ca en muestras de hueso de los animales necropsiados.

	Unidad	Brote 1	Brote 2	Brote 3	Brote 4	Valores Esperados
<i>Animales muestreados</i>	n°	26	22	11	14	
<i>P.v vacas de primera cría</i>	kg	277±8	300±7	322±23	332±8	
<i>P.v vacas múltiparas</i>	kg	404±10	398±12	---	---	
<i>Análisis realizados en suero sanguíneo</i>						
Pi	mmol/L	1,03±0,26	0,71±0,39	0,79±0,28	1,05±0,26	> 1,60
Ca	mmol/L	2,42±0,23	2,45±0,17	2,36±0,21	2,54±0,20	> 2,25
Ca/Pi ratio		2,57±0,53	3,92±1,11	3,30±1,25	2,56±0,49	
<i>Análisis realizado en hueso</i>						
Ceniza (mg/mL)	mg/mL	427±7	---	478	---	> 700
Total P (mg/mL)	mg/mL	73±1	---	89	---	> 150
Total Ca (mg/mL)	mg/mL	179±5	---	198	---	> 300

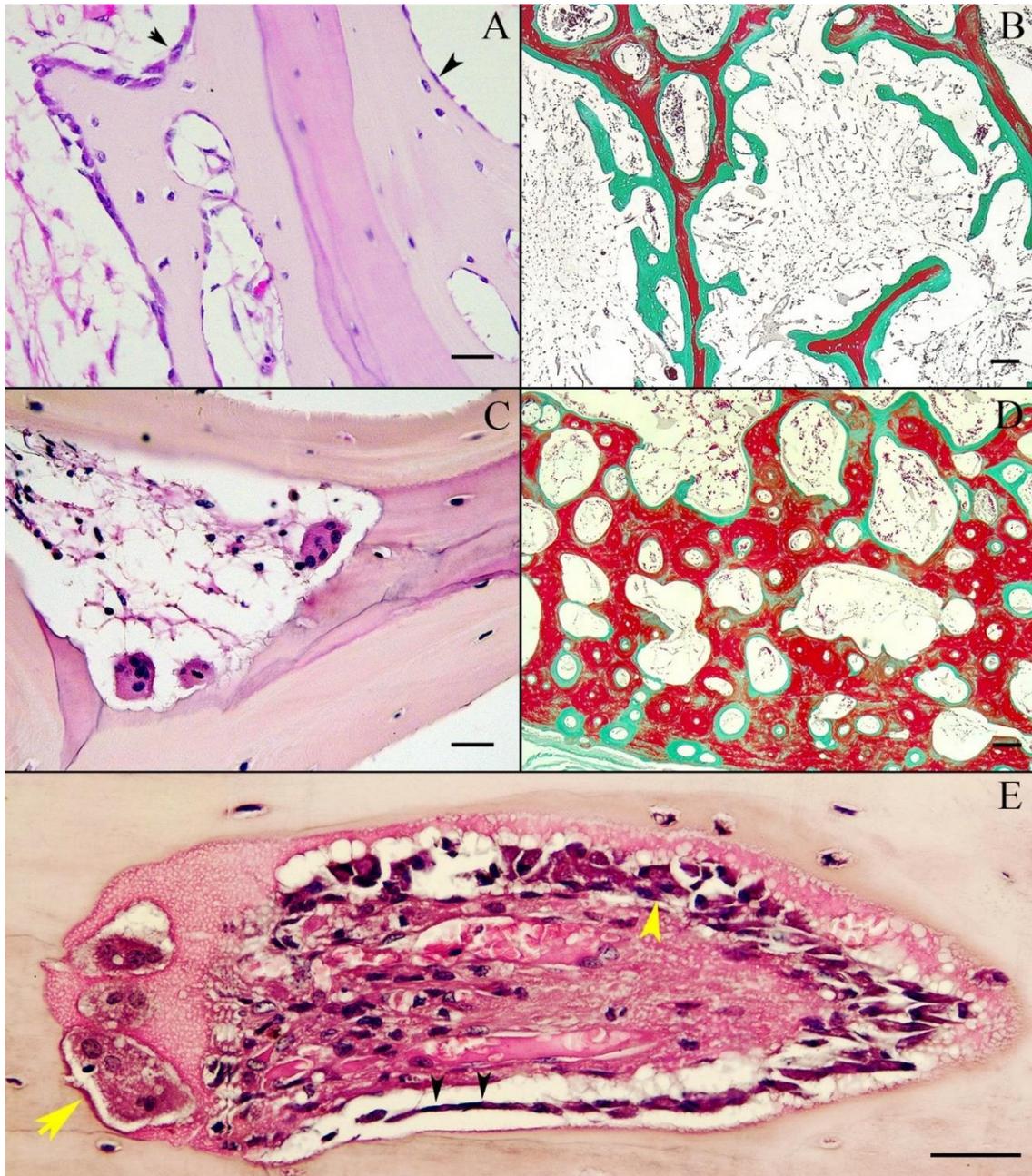
En las necropsias, multifocalmente, la grasa perirrenal, pericárdica y mesentérica evidenciaba atrofia serosa. En la parrilla costal de los 3 animales, bilateralmente, había 3 a 5 callos óseos de 5 a 8 cm de diámetro (**Figura 3a**). En todas las vacas las costillas se cortaban fácilmente con cuchillo, las trabéculas estaban blandas y con bordes de aspecto flameante o espinosos; tanto en la diáfisis de las en la epífisis distal de la costilla el hueso cortical estaba extremadamente delgado (**Figura 3b-c**). La diáfisis del húmero también evidenciaba adelgazamiento del hueso cortical y/o aumento de la luz del canal medular (**Figura 3d**) comparado con la diáfisis de un húmero normal (**Figura suplementaria 1**).



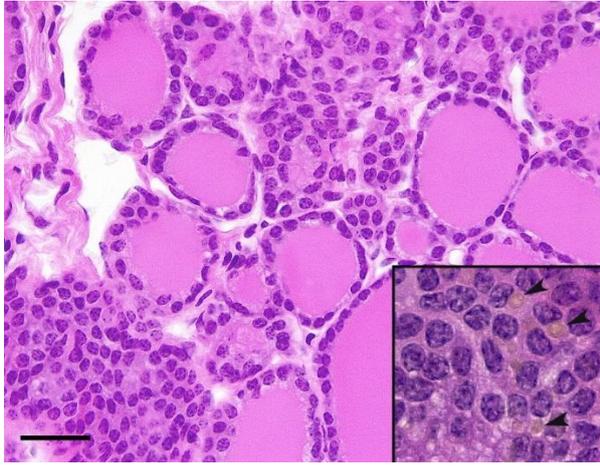
**Figura 3. Carencia crónica de fósforo. A Parrilla costal.** Se evidencia 3 callos óseos correspondientes a fracturas costales reparadas. **B. Costilla – corte transversal del tercio ventral.** Se evidencia que el hueso cortical está muy delgado (cabeza de flecha negra) con aumento de la proporción de hueso trabecular, sin embargo, las trabéculas están delgadas con múltiples bordes flameantes o espinosos (asterisco). **C. Costilla – corte longitudinal del tercio ventral.** Note en las áreas sin médula ósea, que el tejido trabecular posee un aspecto flameante o espinoso y de color traslucido (asteriscos). **D. Húmero – corte transversal en la diáfisis.** Se observa severo adelgazamiento del hueso cortical y aumento de la luz de la cavidad medular.

Microscópicamente en múltiples costillas (5<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup> en el tercio ventral, aunque también en el tercio medio y tercio proximal) difusamente el tejido óseo trabecular y cortical tenía severo adelgazamiento (osteopenia). En todas las vacas, multifocalmente, algunas trabéculas estaban recubiertas por excesiva o inapropiada matriz osteoide no mineralizada y de color rosado claro con la coloración HE o verde con la coloración Tricrómico de Masson-Goldner (osteomalacia) (**Figura 4a-b**). Esta matriz, que ocasionaba bordes festoneados o de aspecto flameante o espinoso en las trabéculas, estaba rodeada de múltiples osteoblastos y/u osteocitos de superficie también conocidos como ‘células óseas de recubrimiento’. Algunas trabéculas severamente afectadas tenían ‘lagunas de Howship’ (**Figura 4c**). En el hueso cortical, multifocalmente, los canales osteónicos estaban dilatados y cubiertos en de matriz osteoide no mineralizada; además, en algunas áreas severamente afectadas estos canales formaban extensas ‘cavidades’ de aspecto poroso y cubiertos o no por matriz osteoide no mineralizada, evidenciando una excesiva o inapropiada reabsorción osteoclástica (osteoporosis) (**Figura 4d**). En estas ‘cavidades o túneles’ generalmente había abundantes osteoclastos con tejido fibrovascular, material proteináceo finamente granular eosinofílico y homogéneo, y en menor frecuencia osteoblastos y osteocitos de superficie (**Figura 4e**). En todos los animales el hueso cortical de al menos una costilla estaba fracturado con formación de callos fibrosos con ocasionales microfracturas trabeculares. Difusamente el periostio estaba hipertrofiado. La placa de crecimiento del húmero de todas las vacas evaluadas tenía islas de condrocitos hipertróficos y necróticos rodeados de matriz cartilaginosa eosinofílica con fibrina y hemorragias indicando daño traumático.

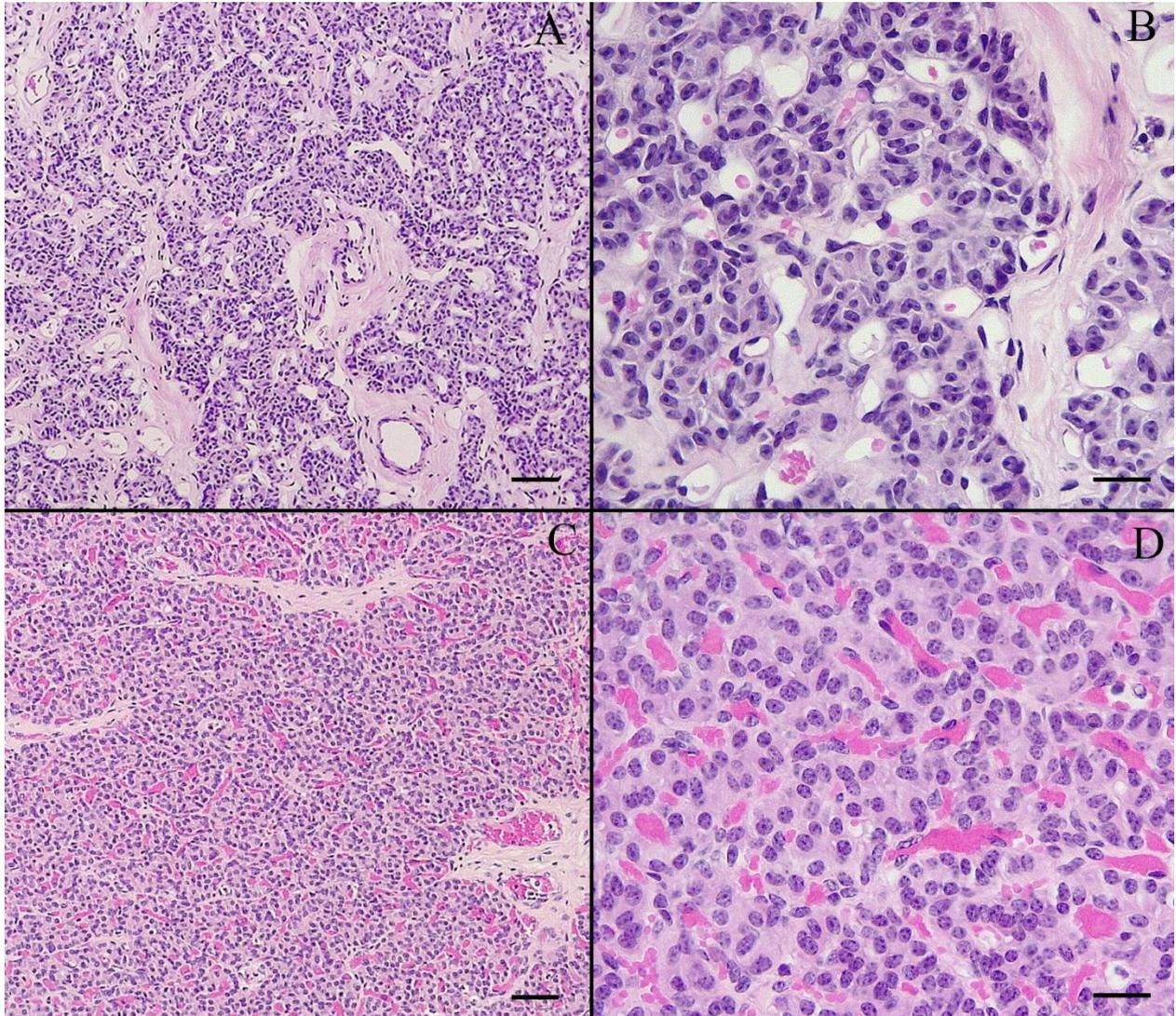
En 2 de 3 vacas, multifocalmente había leve hiperplasia de las células C de la tiroides la cual se caracterizaba por un incremento del número de células en las cuales había estructuras globulares doradas en su citoplasma (**Figura 5**). La paratiroides estaba severamente atrofiada con aumento del estroma fibrovascular, escasos número de células oxífilas y adicionalmente las células principales tenían escaso citoplasma y/o baja relación citoplasma-núcleo comparado con células normales (**Figura 6**). En una vaca en el hígado había hepatitis histio-eosinofílica periportal moderada con fibrosis moderada e hiperplasia biliar que se corresponde con secuelas de fasciolosis, sin embargo, no había *Fasciola hepática* en el parénquima.



**Figura 4. Costillas de vacas con carencia crónica de fósforo.** **A.** Las trabéculas evidencian severa disminución de espesor del tejido óseo mineralizado, con incremento de tejido osteoide no mineralizado (rosado claro) rodeado por osteoblasto (flecha negra) y osteocitos de revestimiento (cabeza de flecha negra). HE. Barra = 50  $\mu$  m. **B.** Note la misma lesión detallada en A, demostrando la pobre o ausencia de mineralización del tejido osteoide (verde) con el Tricrómico de Masson-Goldner (TGM) en tejido descalcificado. Barra = 100  $\mu$  m. **C.** La trabécula evidencia una laguna de Howship con actividad osteoclástica. Note el tejido osteoide no mineralizado de color rosado claro. HE. Barra = 50  $\mu$  m. **D.** El hueso cortical esta delgado y de aspecto poroso debido a que múltiples canales osteónicos están exageradamente dilatados. TGM. Barra = 50  $\mu$  m. **E.** En una Laguna de Howship del hueso cortical se evidencia todo el proceso de remodelación ósea, incluyendo actividad osteoclástica (flecha amarilla), osteoblástica (cabeza de flecha amarilla) y de los osteocitos de recubrimiento (cabeza de flecha negra). HE. Barra = 50  $\mu$  m.



**Figura 5. Tiroides de vacas con carencia crónica de fósforo.** Hay leve hiperplasia multifocal de las células C. En el recuadro de la esquina inferior derecha se observan a mayor aumento múltiples células C que tienen en su citoplasma estructuras globulares de color dorada (flecha negra), mejor visualizadas con bajo brillo y alto contraste. HE. Barra = 50  $\mu$  m.



**Figura 6. Paratiroides de vacas con carencia crónica de fósforo.** A. La glándula evidencia un aumento del estroma o tejido fibrovascular en comparación con una glándula normal (C). HE. Barra = 100  $\mu$  m. B. Las células principales evidencian escaso citoplasma o disminución de la relación citoplasma-núcleo en comparación con células principales de una glándula normal (D). HE. Barra = 50  $\mu$  m. C- D. Glándula paratiroides normal perteneciente a un animal que murió espontáneamente de tristeza parasitaria. HE. Barra = 100 (C) y 50  $\mu$  m (D).

## 7.5 DISCUSIÓN

Después de 103 años de haberse realizado los primeros reportes y estudios científicos de osteomalacia en Uruguay, la enfermedad sigue ocurriendo y afectando a las vacas de los sistemas de producción extensivos en campos naturales (Rubino, 1928). La enfermedad produce pérdidas directas debido a la muerte de animales; sin embargo, las mayores pérdidas son subclínicas y están asociadas a la baja ganancia o pérdida de peso como vimos en las vacas con signos clínicos que pesaron 89 kg menos que las vacas sin signos clínicos. La baja fertilidad de los rodeos es otra consecuencia subclínica de esta enfermedad (Coates et al., 2019), que no fue evaluada en este trabajo.

Numerosos artículos científicos (Mufarrege 1999; Uriarte et al., 2000; Malafaia et al., 2004; Coates et al., 2019; Dixon et al., 2020a) demuestran los efectos benéficos de la suplementación mineral con P. En Uruguay los brotes siguen ocurriendo debido tanto a la falta de uso de sales minerales como vimos en los brotes 3 y 4, así como a un inapropiado uso de sales minerales como vimos en los brotes 1 y 2. En este estudio las razones por las que el manejo de la suplementación mineral no fue eficaz para controlar o prevenir la osteomalacia incluyeron: (i) proporcionar pequeñas cantidades de P en suplementos inyectables subcutáneos; (ii) proporcionar cantidades insuficientes y/o cantidades adecuadas de suplementos minerales pero por períodos cortos; y (iii) proporcionar suplementos con bajas concentraciones de P (40-50 g P/kg) a animales con altas demandas de P y consumiendo dietas severamente deficientes en P. En general, en todos los brotes las vacas consumían dietas con el 20-55% de los requerimientos diarios de P (~21 g P/día) (NRC, 2016; Dixon et al., 2020a). En función de la concentración de P del forraje (considerando el peso de las vacas y un consumo de 25-30 g/MS por kg de peso vivo), el forraje aportó de 4-9 g P/día, mientras que el P suministrado subcutáneamente o ingerido *per-os* fue de 0,2-3,8 g P/día. Es importante resaltar que dichas estimaciones consideran un consumo diario de MS óptimo, sin embargo, uno de los efectos más importantes de la carencia de P es la reducción del consumo voluntario, con lo cual el efecto es aún más negativo (Dixon et al., 2011; Dixon et al. 2020b). En un censo agropecuario nacional, se informó que el ~27% de los productores ganaderos usaban suplementos minerales (MGAP, 2003) y según la información del mercado de ese momento (Uriarte et al., 2000), las cantidades de sales vendidas (~6000 toneladas) habrían proporcionado ~30% de la cantidad necesaria para cubrir los requerimientos de todas las vacas si estos establecimientos hubiesen tenido una deficiencia mineral. Por lo tanto, el uso de sales minerales en Uruguay ha sido insuficiente.

Al igual que otros estudios previos en Uruguay (Rubino, 1928; 1934; Dutra 2009a), en el presente trabajo todos los brotes ocurrieron durante el verano (enero-marzo). La mayor incidencia de la enfermedad en verano o períodos secos probablemente sea debido a que los pastos de los campos naturales contienen alta proporción de forraje senescente (rango: 387 – 529 g/kg MS) los cuales tienen ~50% menos P que la fracción verde (**Tabla 2**), asociado a la baja disponibilidad de forraje con menor concentración de P. Además, en Uruguay, el verano es una época en que las vacas de carne aún están en lactación y tienen altos requerimientos de P. Internacionalmente una mayor frecuencia de brotes de osteomalacia se ha relacionado con años de sequía (Tuff, 1923; Judkins et al., 1985; Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020a). Esta situación se presentó en el brote 2 (con lluvias de 171 mm vs. 312 mm de promedio de los últimos 30 años) pero no en los brotes 1, 3 y 4 (369 mm y 346 vs 312 mm de los últimos 30 años) lo que sugiere que la osteomalacia también puede ocurrir en años con precipitaciones normales. Sin embargo, en el brote 2, que ocurrió durante una sequía, se registró la menor concentración de Pi y la mayor relación Ca/P ( $P = 0,029$ ) en comparación con el resto de los brotes que ocurrieron en años con lluvias normales. La osteomalacia puede ser el resultado de una menor disponibilidad de pasto ya que en estas condiciones se afecta severamente el tamaño de bocado

y por ende posiblemente la ingesta de P (Gonçalves et al., 2009; Dixon et al., 2020a). En los brotes 1 y 2 hubo adecuada disponibilidad de forraje, pero en los brotes 3 y 4, la disponibilidad por ha estuvo debajo de los valores esperados (**Tabla 2**); sin embargo, debido a la baja carga animal (0,5 y 0,71 unidad ganadera/ha respectivamente) es posible que la disponibilidad real de pasto no haya sido limitante.

En todos los brotes de un total de 33 vacas primíparas evaluadas el 84,8 % (28/33) tenían signos y pesaban entre 226 y 295 kg. Este bajo peso probablemente estuvo asociado con un bajo consumo voluntario de pasto y/o a la dificultad de estos animales para caminar y pastar de manera efectiva (Judkins et al., 1985; Dixon et al., 2020a). Adicionalmente, cuando los animales jóvenes reciben dietas deficientes de P durante largos periodos de tiempo, es posible tengan un crecimiento deficiente, tal situación también pudo haber contribuido al bajo peso de estas vacas primíparas.

En cuanto a las lesiones, una vaca tenía lesiones de *Fasciola hepática* en hígado al igual que en otro brote de osteomalacia descrito por Dutra (2011b). En humanos se ha relacionado la osteomalacia con enfermedades que producen lesiones hepatobiliares debido a la incapacidad hepática para activar vitamina D<sub>3</sub> y por ende absorber P y Ca (Francis & Selby, 1997). En los bovinos, lesiones crónicas en el hígado como las producidas por *F. hepática* o por la intoxicación con *Senecio* spp., posiblemente contribuyan al desarrollo de osteomalacia, cuando las vacas también ingieren pastizales deficientes en P. En el presente estudio, en 2 de 3 vacas, además de la osteomalacia había osteoporosis, ambos hallazgos también han sido descritos juntos en medicina humana (Burtis & Bruns, 2015). Además, observamos en las mismas vacas, atrofia de paratiroides y leve hiperplasia de las células C de la tiroides. A pesar de que no medimos la concentración de parathormona (PTH) y calcitonina (CT), en otros estudios previos tanto en bovinos como en humanos con osteomalacia (asociada a hipofosfatemia) había bajas concentraciones de PTH (Francis & Selby, 1997; Anderson et al., 2017; Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020b). Estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales son necesarios para soportar mejor estos hallazgos patológicos en ambas glándulas endócrinas. La inapropiada o exacerbada actividad osteoclástica en ausencia de niveles adecuados de PTH o atrofia de la glándula paratiroides, se explicaría debido a incrementos endógenos de 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vit D<sub>3</sub> (Francis & Selby, 1997; Craig et al., 2016; Nakamichi et al., 2018; Dixon et al., 2020b)

La medición de las concentraciones de P en suelos, pastos y sangre de los animales en todos los brotes proporcionó una fuerte evidencia de que las vacas tenían una severa deficiencia de P y que esta era la causa principal de la osteomalacia. Las concentraciones en el suelo de ~4 mg P<sub>B</sub>/kg y en el forraje de ~1 g P/kg fueron indicativas de deficiencia de P (Dixon et al., 2020a). Existe un acuerdo generalizado de que el Pi sanguíneo para un grupo de animales sigue siendo uno de los mejores marcadores de la deficiencia de P. Estudios en Australia y Sudáfrica han concluido que el ganado de carne en crecimiento y lactante con concentraciones de Pi de < 1 mmol/L y que consumen dietas de calidad al menos moderada tienen una deficiencia grave de P (Read et al., 1986c; Dixon et al., 2020a). Por lo tanto, las bajas concentraciones de Pi en todos los brotes proporcionaron evidencia de que las vacas estaban con severa deficiencia de P. La prueba de la aguja descrita por Tokarnia et al., (2010) ha demostrado ser un simple y útil test de campo para evaluar enfermedades carenciales que cursan con osteopenia como la deficiencia de P. En todos los brotes en el grupo de las vacas con signos clínicos se identificaron animales 'con severa osteopenia'. Estos animales tuvieron menores concentraciones de Pi ( $P = 0,001$ ) y mayor relación Ca/P ( $P = 0,028$ ) evidenciando la mayor severidad de la enfermedad, por lo que también esta prueba podría ser útil para realizar manejos diferenciados (ej., prolongar el tiempo de tratamiento para este grupo de animales). En las 3 vacas a las que se les realizó la necropsia, los resultados fueron consistentes con bajos contenidos de ceniza (~450 mg/mL), P (~80 mg/mL) y Ca (~189 mg/mL) en las costillas. Un resultado similar fue reportado en vacas

consumiendo dietas deficientes en P que, además, tenían  $\geq 30$  % de tejido osteoide no mineralizado en el tejido óseo (Olson & Carlson, 2017; Dixon et al., 2020b). En nuestro estudio, las mediciones de P en el suelo, forraje, y hueso complementaron y apoyaron un diagnóstico final de deficiencia de P. Sin embargo, para el diagnóstico rutinario de osteomalacia causada por la deficiencia de P, los signos clínicos, la presencia de osteopenia determinada por la prueba de la aguja y la concentración sérica de Pi son herramientas excelentes para confirmar el diagnóstico. Además, para poder tomar decisiones respecto al tratamiento y control de la deficiencia de P, es necesario estimar la cantidad de P ofrecido por el pasto, con el objetivo de proporcionar efectivamente las cantidades de P adicionales necesarias para cumplir con los requerimientos diarios de P de las vacas.

Dada la ocurrencia de brotes de osteomalacia en áreas que tienen pastizales deficientes en P, y mayor prevalencia de enfermedad subclínica que clínica, se recomienda aumentar el uso de las técnicas de diagnósticos de rutina antes mencionadas para la deficiencia de P. Es necesario, también mejorar la aplicación de suplementos minerales en regiones donde se sabe, o se sospecha, que hay deficiencia P en los pastizales que van a ser pastoreados por ganado vacuno.

## **7.6. CONCLUSIÓN**

En nuestra región la osteomalacia es una enfermedad que generalmente ocurre en verano, afectado principalmente a vacas de primera cría en lactación debido a una carencia crónica de P asociado al bajo nivel del P en los suelos y los pastizales nativos. En el País la enfermedad sigue ocurriendo debido a la falta o incorrecto uso de las sales minerales. La observación de signos clínicos, la osteopenia determinada por la prueba de la aguja y la concentración de Pi en la sangre, en conjunto, son excelentes indicadores rutinarios para el diagnóstico de la enfermedad.

## **7.7. AGRADECIMIENTOS**

Nos gustaría agradecer a los médicos veterinarios Dr. Carlos Tourn, Dr. Marcelo Villagran, Dr. Rodolfo Rivero, Dr. Manuel Taño, al Ingeniero Agrónomo Marcelo Botello y Sr Benjamín Barros por su asistencia durante los brotes. También quisiéramos agradecer a Daniel Basaund, Carolina Ramos, Cecilia Alvarez y Lucia Barrón por la asistencia con los análisis de laboratorio y a Microlab (Nefector) por prestarnos los equipamientos.

## **7.8. FINANCIACIÓN**

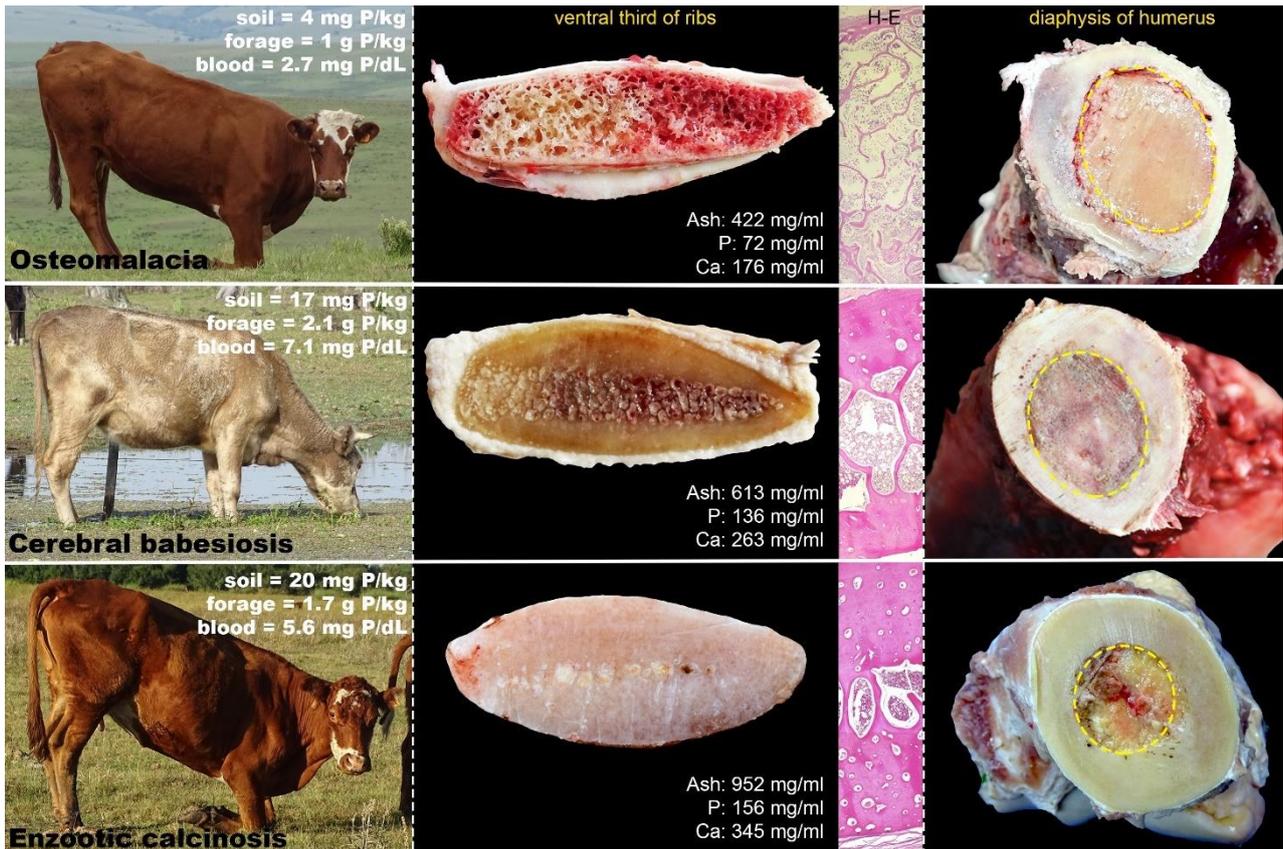
Este trabajo fue financiado por el proyecto FMV\_1\_2017\_1\_136347 de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Una beca de doctorado y una beca para culminar el doctorado fueron otorgadas a Carlos Schild por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y la Comisión Académica de Posgrado de Universidad de la República.

## 7.9. MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 1

**Tabla Suplementaria 1.** Composición química de los suplementos minerales usados en ambos brotes

<b>Sal Mineral</b>	<b>Unidad</b>
<b><u>Suplemento A, inyectable* (Phosphorplus), Brote 1</u></b>	
Vitamina D <sub>2</sub>	500000 UI
Glicerofosfato de Sodio	8,5 g
Fosfato monobásico de Sodio	11,5 g
Hipofosfito de Sodio	16,3 g
<b><u>Suplemento B, inyectable* (Genfos OI), Brote 1 y 2</u></b>	
Glicerofosfato de Sodio	14 g
Fosfato monobásico dihidratado	20,1 g
Cloruro de Cobre dihidratado	0,4 g
Cloruro de Potasio dihidratado	0,6 g
Cloruro de Magnesio hexahidratado	2,5 g
Selenato de Sodio	0,2 g
<b><u>Suplemento C, bloque (Naturblok), Brote 1</u></b>	
Cloruro de Sodio	40 – 60 %
Calcio (carbonato)	11 – 14 %
Fosforo (fosfato dicálcico 30%)	4 – 5,4 %
Magnesio (óxido)	2 – 1 %
Zinc (óxido)	3000 mg/kg
Manganeso (sulfato)	2500 mg/kg
Yodo (yodato cálcico)	50 mg/kg
Hierro (óxido)	20 mg/kg
Cobalto (acetato)	10 mg/kg
Selenio (selenito de sodio)	5 mg/kg
Vitamina A	250000 UI/kg
Vitamina D <sub>3</sub>	100000 UI/kg
Vitamina E	200 mg/kg
Humedad	5 %
<b><u>Suplemento D, polvo (Foser 40), Brote 2</u></b>	
Sodio	15,6 %
Calcio	9 – 10,1%
Fósforo	3,6 – 4,4 %
Magnesio	0,5%
Azufre	1,3%
Hierro	1000 mg/kg
Zinc	2000 mg/kg
Manganeso	500 mg/kg
Yodo	50 mg/kg
Selenio	5 mg/kg
Cobalto	50 mg/kg
Flúor	400 mg/kg
Humedad	5%

Referencias: \* la concentración de estos suplementos ya sea en gramos (g) o unidades internacionales (IU) son en base a 100 ml de excipiente.



**Figura suplementaria 1.** Controles usados para comparar los hallazgos patológicos y determinaciones de minerales en hueso de las vacas con osteomalacia (percentil inferior). Un animal que murió espontáneamente de babesiosis nerviosa y sin alteraciones en óseas fue usado como control normal (percentil medio), y una vaca con calcinosis enzoótica que tenía osteopetrosis en las costillas fue usada como control del percentil superior.



## 8. CAPÍTULO 3. RESPUESTAS DE VACAS CON OSTEOMALACIA A LA SUPLEMENTACIÓN CON FÓSFORO OFRECIDO EN MEZCLAS MINERALES SUeltas O MEZCLAS MINERALES COMPRIMIDAS EN BLOQUES

### 8.1. RESUMEN

Brotos de osteomalacia frecuentemente ocurren en bovinos que consumen forrajes de campos naturales en regiones con deficiencias de fósforo (P) en el suelo. Este estudio evaluó las respuestas de vacas con osteomalacia a la suplementación mineral con P administrado en mezclas minerales sueltas (MMS) o mezclas minerales comprimidas en bloques (MMB) durante 13 semanas. Se clasificaron dos grupos de 10 vacas con signos clínicos de osteomalacia (la mitad de cada grupo fue clasificada como 'con' y la otra mitad clasificada 'sin' severa osteopenia de acuerdo con la prueba con aguja de las apófisis transversas de las vértebras lumbares). A un grupo se les ofreció *ad libitum* MMS y al otro grupo se le ofreció MMB, ambas mezclas minerales tenían 100 g P/kg. Se midieron los pesos vivos, el consumo de sales y las concentraciones de P en suelo, forraje, suero sanguíneo y hueso cortical de las costillas de los animales. Las medias de P en suelo (3,5 mg/kg), P total en forraje (0,95 g/kg de MS), P inorgánico en suero (Pi, 0,96 mmol/L) y P en hueso (85 mg/mL) al comienzo del experimento fueron todas bajas y consistentes con una deficiencia crónica de P. Las vacas consumieron ( $P = 0,022$ ) más P en las MMS que en las MMB (medias 8,3 y 6,6 g P/día, respectivamente). La suplementación con P permitió la recuperación clínica en 18 de 20 vacas. En las 2 vacas restantes el único signo remanente fue una leve alteración de la marcha. La concentración de Pi aumentó linealmente con la suplementación mineral y después de 13 semanas el Pi fue mayor ( $P < 0,001$ ) en las vacas clasificadas 'sin' severa osteopenia que en vacas clasificadas 'con' severa osteopenia (1,67 y 0,91 mmol/L, respectivamente). Además, las vacas suplementadas con MMS tuvieron mayor concentración de P ( $P = 0,042$ ) en el hueso cortical de las costillas que las vacas suplementadas con MMB (126 y 101 mg/mL, respectivamente). En conclusión, el tratamiento con P suplementario durante 13 semanas a vacas con osteomalacia, consumiendo forrajes de campos naturales deficientes en P, fue más efectivo con MMS que con MMB.

**Palabras claves:** bovinos, deficiencia de fósforo, osteomalacia, suplementación mineral, Uruguay

## 8.2. INTRODUCCIÓN

La deficiencia crónica de fósforo (P) en los bovinos de carne ocurre principalmente en animales que consumen forrajes con bajo contenido de P que crecen en suelos que también tienen bajas concentraciones en P; consecuentemente los animales tienen baja concentración de P en la sangre y huesos. Frecuentemente los animales afectados evidencian signos de alotrofia (pica) aunque es también es frecuente observar el consumo de huesos (osteofagia), claudicación, deformaciones y/o múltiples fracturas óseas (Rose, 1954; Tokarnia et al., 2010; Constable et al., 2017). Los animales severamente afectados evidencian una pérdida de masa ósea (osteopenia) y osteomalacia (mineralización defectuosa) (Craig et al., 2016). Las principales pérdidas productivas generadas por la deficiencia de P son subclínicas, debido a un pobre desarrollo o crecimiento, baja ganancia o pérdida de peso y/o baja fertilidad de los animales, asociado a una menor ingesta de forraje (Kerridge et al., 1990). La enfermedad se conoce en Uruguay como ‘mal de las paletas’ y se asocia típicamente con concentraciones bajas de P tanto en el suelo (2,5–5 mg P/kg extraíble con bicarbonato) como en el forraje (0,9–1,8 g P/kg de materia seca -MS-) (Rubino, 1928; 1934; Schild et al., 2021a). En países con deficiencia endémica de P, la enfermedad es más frecuente en vacas en lactación y durante períodos de sequía (Rose, 1954; Judkins et al. 1985; Dixon et al., 2020a). Esto también ocurre en Uruguay (Rubino, 1928; Schild et al., 2021a).

Los efectos benéficos de la suplementación con P sobre el peso vivo, la tasa de destete, el peso al destete de los terneros y el desempeño reproductivo de las vacas de cría están bien establecidos (Read et al., 1986a; Winks, 1990; Malafaia et al., 2004; Mufarrege, 1999; Coates et al., 2019), por lo que la deficiencia de P solo ocurre en ausencia de una suplementación efectiva de P (Peixoto et al., 2005; Dixon et al., 2011, Schild et al., 2021a). La suplementación de P con mezclas de minerales sueltas (MMS) o mezclas de minerales comprimidas en bloque (MMB) puede ser eficaz, pero a menudo es difícil lograr que los animales en pastoreo ingieran las cantidades deseadas, especialmente durante la temporada de lluvias (Bowman & Sowell, 1997). Además, suele haber una gran variabilidad en el consumo de MMS y MMB tanto entre animales, rodeos y/o potreros; incluso siempre debe considerarse que hay una proporción del rodeo (ej., 5-20 %) que no consume o consume menos sales minerales que el resto de los animales (Winks, 1990; Karn, 2001; Dixon et al., 2003). A pesar de que en Uruguay existe disponibilidad de suplementos o sales minerales comerciales con apropiada concentración de P, existe una falta de información para respaldar las decisiones de los productores en cuanto al manejo de la suplementación con P necesaria para controlar los brotes de osteomalacia.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la eficiencia del tratamiento con P ofrecido en MMS o MMB a vacas que presentaban signos clínicos de osteomalacia.

## 8.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del experimento y suplementos minerales usados.

El protocolo del experimento fue aprobado por la Comisión de Ética de Uso de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Uruguay (Número de aprobación 2019.3, Fecha de aprobación, 15 de febrero de 2019). Durante un brote de osteomalacia descrito por Schild et al. (2021a) como brote 1, se seleccionaron 20 vacas de cría con signos clínicos de la enfermedad. Los terneros de estas vacas fueron destetados poco antes de que comenzara el experimento. Diez de estas vacas, fueron clasificadas mediante la prueba con aguja (descrita a más abajo) como ‘con severa osteopenia’ y las otras 10 vacas, como ‘sin severa osteopenia’. Aleatoriamente, 5 vacas de cada una de estas categorías (con y sin severa osteopenia) fueron

asignadas para formar dos nuevos grupos (cada uno con  $n = 10$ ). Ambos grupos pastaron en dos potreros de 16 hectáreas con campos naturales dominados por gramíneas perennes C4 que fueron contruidos dentro del potrero original donde había ocurrido el brote de osteomalacia. Durante 94 días (13 semanas) se les ofreció a ambos grupos un suplemento mineral (19/20-Cobalfosal, Barraca Deambrosi S.A.) que contenía 100 g P/kg. Un grupo recibió el P en una MMS y el otro grupo en una MMB. Ambos suplementos se ofrecieron *ad libitum*, la MMS en dos comederos (cada uno de 120 cm de diámetro) y MMB en dos bloques de 18 kg. En ambos grupos de animales los suplementos minerales se reponían semanal e inmediatamente después de la lluvia para evitar el endurecimiento de las sales minerales.

Los ingredientes de ambos suplementos (MMS y MMB) fueron (g/kg secado al aire): fosfato dicálcico 555; cloruro de sodio 430; carbonato de calcio 7,1; óxido de magnesio 5; sulfato de cobre 0,8; óxido de zinc 0,5; sulfato de cobalto 0,15; sulfato de manganeso 1,1; yodato de potasio 0,09; selenito de sodio 0,01; y esencia de manzana 0,25. El fosfato dicálcico era soluble en un 90 % en ácido cítrico al 2 % y, por lo tanto, era una fuente de P de alta calidad. La composición (g kg/MS) fue: calcio 140; fósforo 100; sodio 15,9; magnesio 3,1; potasio 0,02; cobre 0,2; cinc 0,4; cobalto 0,03; manganeso 0,35; selenio 0,004; yodo 0,05; azufre 0,33; y flúor 0,004.

#### Colecta de muestras.

Al inicio del experimento se obtuvieron muestras de suelo del horizonte A hasta una profundidad de 150 mm ( $n = 30$ ) en cada uno de los potreros. A intervalos de 3 semanas durante las 13 semanas, las vacas se pesaron después haber ayunado ~6 horas, se tomaron muestras de sangre y se realizó la prueba de la aguja. En éstos mismos intervalos se midió la disponibilidad de forraje utilizando el método comparativo de doble muestreo (Haydock & Shaw, 1975) y se obtuvieron muestras ( $n = 30$ ) de forraje por el método hand plucking (De Vries, 1995), las que fueron separadas manualmente en las fracciones material verde y senescente. El consumo de sal se determinó como la diferencia entre el suplemento proporcionado y el remanente. Además, en cada uno de estos intervalos de 3 semanas, las vacas con sus respectivos tratamientos se intercambiaron de potrero para reducir los efectos de cualquier diferencia entre ambos potreros. Las muestras de sangre se colectaron por punción de la vena yugular, se transfirieron a tubos de 5 ml con acelerador de coagulación, se centrifugaron (2450 x g, a 4 °C durante 10 minutos) y se almacenaron a -20 °C durante 5-7 días hasta ser analizados en el laboratorio. La mineralización de la apófisis transversa izquierda de las vértebras lumbares (L4-L5) se evaluó mediante la prueba de la aguja descrita por Tokarnia et al., (2010). Las vacas se clasificaron como ‘con severa osteopenia’ si la apófisis podía ser penetrada fácilmente por una aguja hipodérmica 18G con una fuerza similar a la requerida para la introducción de una aguja en una inyección intramuscular, o se clasificaron como ‘sin severa osteopenia’ si la aguja no penetraba el hueso. Al principio y al final del experimento se realizaron biopsias de hueso en las 12<sup>va</sup> costillas izquierda y derecha, respectivamente, solo en las 5 vacas ‘con severa osteopenia’ de cada uno de los tratamientos (MMS y MMB), es decir  $n = 10$ . La técnica quirúrgica utilizada fue adaptada a la descrita por Malafaia et al. (2017) con la diferencia que el área quirúrgica fue delimitada al tercio ventral de la costilla y se utilizó una trefina de 17 mm de diámetro con una mecha guía central de 9 mm para obtener una muestra circular completa o ‘full core’ de la costilla que incluía tejido óseo cortical externo, trabecular y cortical interno.

### Análisis de laboratorio

Las concentraciones de P extraíble con bicarbonato ( $P_B$ ) en el suelo y la concentración de P en el forraje se determinaron colorimétricamente por el método de molibdato de amonio descrito por McKean (1993). Las concentraciones de P inorgánico ( $P_i$ ) y calcio (Ca) en suero se determinaron colorimétricamente por los métodos de fosfomolibdato y o-cresolphthalein complexone, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro automatizado (Dimension RxL Max integrated chemistry system; Siemens). Las muestras completas de la costilla o 'full core' (**Figura 1**) se dividieron verticalmente en dos mitades. Una mitad fue nuevamente dividida, pero de forma horizontal, separando el hueso cortical externo del resto del tejido óseo. El hueso cortical externo se pesó, se secó (100 °C), se incineró (700 °C) y la ceniza se disolvió en ácido clorhídrico 5N (Little, 1972). Las concentraciones de P y Ca se midieron mediante espectroscopía de emisión de plasma de acoplamiento inductivo (ICP, MP4200; Agilent) y se calcularon por unidad de volumen, el que se midió con el desplazamiento del menisco de agua. La otra mitad vertical de la muestra completa de la costilla se fijó en formalina tamponada neutra al 10 % durante 48 horas, y luego se descalcificó con EDTA al 12 % (pH 7,0) durante 20 a 30 días, los fragmentos fueron procesados de forma rutinaria y coloreados para histopatología con hematoxilina y eosina (HE) y Tricrómico de Masson-Goldner.

### Análisis estadístico

Se utilizó un modelo lineal mixto de medidas repetidas para evaluar el efecto del tratamiento con P (MMS y MMB), la clasificación según la prueba de la aguja (con o sin severa osteopenia) al comienzo del experimento y su interacción (tratamiento x prueba de aguja) como efectos fijos. En este modelo los animales fueron considerados como efecto aleatorio. Para las medidas repetidas se utilizó una estructura de correlación autorregresiva de orden 1, ajustada a la variable tiempo (intervalos de 3 semanas en este caso). Las variables de respuesta fueron el peso vivo, la concentración de  $P_i$ , Ca y relación Ca/P en suero y la concentración de P, Ca y ceniza en el hueso cortical.

Se realizaron pruebas *t* de Student independientes para comparar las medias de las concentraciones de  $P_i$ , Ca y relación Ca/P en suero según la clasificación de la prueba de aguja para cada intervalo de medición (3 semanas), debido a que las vacas iban cambiando su estado de mineralización ósea con la suplementación mineral. También se utilizó la prueba de *t* de Student independiente para comparar la media de consumo voluntario entre ambos tratamientos de los suplementos con P (MMS y MMB). Se utilizaron análisis de regresión lineal para comparar las relaciones entre el consumo voluntario, concentración de  $P_i$  y Ca y la relación Ca/P en el suero de cada tratamiento (MMS y MMB) con el tiempo. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Stata v.14 (Stata Corp).

## **8.4. RESULTADOS**

La deficiencia de P en cada una de las vacas, al inicio del estudio, fue determinada por la presencia de al menos uno de los siguientes signos de osteomalacia: mala condición corporal (20/20, **Figura 1a**), alotrofia (13/20, **Figura 2a**), alteraciones de la marcha (11/20), dificultad para levantarse y cifosis (5/20, **Figura 2b**), y fracturas costales (2/20, **Figura 2c**). Sin embargo, después de las 13 semanas de suplementación con las mezclas minerales con P, 18 de las 20 vacas no manifestaban ningún signo clínico de osteomalacia, mientras que las 2 vacas restantes aún mostraban una leve alteración de la marcha.

Las concentraciones de  $P_B$  en el suelo fueron de 3,2 y 3,7 mg/kg en cada uno de los potreros usados. La disponibilidad de forraje siempre fue  $\geq 1300$  kg MS/hectárea y la proporción de forraje verde fue disminuyendo de 575 a 450 g/kg MS desde el inicio al final del experimento (**Tabla 1**). La concentración de P en el forraje verde (media  $\pm$  error estándar) fue de  $1,08 \pm 0,05$  g P/kg MS siendo menor en la fracción de forraje senescente ( $0,64 \pm 0,03$  g P/kg MS).



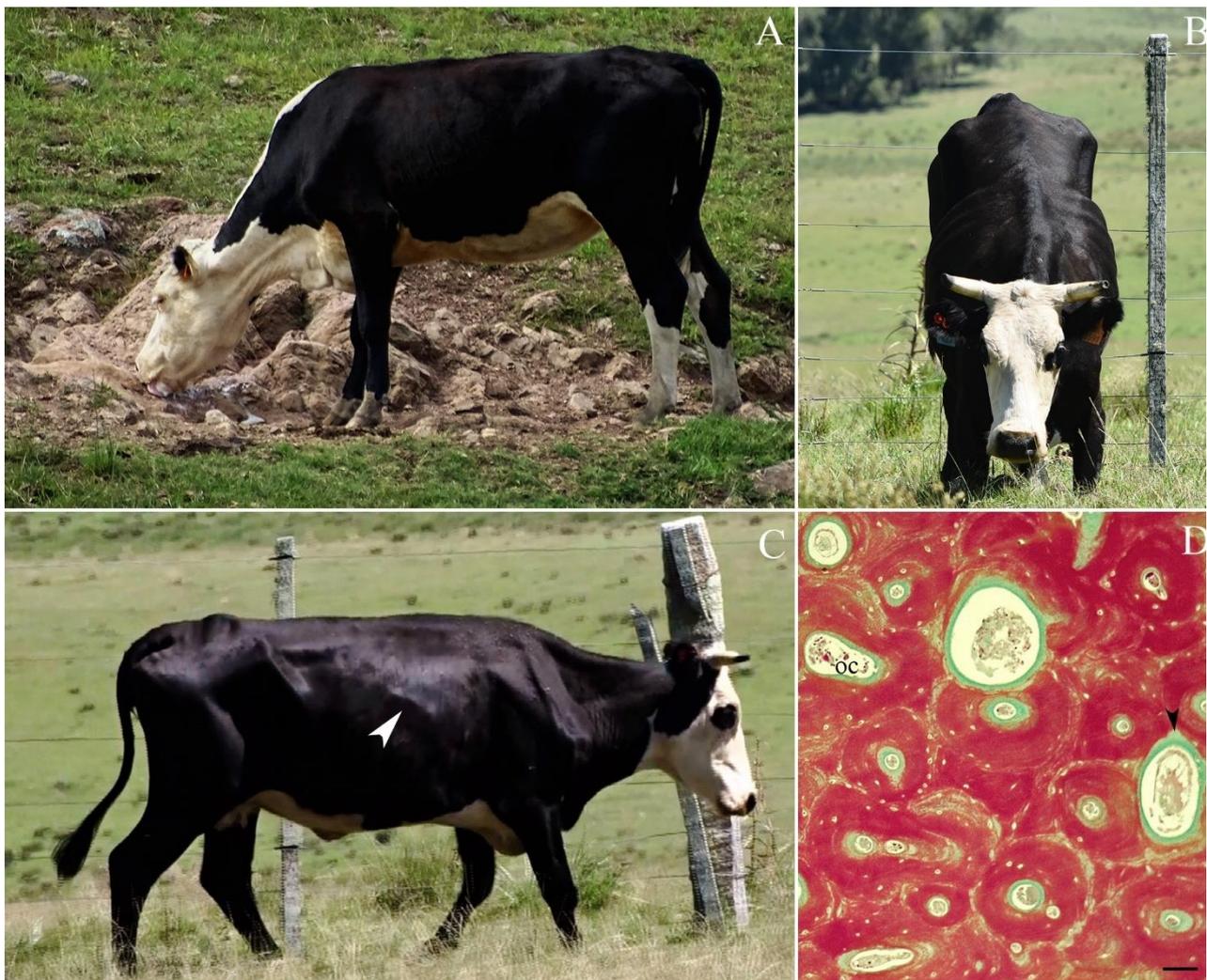
**Figura 1.** Respuesta clínica a la suplementación con fósforo en vacas con severa deficiencia crónica de fósforo. **A. Vaca en el día 1 del experimento.** La vaca tiene pobre condición corporal y posición antiálgica. **B. La misma vaca después de la suplementación con P.** Note la recuperación de la condición corporal y marcha normal. Obsérvese la herida quirúrgica en la 12<sup>a</sup> costilla derecha, sin complicaciones. En el recuadro inferior izquierdo se evidencia la muestra de hueso obtenida durante las biopsias de costilla.

Durante las 13 semanas de suplementación el consumo voluntario de MMS ( $83 \pm 5$  g de sal secado al aire/vaca/día y  $8,3$  g P/vaca/día) fue mayor ( $P = 0,022$ ) que la MMB ( $66 \pm 5$  g de sal secado al aire/vaca/día y  $6,6$  g P/vaca/día). Además, hubo diferencias en el patrón de consumo entre ambos suplementos (**Figura 3**). Durante el experimento las vacas consumieron en total  $780$  g P con la MMS y  $620$  g P con la MMB. El peso vivo de las vacas aumentó en promedio entre ambos tratamientos,  $29$  kg ( $0,3$  kg/día) durante las 13 semanas (**Figura 1b**), pero no hubo diferencias ( $P > 0,10$ ) en la ganancia de peso asociado con el tipo de mezcla mineral o por la clasificación inicial de la prueba de la aguja.

Al inicio del experimento, en promedio, todas las vacas tenían  $0,96 \pm 0,07$  mmol Pi/L y durante la suplementación aumentaron linealmente ( $P < 0,001$ ) hasta  $1,83 \pm 0,10$  mmol Pi/L. En cuanto a la clasificación de la prueba de la aguja en cada intervalo de medición (3 semanas), las vacas clasificadas ‘sin’ severa osteopenia ( $n = 74$ ) tuvieron mayores ( $P < 0,001$ ) concentraciones de Pi (media:  $1,67$  mmol/L, intervalo de confianza del 95% -IC-  $1,54$ – $1,80$ ) que las vacas ‘con’ severa osteopenia ( $n = 26$ ) (media:  $0,91$  mmol/L; IC del 95 %:  $0,79$ – $1,03$ ) (**Figura 4a**). Sin embargo, no hubo diferencias ( $P > 0,10$ ) en la concentración de Pi según la clasificación inicial de la prueba de la aguja (**Tabla 2**). En las vacas suplementadas con MMS la concentración promedio de Pi fue  $1,57$  mmol/L (IC del 95 %:  $1,33$ – $1,82$ ) mientras que para las vacas suplementadas con MMB fue  $1,37$  mmol/L (IC del 95 %:  $1,12$ – $1,61$ ), pero no fueron diferentes ( $P = 0,272$ ) (**Figura 5a**)

Las concentraciones séricas de Ca en todas las vacas en el inicio del experimento promediaron  $2,38 \pm 0,03$  mmol/L y después de 13 semanas de suplementación mineral habían disminuido ( $P <$

0,001) a un promedio de  $2,17 \pm 0,03$  mmol/L. No se observaron diferencias ( $P > 0,10$ ) en la concentración de Ca según la clasificación de la prueba con aguja tanto inicial como en cada intervalo de medición (**Tabla 2** y **Figura 4b**) o según el tipo de mezcla mineral (**Figura 5b**). En todas las vacas la relación Ca/P al inicio del experimento promedió  $2,77 \pm 0,15$  y durante el periodo de suplementación mineral disminuyó linealmente ( $P < 0,001$ ) a un promedio general de  $1,59 \pm 0,16$  al final del experimento. En cada medición de la prueba con aguja (cada 3 semanas) las vacas ‘con’ severa osteopenia tenían una relación Ca/P más alta ( $P < 0,001$ ) (media: 2,86; IC del 95%: 2,45–3,28) que las vacas ‘sin’ severa osteopenia (media: 1,54; IC del 95%: 1,39-1,68) (**Figura 4c**). En la relación Ca/P no hubo efecto ( $P > 0,10$ ) del tipo de mezcla mineral (**Figura 5c**) ni de la clasificación inicial de la prueba con aguja (**Tabla 2**).



**Figura 2. Vacas con signos severos de deficiencia crónica de P al inicio del experimento. A.** La vaca está lamiendo las piedras del suelo (pica). **B.** La vaca tiene dificultad para ponerse de pie y se nota la mala condición corporal. **C.** La misma vaca que en B, 2-3 minutos después de estar arrodillada. Note las múltiples fracturas de costillas (punta de flecha blanca). **D.** Hueso cortical de la costilla de una vaca clasificada al comienzo del experimento ‘con severa osteopenia’ según una prueba con aguja. Nótese que en varios canales osteónicos (OC) están cubiertos por tejido osteoide no mineralizado (verde) y con la luz expandida (punta de flecha negra). Tricrómico de Masson-Goldner. (Barra = 100  $\mu$ m).

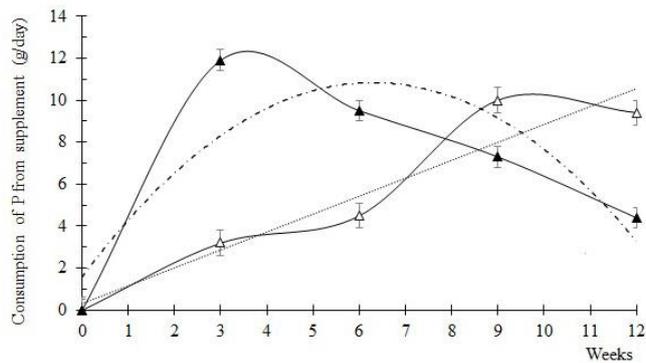
**Tabla 1.** Mediciones realizadas en el forraje del campo natural (dominado por gramíneas perennes C4) muestreados de los dos potreros durante el experimento realizado entre el 26 de febrero al 31 de mayo de 2019.

Variable	Unidad	Intervalo de muestreo (semanas)					Media $\pm$ E.E.
		0	3	6	9	12	
<i>Potrero 1</i>							
Disponibilidad de forraje	(kg MS/ha)	1325	1525	1475	1500	1375	1440 $\pm$ 38,1
Fracción verde del forraje	(g/kg)	560	400	350	450	440	440 $\pm$ 34,8
Fracción senescente del forraje	(g/kg)	440	600	650	550	560	560 $\pm$ 34,8
Concentración de P	(g/kg MS)						
Fracción verde		1,20	1,20	1,10	1,28	1,28	1,21 $\pm$ 0,03
Fracción senescente		0,87	0,70	0,64	0,52	0,57	0,66 $\pm$ 0,06
Muestra entera		1,06	0,90	0,80	0,86	0,98	0,92 $\pm$ 0,04
<i>Potrero 2</i>							
Disponibilidad de forraje	(kg MS/ha)	1550	1250	1275	1450	1500	1405 $\pm$ 60,4
Fracción verde del forraje	(g/kg)	590	390	400	450	460	458 $\pm$ 35,7
Fracción senescente del forraje	(g/kg)	410	610	600	550	540	542 $\pm$ 35,7
Concentración de P	(g/kg MS)						
Fracción verde		1,00	1,02	0,94	0,99	0,78	0,94 $\pm$ 0,04
Fracción senescente		0,62	0,69	0,62	0,58	0,59	0,62 $\pm$ 0,02
Muestra entera		0,84	0,81	0,75	0,78	0,68	0,77 $\pm$ 0,03

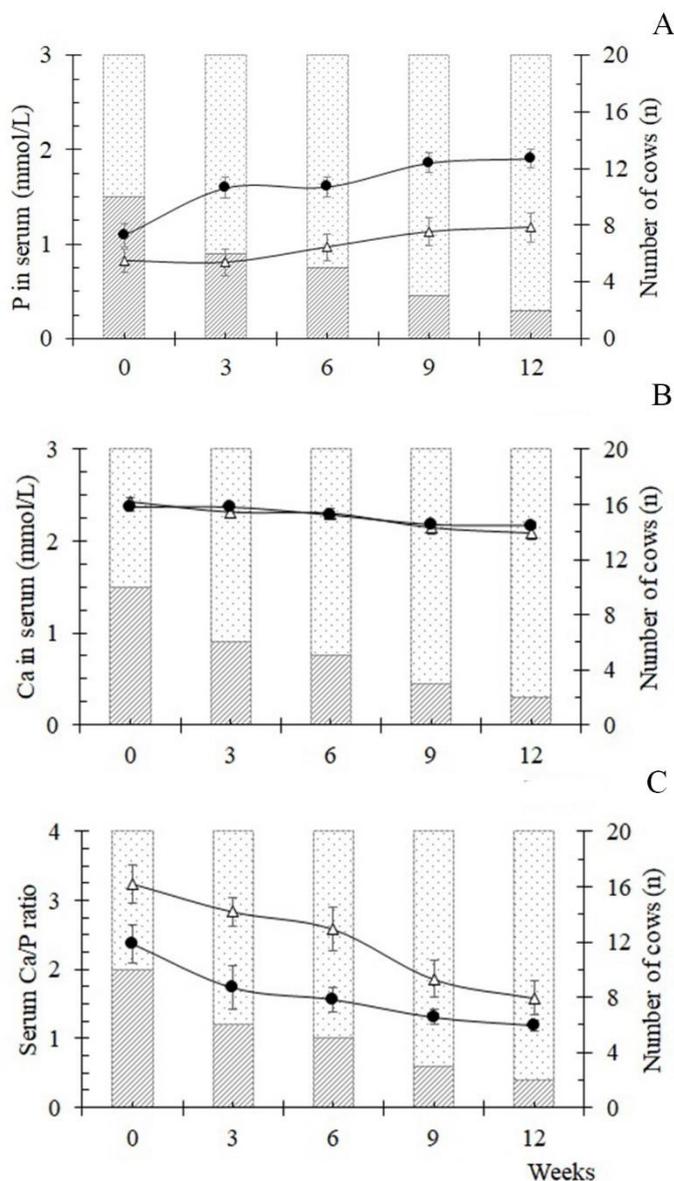
P, fósforo; MS materia seca; E.E., error estándar.

El hueso cortical de las costillas de las 10 vacas clasificadas ‘con’ severa osteopenia (5 con MMS y 5 con MMB) al inicio del experimento tenían en promedio 531  $\pm$  21,5 mg de ceniza/mL, 85  $\pm$  3,8 mg P/mL y 202  $\pm$  9,3 mg Ca/mL. Después de 13 semanas de suplementación mineral las mismas vacas habían incrementado ( $P < 0,001$ ) las concentraciones de ceniza (640  $\pm$  21,5), P (114  $\pm$  3,8) y Ca (253  $\pm$  9,3) en hueso. Adicionalmente, al final del periodo de suplementación las vacas suplementadas con MMS tuvieron concentraciones más altas de ceniza ( $P = 0,148$ ), P ( $P = 0,042$ ) y Ca ( $P = 0,051$ ) en el hueso cortical de la costilla que las vacas suplementadas con MMB (**Figura 6**).

Respecto a los estudios histopatológicos de las 10 vacas clasificadas como ‘con’ severa osteopenia, en el inicio del experimento, todas (10/10) tenían lesiones de osteomalacia que consistían en un adelgazamiento severo del tejido óseo cortical y trabecular y presencia de tejido osteoide no mineralizado que cubría las superficies trabeculares y los canales osteónicos (**Figura 2d**). Después de la suplementación mineral, solo dos vacas aún mostraban lesiones de osteomalacia, mientras que el resto se habían recuperado de las severas lesiones observadas al comienzo del experimento.



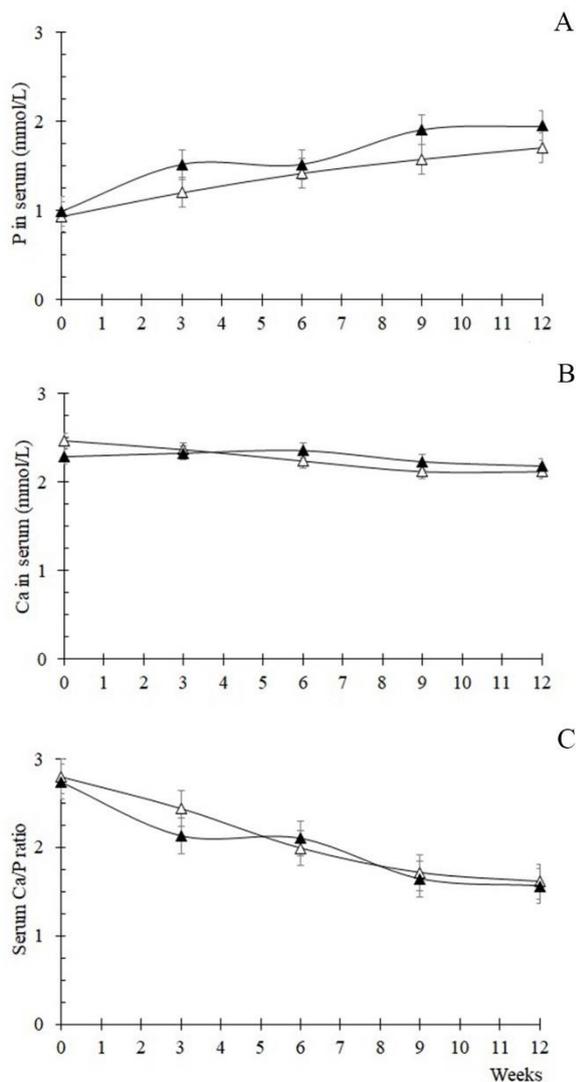
**Figura 3.** Consumo de fósforo suministrado en mezclas minerales sueltas (MMS -▲-) o en mezclas minerales comprimidas en bloques (MMB -Δ-), ambos ofrecido *ad libitum* durante 13 semanas a vacas con signos de osteomalacia. Las relaciones fueron:  $y = -0,233x^2 + 2,94x + 1,58$ ;  $r^2 = 0,74$  (- · -) para las MMS;  $y = 0,85x + 0,29$ ;  $r^2 = 0,91$  (·····) para las MMB.



**A** **Figura 4.** Concentraciones medias de fósforo inorgánico (P, Fig. 4a) y calcio (Ca, Fig. 4b) en suero y relación Ca/P (Fig. 4c) de las 20 vacas con signos de osteomalacia clasificadas según la prueba de la aguja 'con' (Δ) o 'sin' (●) severa osteopenia en cada intervalo de 3 semanas. Adicionalmente en el eje secundario se representa el número de vacas clasificadas 'con' (en los histogramas con ///) o 'sin' (en los histogramas con :::) severa osteopenia.

**B**

**C**



A **Figura 5.** Concentraciones medias de fósforo inorgánico (P, Fig. 5a) y calcio (Ca, Fig. 5b) en suero y relación Ca/P (Fig. 5c) en las 20 vacas con signos de osteomalacia que fueron alimentadas con mezclas minerales sueltas (MMS; ▲) o mezclas minerales comprimidas en bloque (BMM, Δ), ambos con 100 g de P/kg. Las relaciones de la regresión entre P, Ca o Ca/P no difirieron ( $P > 0,10$ ) entre ambos tratamientos, pero sí ( $P < 0,001$ ) con el tiempo ( $x =$  semanas) de la siguiente manera:

$$P = 0,072x + 1,036 \quad (n = 100; r^2 = 0,27; P < 0,001)$$

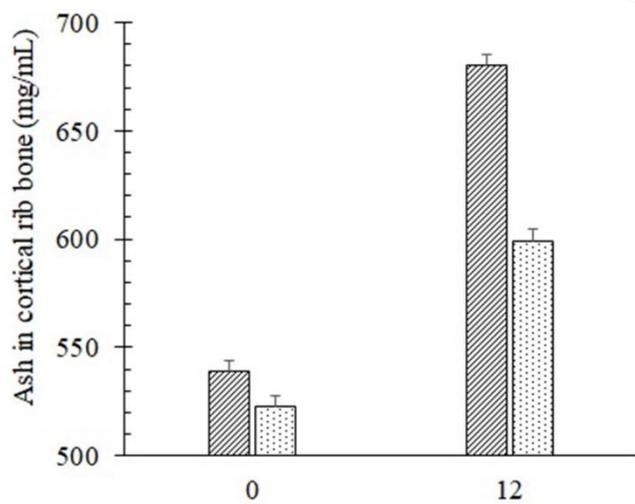
$$Ca = -0,019x + 2,387 \quad (n = 100; r^2 = 0,30; P < 0,001)$$

C  $Ca/P = -0,125x + 2,665; \quad (n = 100; r^2 = 0,33; P < 0,001)$

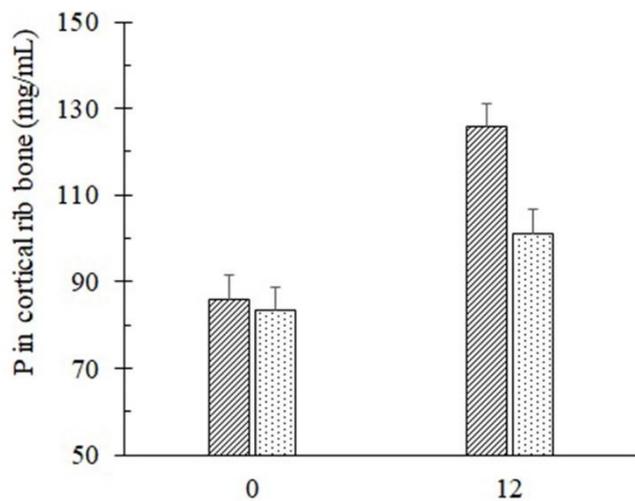
**Tabla 2.** Medias de las concentraciones de fósforo inorgánico (Pi) y calcio (Ca), y la relación Ca/P en suero de vacas clasificadas según la prueba de la aguja ‘con’ o ‘sin’ severa osteopenia al comienzo del experimento

	Vacas inicialmente con severa osteopenia		Vacas inicialmente sin severa osteopenia		E.E.	<i>p-value</i>
	<i>n</i>	Media	<i>n</i>	Media		
Pi (mmol/L)	10	1,37	10	1,57	0,128	0,298
Ca (mmol/L)	10	2,30	10	2,25	0,028	0,207
Ca/P	10	2,11	10	1,66	0,189	0,113

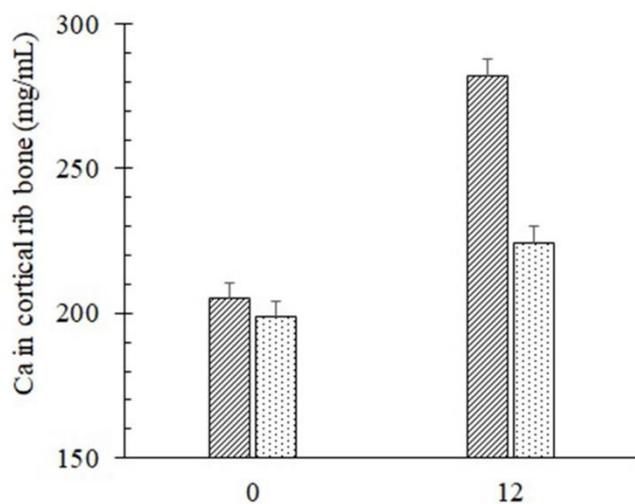
*E.E.*, error estándar de la media; *n*, número de vacas



A **Figura 6.** Las concentraciones medias de ceniza (Fig. 6a), fósforo (P, Fig. 6b) y calcio (Ca, Fig. 6c) en el hueso cortical de la costilla de vacas (n = 10) clasificadas como “con severa osteopenia” al inicio del experimento y después de 13 semanas de suplementación con P ofrecido como mezclas minerales sueltas (histograma con //) o mezclas minerales comprimidas en bloques (histograma con ::).



B



C

Weeks

## 8.5. DISCUSIÓN

Las bajas concentraciones de P en suelo ( $\leq 4$  mg/kg), forraje verde ( $< 2$  g/kg MS), suero ( $< 1,6$  mmol/L) y costilla ( $< 120$  mg/mL), y la alta relación Ca/P en suero ( $> 2$ ) al comienzo del experimento, todos fueron consistentes con una severa deficiencia crónica de P (Little & Shaw, 1979; Anderson et al., 2017; Dixon et al., 2017; 2020a,b). Además, dado que había suficiente oferta de forraje disponible para un desempeño productivo de los animales (Da Trindade et al., 2012) y aproximadamente la mitad de la biomasa de forraje estaba compuesta por la fracción verde, de buen valor nutricional estimado, los signos clínicos observados en las vacas no se debían a una desnutrición general, pero si claramente debido a una deficiencia de P. Una mención especial merece el destete de los terneros de dichas vacas ya que ésta práctica de manejo redujo  $\frac{1}{3}$  los requerimientos diarios de P de las vacas pasando de  $\sim 21$  a  $\sim 13$  g/día (CSIRO, 2007; NRC, 2016). Suponiendo que las vacas seleccionaron una dieta compuesta mayoritariamente por la fracción verde de pasto y que el consumo de forraje fue de 20-25 g MS/kg de peso vivo, el pasto debería haber proporcionado  $\sim 9$  g P/día. Esto sería aproximadamente el 70% de sus requerimientos de P después del destete, y cerca del 40-50% de sus requerimientos de P mientras las vacas estaban en lactación antes de que comenzara el experimento. Con el consumo promedio de P suplementario (8,3 y 6,6 g P/día para las vacas con MMS y MMB, respectivamente) durante las 13 semanas, las vacas consumieron 2-4 g P/día más que su requerimiento postdestete.

Nuestros resultados evidenciaron los beneficios de la suplementación con P, los cuales se reflejaron en los aumentos en el peso vivo, concentraciones de Pi y las concentraciones de P y Ca en las costillas, y disminución en la concentración de Ca y Ca/Pi en suero. Además se verificó la reducción de tejido osteoide no mineralizado observado por histología, que fueron comparables con los hallazgos de otros estudios (Jubb & Crough, 1988; Quigley & Poppi, 2013; Dixon et al., 2020a,b).

En nuestro experimento, la MMS fue más efectiva que la MMB para el tratamiento y recuperación de vacas con severa osteopenia y osteomalacia. La mayor respuesta obviamente se debió simplemente a la mayor ingesta de P de las MMS. Dado que las MMB y las MMS diferían solo en su forma física, el consumo voluntario más bajo de las MMB probablemente ocurrió por una mayor dificultad y mayor tiempo requerido por las vacas para ingerir (lamiendo) las MMB en comparación con la facilidad de ingerir MMS. Además, el mayor tiempo requerido en el punto donde se ingieren las MMB puede haber llevado a una mayor competencia y a efectos de la dominancia social de algunos animales en el consumo de MMB (Beilharz & Zeeb, 1982).

Las cantidades totales de P suplementario ingerido durante las 13 semanas del experimento (780 y 620 g P/vaca para la MMS y MMB, respectivamente) fueron comparables con las cantidades estimadas de P que queda disponible (560 g P) durante la movilización de 30% de las reservas minerales óseas según el peso vivo de las vacas del presente estudio (Dixon et al., 2017). Tal movilización frecuentemente puede ocurrir en vacas que están consumiendo pasturas deficientes en P. Esta capacidad fisiológica de las vacas para utilizar las reservas minerales óseas durante intervalos de alta demanda de P como al final de la gestación y la lactancia parece ser un mecanismo importante para permitir que las vacas sobrevivan y puedan reproducirse, aunque a menudo con menor frecuencia, en ambientes limitados en P (Dixon et al., 2017). El aumento de P en el hueso cortical de las costillas de 86 a 126 mg/mL en las vacas con MMS, después de 13 semanas de suplementación con P, se compara con la concentración de P cortical de las costillas vacas con reservas completas de P en hueso ( $\geq 150$  mg/mL) (Dixon et al., 2019b, 2020b). Por lo tanto, nuestro estudio demostró que en vacas recién destetadas que comen pasturas deficientes en P, un consumo de alrededor de 8 g de P suplementario/día durante 13 semanas fue suficiente y efectivo para permitir que las vacas

recuperaran una proporción sustancial de las reservas corporales de P movilizadas durante la deficiencia de P anterior. Sin embargo, sólo una vaca suplementada MMS tenía >150 mg de P/mL en el hueso cortical de la costilla, lo que sugiere que la recuperación completa de las reservas óseas de P en la mayoría del rodeo requerirá un intervalo de suplementación más largo y/o con la ingestión de mayores cantidades de P suplementario. Cuando la osteomalacia es endémica, es deseable que las vacas recuperen completamente las reservas óseas de P para permitirles producir o sobrevivir durante el próximo intervalo de deficiencia de P.

La menor respuesta a la suplementación con P observada en las 2 vacas con severa osteomalacia probablemente se asoció con un consumo más bajo o nulo de sales y P por parte de estos animales. Adicionalmente, dado que estas vacas tenían severa osteopenia y osteomalacia, el menor consumo de suplemento mineral también pudo haber estado asociado con la dificultad para caminar y acceder a los suplementos posiblemente por las avanzadas lesiones en el sistema locomotor (Jubb & Crough, 1988; Riet-Correa, 2007). Estas bajas ingestas voluntarias de suplementos por parte de algunos animales pueden abordarse mediante opciones de manejo, como cambiar los ingredientes o composición de las sales (ej., bajando la concentración de NaCl o agregando melaza o afrechillo) para aumentar la palatabilidad del suplemento mineral, también se puede entrenar a los animales y/o separar las vacas con bajo o nulo consumo de suplemento mineral y manejarlos como un rodeo separado (Tokarnia et al, 2000; Dixon et al., 2003). Dada la frecuencia y la importancia económica de la deficiencia crónica de P (Holmes, 1990; Schild et al., 2021a), se justifica una mayor investigación para identificar cuáles son las regiones y los rebaños donde ocurre la deficiencia de P, así como para desarrollar mejores prácticas de manejo para prevenir adecuadamente la enfermedad.

## **8.6. CONCLUSIÓN**

Las vacas con osteomalacia que consumen forrajes de campos naturales deficientes en P pueden tratarse de manera efectiva mediante la provisión de suplementos fosfatados. El uso de MMS permite un mayor consumo de P respecto a MMB. En las circunstancias del experimento, el estatus de P en las reservas óseas, de las vacas con severa deficiencia de P y recientemente destetadas, se acercó a los niveles normales de P después de 13 semanas de suplementación con MMS, pero el tiempo requerido para el tratamiento y la recuperación completa dependerá de la gravedad de la deficiencia de P y del consumo de P del suplemento.

## **8.7. AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al Sr Benjamín Barros y al Ing. Agr. Alejandro Botello, encargado y propietarios del establecimiento donde se realizó en experimento, por su ayuda en el trabajo de campo. Agradecemos a Pablo Fraga, Julio Larronda, Sol Andrés, Agustina Rovira, Martín Lucas, Gonzalo Escayola, Luis Moreno y Emanoelly Machado de Souza por la asistencia en el experimento; a Daniel Basaund y Cecilia Alvarez por la asistencia en los análisis de laboratorio y al Microlab (Nafecor S.A.) por el préstamo del equipo Dimension® RxL Max.

## **8.8. FINANCIACIÓN**

Este trabajo fue financiado por el proyecto FMV\_1\_2017\_1\_136347 de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Una beca de doctorado y una beca para culminar el doctorado fueron otorgadas a Carlos Schild por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y la Comisión Académica de Posgrado de Universidad de la República.



## 9. CAPITULO 4. DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN VACAS DE PRIMERA CRÍA QUE PASTAN EN CAMPOS NATURALES DE 32 ESTABLECIMIENTOS GANADEROS DEL NORTE DE URUGUAY.

### 9.1. RESUMEN

En Uruguay existe escasa información que ayuda a los productores ganaderos a definir estrategias de suplementación mineral con fósforo (P) en sistemas de cría basados en campos naturales. Los objetivos de este trabajo son: (i) evaluar las concentraciones de P en suelo, forraje y sangre de vacas de primera cría que pastan en campos naturales en los que hubo sospechas de carencia de P en la región norte de Uruguay y (ii) definir posibles estrategias de suplementación con P. En 32 establecimientos ganaderos se realizaron muestreos simultáneos en el suelo, forraje de campo natural, sangre y heces de animales durante la primavera de 2017 y el verano de 2018. En todas las muestras se determinó la concentración de P. La media general de P en el suelo (2,53 mg P<sub>B</sub>/kg), en el forraje verde (1,55 g/kg MS), en la sangre (1,37 mmol/L) y en las heces (2,51 g/kg MS) estaban debajo de las concentraciones normales o esperadas para dietas con adecuada concentración de P. El 22,1% de las vacas muestreadas tenían severa deficiencia de fósforo inorgánico (Pi) en sangre ( $\leq 1$  mmol/L). Los establecimientos en los que se observó animales con alotrofagia (pica) tuvieron ( $P < 0,001$ ) más chance de tener deficiencia de P en el forraje ( $< 2,0$  g P/kg MS; Odds Ratio -OR-: 7,35) y en la sangre de los animales muestreados ( $\leq 1$  mmol Pi/L; OR: 3,2). Los establecimientos clasificados con severa deficiencia de P en el suelo ( $\leq 4$  mg P/kg) tuvieron ( $P < 0,001$ ) menor calidad de forraje (P y PC), vacas con menor ( $P < 0,001$ ) estado corporal y menor ( $P < 0,001$ ) concentración de Pi en sangre. En la primavera se detectaron bajas concentraciones de P en el forraje verde en el 90,3% de los establecimientos muestreados. En el verano el 96,9% de los predios tenía baja disponibilidad ( $< 1200$  kg/MS) y baja concentración de P en el forraje verde y, además, el 65,6% de los predios tenía baja concentración de proteína cruda (PC,  $< 94$  g/kg MS) en el forraje verde. Estas concentraciones de P y PC los campos naturales tanto en primavera como en verano están limitando la producción de las vacas de primera cría. Para prevenir la deficiencia de P o para obtener un mayor retorno económico la suplementación mineral con P debería realizarse en la primavera cuando no hay otras limitantes aparentes. Adicionalmente, en establecimientos con severa deficiencia de P en el forraje y con antecedentes de osteomalacia en los animales la suplementación mineral con P preventivamente debería extenderse hasta el fin del verano en las vacas en lactación para prevenir nuevos casos de osteomalacia y para recuperar por completo las reservas óseas de P. Para cubrir los requerimientos de P de las vacas de primera cría es necesario utilizar sales minerales comerciales con alta concentración de P (ej., 80-100 g P/kg) en las regiones con carencia severa de P y utilizar sales minerales comerciales con moderada concentración de P (ej., 60-80 g P/kg) en regiones con deficiencia marginal de P.

**Palabras claves:** bovinos; campo natural, carencia de fósforo, suplementación mineral, Uruguay.

## 9.2. INTRODUCCIÓN

La carencia crónica de fósforo (P) es una de las principales carencias minerales en los sistemas ganaderos extensivos (Mufarrege, 1999; Tokarnia et al., 2000), siendo la mayor restricción en la producción de bovinos de carne que pastorean forrajes con baja concentración de P (McDowell, 2003; Dixon et al., 2017). Esta carencia, en bovinos, ocurre generalmente en los campos naturales cuyos suelos contienen < 4–5 mg de P/kg (Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020a) y/o pastizales que contienen < 2,0 g de P/kg MS (Stöber, 2005; Goff, 2015; Dixon et al., 2020a). Las principales consecuencias de esta carencia son subclínicas con disminución del consumo voluntario, baja ganancia o pérdida de peso y bajas tasas de destete y fertilidad del rodeo (Malafaia et al., 2004; Tokarnia et al., 2010; Constable et al., 2017). Esta carencia mineral puede revertirse con la adecuada suplementación oral de P (Ternouth, 1990; Suttle, 2010)

Los forrajes y los suelos pueden clasificarse como con ‘carencia severa’, ‘carencia marginal’ y/o ‘adecuada concentración de P’; y en función de este grado de deficiencia se han estimado las posibles respuestas a la suplementación mineral fosfatada (Dixon et al., 2020a). Cuando mayor es el grado de deficiencia de P, mayor será la respuesta a la suplementación mineral con P, siempre y cuando este mineral sea el principal limitante (Dixon et al., 2020a; Tafernaberry & Udaquiola, 2021). En países como Australia, Argentina y Brasil donde hay regiones con carencia de P endémica, la suplementación oral con P implica ganancias de 20 a 40 kg de peso vivo (p.v.) al año, 10% a 30% más terneros destetados en vacas de cría e incluso adelantar hasta en 1 año el primer servicio de las vaquillonas que generalmente es a los 3-5 años (Mufarrege, 1999; Malafaia et al., 2004; Mufarrege, 2004; Dixon et al., 2020a). En estas regiones donde las pasturas contienen durante la mayor parte del año concentraciones bajas de P, la suplementación es económicamente viable sólo en la época lluviosa, donde el P es la principal limitante. Esto se debe a que, en la estación seca, a pesar de que las pasturas tienen menos P, otros factores son los principales limitantes como la concentración de energía y de proteína (Tokarnia et al., 2000; Riet-Correa et al. 2007; Jackson et al., 2012). Adicionalmente, cuando en la estrategia de suplementación mineral se considera únicamente el o los aportes de los minerales deficientes de las pasturas, concepto conocido como *suplementación mineral selectiva* (Tokarnia et al., 2000; Peixoto et al., 2005) habrá una disminución substancial de los costos de producción sin afectar la productividad y la salud de los animales (Malafaia et al., 2004). Sin embargo, en determinadas circunstancias resulta difícil de aplicar este concepto debido a la complejidad de formular una sal mineral para cada establecimiento incluso para cada potrero.

En Uruguay, donde la deficiencia de P es conocida desde 1917 (Rubino, 1928), varios estudios evidencian mejores respuestas a la suplementación mineral con P: Arroyo & Mauer, (1982), Gómez Haedo & Amorín, (1982) y Tafernaberry & Udaquiola (2021) observaron mejores ganancias diarias de peso en novillos y terneras de recría; Arroyo & Mauer, (1982) y Uriarte et al., (2000) y Pittaluga, (2009) observaron mejores índices de preñez en vaquillonas de primera cría; y Uriarte et al., (2000) y Quintans et al., (2005) observaron mayor peso de terneros al destete en rodeos suplementados con sales minerales. Sin embargo, en la unidad experimental “Palo a Pique” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de Treinta y Tres y en la unidad experimental “Glencoe” de INIA Tacuarembó, no se observaron diferencias entre animales suplementados y los controles (Pittaluga, 2009). Una posible explicación a esta falta de respuesta fue la gran variación las concentraciones de P los forrajes del campo natural y/o a la falta de forraje disponible (Pittaluga, 2009). En otro estudio realizado en Uruguay donde se evaluaron las respuestas reproductivas en vacas multíparas y vacas de primera cría (con incrementos significativos de los índices de preñez en las vacas suplementadas) no se observaron diferencias entre el uso de una suplementación mineral selectiva y una sal formulada

comercialmente (Uriarte et al., 2000). En la **Tabla 1** se presentan los resultados de los ensayos de suplementación mineral con P realizados en Uruguay.

En el País, el uso de sales minerales es escaso o insuficiente e incluso incorrecto (Soto & Reinoso, 2012; Schild et al., 2021a). En función del contenido de P de las pasturas uruguayas Pittaluga, (2009) y Soto & Reinoso, (2012) recomiendan usar sales minerales con 6-10% de P administrado vía oral en forma de mezcla minerales suelta o comprimidas en bloques durante los meses de septiembre a diciembre. La información antes mencionada destaca la necesidad de la suplementación con P en bovinos que pastan en campos naturales en múltiples regiones de Uruguay, así como también evidencian la necesidad de conocer las concentraciones de P de las sales minerales que más se adecuarían a cada región.

Los objetivos de este capítulo son: (i) evaluar las concentraciones de P en suelo, forraje y sangre de vacas de primera cría que pastan en campos naturales en los que hubo sospechas de carencia de P en la región norte de Uruguay y (ii) profundizar en las posibles estrategias de suplementación con P en vacas de primera cría.

**Tabla 1. Ensayos de suplementación con sales minerales realizados en Uruguay.** Se describen el tipo de respuestas (concentración de fósforo inorgánico en sangre -Pi-, ganancia diaria de peso -GDP-, peso vivo de los terneros destetados correspondiente a las vacas incluidas en los experimentos -p.v.- y tasa de preñez) y el sentido de dicha respuesta (aumento con números positivos, disminución con números negativos rojos y/o sin diferencia con 0) en las distintas categorías de animales suplementados con sales minerales con fósforo (P) respecto a los animales usados como control. Los números son la diferencia entre los animales suplementados con sales que tienen P y los animales usados como control sin suplementación mineral. Cuando el experimento fue realizado en dos y más categorías de animales, el resultado de cada respuesta evaluada para cada categoría estudiada, fue colocado siguiendo el mismo orden de la columna categoría (ej. en la fila de Pittaluga 1980, la categoría de vaquillona tubo un 21% menos de preñez que el control sin suplementación mineral, mientras que la categoría vacas de primera cría evidenció un aumento del 6% respecto al control sin suplementación mineral y un aumento de 35% para las vacas multíparas).

Referencia bibliográfica	Región y año	Respuesta de los animales suplementados con sales fosfatadas respecto a los controles <sup>1</sup>				Categoría
		Pi (mmol/L)	GDP (g)	p.v. (kg)	Preñez (%)	
De León Lora, 1963	Colonia (1962-1963)		(15) <sup>A</sup>		(16) <sup>A</sup>	VC
Schiersmann, 1965	Colonia (1962-1965)	(0,41) <sup>C</sup>		(-8) <sup>C</sup>	(6) <sup>C</sup>	VM
Pittaluga et al., 1980	Tacuarembó (1975-1976)	(0,25), (0,35) y (0,25) <sup>C</sup>			(-21), (6), (35) <sup>C</sup>	VQ, VC, VM
Pittaluga, 1980	Paysandú (1977-1978)			(-13) <sup>C</sup>	(9) <sup>C</sup>	VM
Gómez Haedo & Amorín, 1982	Cerro Largo (1982)	(0,09)	(71)			NO
Arroyo & Mauer, 1982	Cerro Largo (1982)	(0,16) <sup>A,D</sup>	(78), (205), (30) <sup>B</sup>	(n/c), (-3), (6) <sup>A</sup>	(0), (43), (-1) <sup>B</sup>	VQ, VC, VM
Barrios et al., 1984	Cerro Largo (1984)	(0,09) <sup>A,D</sup>		(-11), (2)	(-11), (0)	VC, VM
Fernandez Liñares et al., 1985	Río Negro (1985)	(0,06), (-0,13) <sup>B</sup>	(30) y (9) <sup>B</sup>	(7) <sup>B,D</sup>	(15), (3) <sup>B</sup>	VC, VM
Pittaluga, 2009	Salto (1986)				(24) <sup>C</sup>	VQ
Pittaluga, 2009	Treinta y Tres (1986)	(0,09)			(15) <sup>C</sup>	VC
Uriarte et al., 2000	Paysandú (1997/99)	(0,48), (0,61), (0,51) <sup>C</sup>		(24) <sup>D</sup>	(0), (21), (30) <sup>B</sup>	VQ, VC, VM
Quintans, et al., 2005	Treinta y Tres (2005)	(s/d), (0,29) <sup>C</sup>	(147) y (s/d)	(15), (n/c)		TN, VM
Pittaluga, 2007	Tacuarembó (2007)	(0,06) <sup>C</sup>		(6) <sup>C</sup>	(-6) <sup>C</sup>	VM
Pittaluga, 2009	Paysandú (2007)				(25), (2) <sup>B</sup>	VC, VM
Tafernaberry & Udaquiola, 2021	Artigas y Rivera (2019)	(0,29)	(89)			TN
<b>Medias ± Error Estándar</b>	<b>Uruguay</b>	<b>0,24 ± 0,05</b>	<b>75 ± 22</b>	<b>2,5 ± 3,7</b>	<b>10,1 ± 3,4</b>	

Referencias: VM = vaca de cría multípara; VQ = vaquillona; VC = vaca de primera cría; NO = novillo; TN = ternera de sobre año. <sup>1</sup> Salvo en los dos primeros trabajos realizados por De León Lora (1963) y Schiersmann (1965) donde los controles fueron animales suplementados con cloruro de sodio, en el resto de los trabajos los animales usados como controles no fueron suplementados con sales minerales. (A) se evidencia aumento de dicha variable respuesta en los animales suplementados vs los controles, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. (B) el aumento significativo se evidencio solo en las VC. (C) no se reportan datos respecto a la probabilidad o significancia estadística entre los grupos. (C) se reportan solo datos promedios de todas las categorías estudiadas. (n/c) no corresponde. (s/d) sin datos.

### 9.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Selección de establecimientos

A partir de reuniones con Centros Médico Veterinarios de los departamentos del norte de Uruguay: Artigas; Cerro Largo; Paysandú; Rivera; Salto y Tacuarembó, se seleccionaron 32 establecimientos que cumplieran con los siguientes criterios: (i) no suplementaban con sales minerales a animales en crecimiento incluidas vacas de primera cría; (ii) las vacas de primera cría habían estado pastoreando en campos naturales en los últimos 12 meses; (iii) dichos campos naturales no fueron fertilizados con fósforo en los últimos 30 años y (iv) tenían sospecha de deficiencia de P u otra deficiencia mineral en alguna categoría animal en los últimos 5 años. En estos 6 departamentos, había 15400 productores ganaderos con 6,1 millones de hectáreas de campo natural y el 45% de las vacas de cría de Uruguay (DIEA, 2020). El muestreo representó ~0,1% de las vacas de primera cría de la región.

#### Colecta de muestras

En cada establecimiento se realizó un muestreo de suelo al inicio del estudio (octubre, 2017), y un doble muestreo en primavera (octubre, 2017) y verano (enero, 2018) de forraje, y sangre y heces de vacas de primera cría. También se registró el estado corporal (EC) de dichos animales, así como datos generales de cada establecimiento que incluyeron: superficie total; área con campo natural destinado a la ganadería; número de vacas de multíparas; número de vacas de primera cría y número de terneros que sobrevivieron los primeros 3 meses de vida del ejercicio económico (1/julio/2017 – 30/junio/2018).

Las muestras de suelo se obtuvieron de una profundidad de 150 mm ( $n = 30$  submuestras) en cada uno de los potreros donde estaban pastando las vacas muestreadas. En éstos mismos potreros se midió la disponibilidad de forraje utilizando el método comparativo de doble muestreo (Haydock & Shaw, 1975) y se obtuvieron muestras de pasto ( $n = 30$  submuestras) por el método hand plucking (De Vries, 1995) las que fueron separadas manualmente en una fracción verde y otra senescente. Adicionalmente, de cada potrero se registraron visualmente la proporción de la cobertura vegetal de las 5 especies más dominantes (Tohill et al., 1992). Las muestras de sangre, heces y los registros del EC se obtuvieron simultáneamente en un grupo promedio de 15 (rango: 10 – 24) vacas de primera cría sumando un total de 977 animales entre ambas estaciones (464 en primavera y 513 en verano).

Las muestras de sangre se colectaron por punción de la vena yugular, se transfirieron a tubos de 5 ml con acelerador de coagulación, se centrifugaron ( $2450 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 10 minutos) y se almacenaron a  $-20^\circ C$  durante 5-7 días hasta ser analizadas en el laboratorio. Las muestras de heces fueron colectadas directamente del recto confeccionando un pool (rango: 10 - 24 muestras) por cada establecimiento. El EC fue estimado usando una escala (1-9) según Rae et al. (1993).

#### Análisis de laboratorio

En las muestras de suelo y forraje se determinó la concentración de P, además en las muestras de forraje se determinó el porcentaje de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente acida (FDA) y nitrógeno (N). En las muestras de sangre además de la concentración P se determinó la concentración de calcio (Ca) y relación Ca/P. En las muestras de heces además de la concentración de P se determinó la concentración de N.

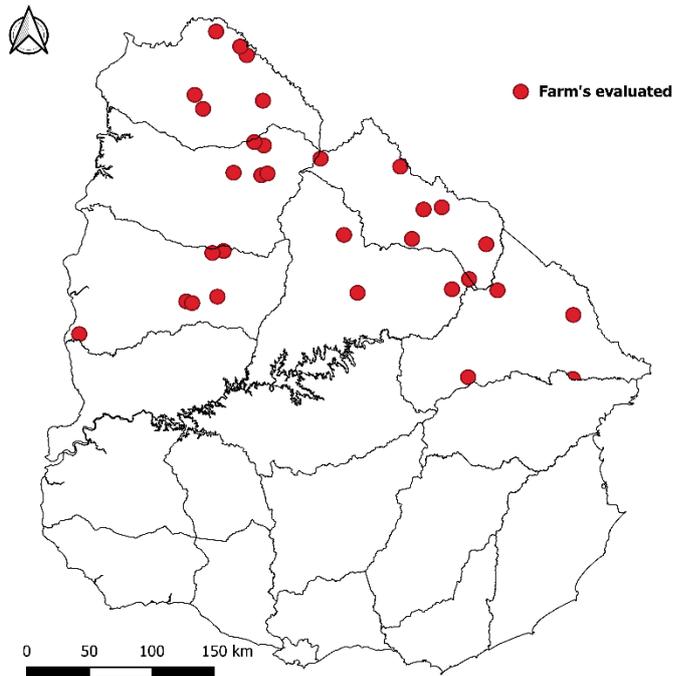
Las concentraciones de P extraíble con bicarbonato ( $P_B$ ) en el suelo y la concentración de P en el forraje se determinaron colorimétricamente por el método de molibdato de amonio descripto

por McKean (1993). El porcentaje de FDN y FDA fue determinado secuencialmente con tecnología Ankom (Fiber Analyzer 200, Ankom Technology Corporation, Fairport, N.Y) según Van Soest (1992). La concentración de proteína cruda (PC) fue determinada utilizando el coeficiente  $6,25 \times N$  total, el cual fue determinado por el método Kjeldahl (Cabrera et al., 2019). Las concentraciones de P inorgánico (Pi) y Ca en suero se determinaron colorimétricamente por los métodos de fosfomolibdato y o-cresolphthalein complejone respectivamente utilizando un espectrofotómetro automatizado (Dimension RxL Max integrated chemistry system; Siemens). En las heces la concentración de P y N fue determinada con la misma metodología usada en el forraje arriba descrito.

### Análisis estadísticos

Análisis descriptivos, análisis de regresión lineal simple y múltiple fueron realizados para evaluar las relaciones entre las concentraciones de P en suelo, forraje y sangre con el EC. Análisis de regresión logística fueron realizados para evaluar las relaciones entre las concentraciones umbrales de referencia de P en suelo ( $<4$  mg/kg), forraje ( $< 2,0$  g/kg MS) y sangre ( $<1,0$  mmol/L) con la observación de alotrofagia (pica) en los animales. Un análisis de la varianza factorial fue realizado para comparar el efecto de la estación del año (primavera o verano) sobre las medias de disponibilidad de forraje, concentración de P en forraje y sangre, relación Ca/P en sangre y EC de las vacas en ambientes con carencia severa ( $<4$  mg P/kg) o marginal ( $>4$  mg P/kg) de P en suelo. La unidad experimental fueron los establecimientos y para los análisis estadísticos se usó el software estadístico Stata® (Statacorp, Texas - USA).

Un análisis geoestadístico fue realizado para estimar las concentraciones de P en suelo y forraje en el norte de Uruguay mediante una interpolación usando el método de Kriging ordinario (Giraldo, 2002). Para la interpolación se utilizaron las muestras de P en suelo y pasto obtenida de los establecimientos muestreados en este estudio (**Figura 1**) y el software SAGA GIS 8.2.1. El modelo predictivo teórico del semivariograma del Kriging ordinario que más se ajustó a los valores de las muestras fue el modelo acotado esférico (Warrick, et al., 1986). Para la construcción de todos los mapas y creación de las isolíneas se utilizó el programa Quantum GIS (QGIS) 3.18.2.



**Figura 1.** Mapa con los establecimientos muestreados entre octubre de 2017 y enero de 2018. Los establecimientos seleccionados criaban bovinos sin usar sales minerales o mejoramientos forrajeros, además los potreros nunca habían sido fertilizados con fósforo y tenía sospecha de deficiencia de minerales.

### 9.3. RESULTADOS

En los establecimientos muestreados la mediana de la superficie de campo natural destinada a la ganadería fue de 800 ha (rango: 330-2900); la mediana del número de vacas de cría multíparas fue de 282 (rango: 60-600), de vacas de primera cría fue de 85 (rango: 25-300) y de terneros vivos que sobrevivieron los primeros 3 meses de vida fue de 200 (rango: 40 - 400). En el 43,7% (14/32) de los establecimientos los productores aseguraron que habían observado alotrofagia (pica) en los animales por lo menos en los últimos 2 años. Estos establecimientos, en los cuales había vacas con pica, tuvieron más chances (Odds Ratios -OR-: 7,35; Intervalo de confianza -IC- de 95%: 1,5 – 36,07;  $P = 0,013$ ) de tener concentraciones de P en forraje verde por debajo del umbral de referencia ( $< 2,0$  g/kg MS) y más chances (OR: 3,20; IC95%: 0,85 – 12,03;  $P = 0,085$ ) de tener vacas con concentraciones de  $P_i$  consistentes con severa deficiencia de P ( $< 1,0$  mmol/L).

En nuestro estudio, la concentración media ( $\pm$  error estándar) de  $P_B$  en suelo fue de  $2,53 \pm 0,18$  (rango: 0,81 – 7,89) mg/kg, la concentración de P en la fracción verde del forraje fue de  $1,55 \pm 0,01$  (rango: 0,94 – 3,02) g/kg MS, la concentración de P en la fracción senescente del forraje fue de  $0,77 \pm 0,01$  (rango: 0,03 – 1,73) g/kg MS y la concentración de P en las heces fue de  $2,51 \pm 0,09$  (rango: 1,41 – 6,17) mg/g MS. La concentración de  $P_i$  en las 977 vacas evaluadas fue de  $1,37 \pm 0,01$  (rango: 0,39 – 3,10) mmol/L y la relación Ca/P fue  $1,83 \pm 0,02$  (rango: 0,58 – 7,16). Adicionalmente, 216/977 (22,1%) vacas tuvieron concentraciones de  $P_i$  consistentes con severa deficiencia de P cuya relación Ca/P fue  $2,80 \pm 0,06$ .

En ambas épocas, solamente 1 (3,12%) de los establecimientos tenía concentraciones adecuadas de P en el suelo ( $\geq 8$  mg/kg); 4 (12,5%) tuvieron concentraciones adecuadas de P en el forraje verde ( $\geq 2,0$  g/kg MS); 2 (6,25%) tuvieron concentraciones adecuadas de P en las heces de las vacas muestreadas ( $\geq 4,0$  g/kg); y 290 vacas (29,68%) distribuidas en 6 establecimientos (18,75%) tuvieron concentraciones adecuadas de  $P_i$  ( $\geq 1,6$  mg/dL) en sangre. Además, solamente 4 (12,5%) establecimientos tuvieron simultáneamente concentraciones adecuadas de P en el forraje verde y en la sangre. La disponibilidad de forraje, la proporción de la fracción verde y senescente, FDN, FDA y

PC del forraje y la concentración de P en la fracción verde y senescente del forraje según la estación (primavera - verano) se detallan en la **Tabla 2**. Las principales especies observadas se detallan en la **Tabla Suplementaria 1**. La concentración de Pi, Ca, relación Ca/P, concentración de P y N en las heces según la estación del año también se detallan en la **Tabla 2**. En la primavera 5 (15,6%) y en verano 2 (6,3%) de los 32 establecimientos tenían en los forrajes concentraciones que cubrían los requerimientos diarios de P (~21 g/día) de las vacas de primera cría (**Figura 2a**). En cuanto a los requerimientos proteicos, en primavera 31 (96,9%) y en verano 11 (34,4%) de los 32 establecimientos cubrían los requerimientos diarios de proteína (> 94 g PC/kg MS) de vacas de primera cría (**Figura 2b**). Adicionalmente, en primavera 17 (53,1%) y en verano solamente 1 (3,1%) de los 32 establecimientos tenían adecuada disponibilidad de forraje para las vacas de primera cría.

Las variables que más se asociaron al estado corporal de las vacas de cría fueron la concentración de PC en la fracción verde del forraje ( $P < 0,001$ ) y la concentración de Pi en sangre ( $P = 0,019$ ) donde el  $EC = 3,00 + 0,16 PC + 0,70 Pi$  ( $P < 0,001$ ;  $r^2 = 0,33$ ). La variable que más se asoció a la concentración de Pi en sangre fue la concentración de P en el suelo ( $P = 0,003$ ) donde el  $Pi$  (mmol/L) =  $1,17 + 0,08 P_B$  ( $P < 0,001$ ;  $r^2 = 0,14$ ). La variable que más se asoció a la concentración de P en las heces fue la concentración de P en el forraje verde ( $P < 0,001$ ) donde  $P_{heces}$  (g/kg) =  $0,97 + 9,91 P_{fracción\ verde}$  ( $P < 0,001$ ;  $r^2 = 0,36$ ).

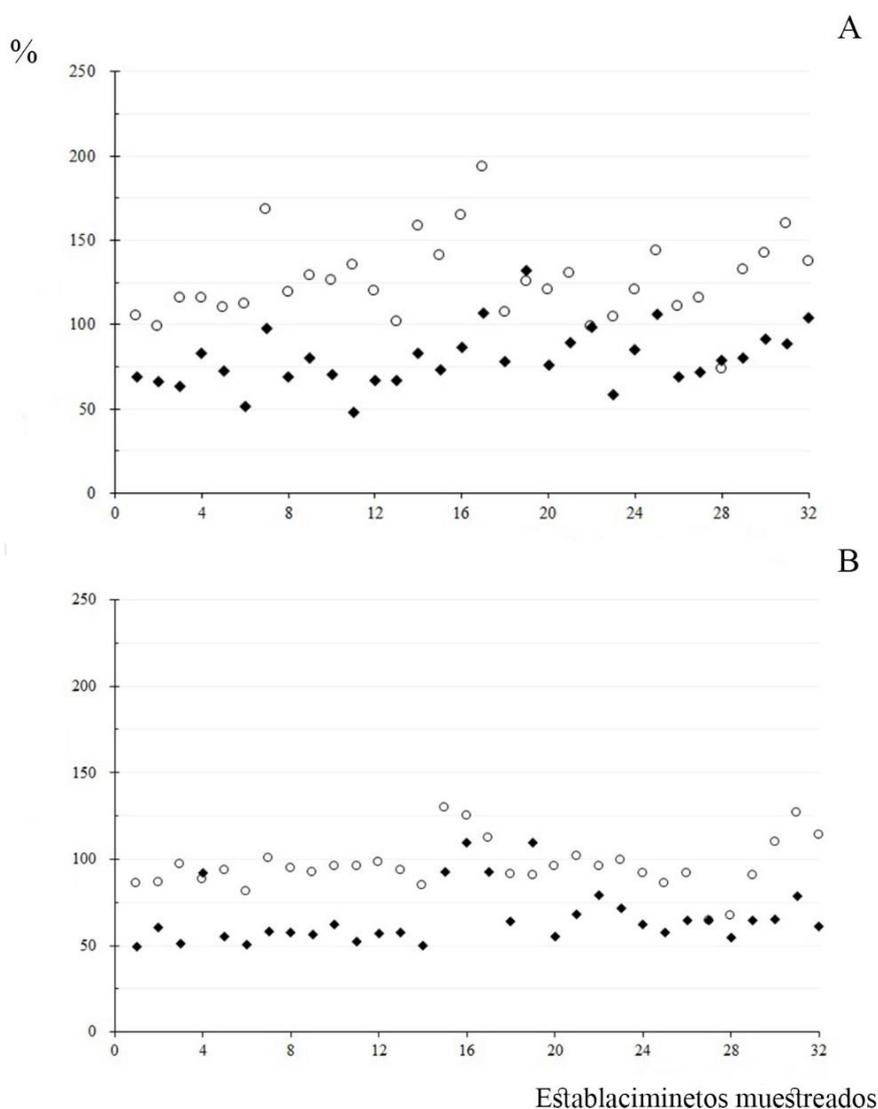
**Tabla 2.** Medias, error estándar (E.E.) y coeficiente de variación (C.V.) de las mediciones realizadas en los potreros y vacas de primera cría muestreadas durante la primavera (octubre 2017) y verano (enero 2018).

	Unidad	Primavera			Verano		
		Media	E.E.	C.V.	Media	E.E.	C.V.
<i>Forraje</i>							
Disponibilidad	kg MS/ha	1208,66	75,83	35,49	631,30	55,86	50,06
Fracción verde	g/kg MS	570,72	88,60	8,78	375,90	10,69	16,09
Fracción senescente	g/kg MS	429,28	88,60	11,67	624,10	10,69	9,69
Proteína cruda*	g/ kg MS	114,12	3,80	19,25	77,78	2,15	15,06
FDN*	%	61,52	0,54	4,98	67,31	0,42	3,57
FDA*	%	29,52	0,30	5,77	33,11	0,33	5,56
P de la fracción verde	g/kg MS	1,83	0,01	21,82	1,27	0,01	24,67
P de la fracción senescente	g/kg MS	0,95	0,01	28,59	0,58	0,01	28,83
<i>Animales</i>							
Estado corporal	1-9	5,64	0,19	19,39	5,3	0,14	15,08
Pi en suero sanguíneo	mmol/L	1,31	0,05	23,26	1,42	0,05	19,41
Ca en suero sanguíneo	mmol/L	2,12	0,03	9,75	2,37	0,02	4,98
Relación Ca/P en suero		1,69	0,07	22,80	1,74	0,07	22,53
P en heces	g/kg	2,98	0,13	25,19	2,04	0,06	16,63
N en heces	%	1,82	0,05	15,73	1,39	0,03	10,60

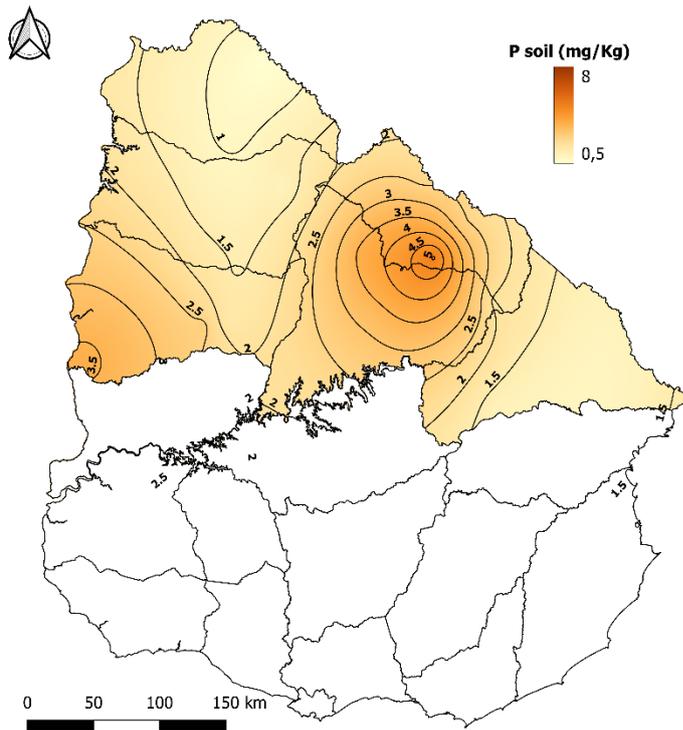
Referencias: fósforo P; fósforo inorgánico Pi; calcio Ca; nitrógeno N,

La interpolación y estimación de las concentraciones de  $P_B$  en suelo y  $P$  en forraje verde para establecimientos que crían bovinos en campo nativos que nunca fueron fertilizados y que no tenían mejoramientos forrajeros en el norte de Uruguay se evidencian en las **Figuras 3 y 4**, respectivamente.

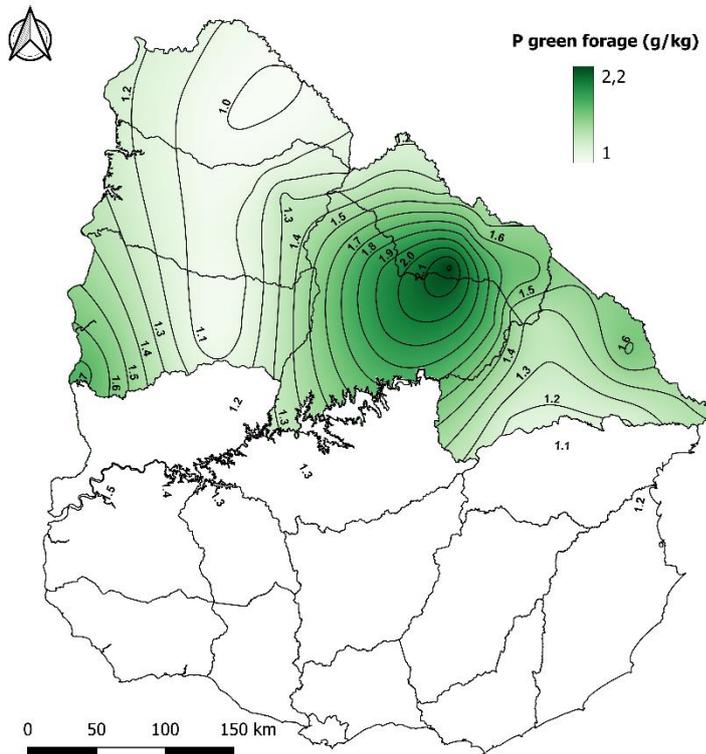
En cuanto al análisis de las variables (disponibilidad de forraje,  $P$  y  $PC$  en forraje verde,  $EC$ ,  $P_i$ ,  $Ca$ , relación  $Ca/P$  en sangre y  $P$  en heces) en función del grado de deficiencia de  $P$  en el suelo se detectó que: (i) en ambas estaciones, los establecimientos con carencia severa de  $P$  en el suelo ( $<4$  mg  $P_B/kg$ ) tuvieron forrajes con menor concentración de  $PC$  ( $P = 0,001$ ) y menor concentración de  $P$  en el forraje verde ( $P < 0,001$ ); (ii) las vacas que fueron criadas en suelos con carencia severa de  $P$ , tuvieron menor ( $P = 0,017$ ) estado corporal, menor ( $P = 0,005$ )  $P_i$ , mayor ( $P = 0,002$ ) relación  $Ca/P$  en sangre y menor ( $P = 0,004$ )  $P$  en las heces en comparación con vacas que fueron criadas en suelos con deficiencia marginal de  $P$  (**Tabla 3**). Los establecimientos cuyos suelos tenían severa deficiencia de  $P$  tuvieron 23,9% de vacas con severa deficiencia de  $P_i$  en sangre; mientras que establecimientos cuyos suelos tenían deficiencia marginal de  $P$ , solo el 7,5% de las vacas tenía severa deficiencia de  $P_i$  en sangre. Por lo tanto, los suelos con severa deficiencia de  $P$  tuvieron más (OR: 3,76; IC95%: 1,80 – 7,87;  $P = 0,004$ ) vacas con severa deficiencia de  $P$  en sangre ( $< 1$  mmol/L) que los suelos con deficiencia marginal de  $P$ .



**Figura 2.** Porcentaje de requerimientos diarios de fósforo (♦) y proteínas (○) cubiertos por la fracción del forraje verde en primavera (A) y verano (B) en cada establecimiento evaluado.



**Figura 3.** Mapa con la estimación de la concentración de P extraíble en bicarbonato en el norte de Uruguay



**Figura 4.** Mapa con la estimación de la concentración de P en el forraje verde en el norte de Uruguay durante la primavera

**Tabla 3.** Medias y probabilidades de las principales variables estudiadas en primavera y verano según el grado de deficiencia de P extraíble en bicarbonato (P<sub>B</sub>) en el suelo.

	Unidad	Primavera		Verano		e.e.	<i>p-value</i> Estación	<i>p-value</i> Suelo	<i>p-value</i> E x S
		Suelo con severa deficiencia de P (≤ 4mg P <sub>B</sub> /kg)	Suelo con marginal deficiencia de P (>4 y <8 mg P <sub>B</sub> /kg)	Suelo con severa deficiencia de P (≤ 4mg P <sub>B</sub> /kg)	Suelo con marginal deficiencia de P (>4 y <8 mg P <sub>B</sub> /kg)				
Establecimientos	n°	27	5	27	5				
Disponibilidad de forraje	kg MS/ha	1178,5	1371,5	616,10	713,44	92,18	< 0,001	0,270	0,715
P en el forraje*	g/kg MS	1,74	2,32	1,19	1,70	0,07	< 0,001	< 0,001	0,768
PC en el forraje*	g/kg MS	109,88	136,88	75,90	87,25	0,392	< 0,001	0,001	0,164
Estado Corporal	1-9	5,51	6,35	5,20	5,93	0,23	0,257	0,017	0,865
Pi en suero	mmol/L	1,27	1,51	1,37	1,69	0,07	0,152	0,005	0,684
Ca en suero	mmol/L	2,13	2,03	2,37	2,33	0,04	< 0,001	0,236	0,619
Relación Ca/P		1,75	1,36	1,80	1,39	0,09	0,749	0,002	0,976
P heces	g/kg	2,87	3,58	1,97	2,39	0,13	< 0,001	0,004	0,452

Referencias: e.e. = error estándar de la media: (\*) fracción del forraje verde.

#### 9.4. DISCUSIÓN

Las medias de P en suelo (2,52 mg/kg), forraje (1,55 g/kg MS) y sangre (1,37 mmol/P) fueron deficientes en los establecimientos con sospechas de carencia de P del norte de Uruguay, al igual que los valores promedios encontrados en otros estudios nacionales (Ungerfeld, 1998; Carriquiry & Frade, 2017). Sin embargo, claramente en nuestro trabajo se puede distinguir la región noroeste que en gran medida se corresponden con suelos de basalto superficial, con severa deficiencia de P en los suelos y forrajes; y también la región centro-norte con deficiencia marginal a concentraciones adecuadas de P en el suelo y forraje, respectivamente (**Figura 3 y 4**). Además, la región con severa deficiencia de P es próxima al norte de Entre Ríos y Sur de Corrientes de Argentina, donde la carencia de P en las vacas es endémica (Mufarrege, 2004). Es posible que aún en varias regiones del norte de Uruguay, donde se cría ganado vacuno de forma extensiva, los requerimientos de P no sean debidamente cubiertos por el campo natural.

En el presente trabajo evidenciamos que en la región norte de Uruguay la concentración de P de los forrajes de los campos naturales en la primavera podría ser una de las principales limitantes productivas, dado que no serían suficientes para cubrir los altos requerimientos de las vacas en este período. Es por ello que, sería esta la época donde la suplementación mineral con P tendría mayor efecto preventivo para la osteomalacia y, consecuentemente, un mayor retorno económico. La suplementación mineral de las vacas de cría durante la primavera, *ad libitum*, por vía oral y con cantidades adecuadas de P, de forma tal que los requerimientos sean debidamente cubiertos, posiblemente implique mejores tasas de destete, mejor peso al destete, menor intervalo entre partos y mayor tasa de reconcepción, además de la prevención de brotes de osteomalacia (Uriarte et al., 2000; Coates et al., 2019).

En el verano, a pesar de que las concentraciones de P en los forrajes de los campos naturales fueron menores que en la primavera, también había además una limitada oferta de forraje con una reducida concentración de PC (**Figura 2b**). En este período la producción estuvo limitada no solo por la falta de P sino también por la falta de energía y proteína, por lo que la sola suplementación mineral con P no tendría el mismo retorno económico que el planteado para la primavera, ya que la carencia de P es limitante en la medida que otros nutrientes no lo sean (Tokarnia et al., 2000; Suttle, 2010; Dixon et al., 2020a). Sin embargo, en establecimientos con severa deficiencia de P en el forraje y con antecedentes de osteomalacia o raquitismo en los animales preventivamente sería conveniente extender la suplementación mineral con P hasta fin del verano o inicio del otoño con el objetivo de evitar nuevos casos (osteomalacia o raquitismo) y que los animales logren completar las reservas óseas de P. Las vacas con deficiencia de P logran criar un ternero dado que la calidad de la leche se mantiene (no la cantidad) a expensas de una reducción importante del estado corporal y de las reservas óseas de P (Dixon et al., 2020a,b), pero consecuentemente tienen mayor probabilidad de tener fracturas espontáneas y por ende menor probabilidad sobrevivir al siguiente año (Schild et al. 2021a). Si sobreviven llegan a la primavera con severa deficiencia de P, de forma tal que la suplementación mineral durante la primavera no es suficiente para reponer el total de las reservas óseas de P. El uso de las reservas fisiológicas de P una práctica de manejo que podría ser usada para aliviar la deficiencia de P en épocas donde no es posible suplementar con P ya que se estima que estas reservas pueden aportar hasta 1/3 de los requerimientos diarios de P (Dixon et al., 2017). Un estudio reciente realizado en vacas con osteomalacia destetadas (de bajos requerimientos de P) demostró que incluso con extrema deficiencia de P (<1 g P/kg MS) pero con adecuada disponibilidad de forraje, la suplementación con 100 g P/kg sal, durante 3 meses en épocas de baja calidad de forrajera (ej., verano/otoño) hubo un leve incremento productivo (0,3 kg/día) con una recuperación sustancial de las reservas óseas de P (Dixon et al., 2020a; Schild et al., 2022). Después del brote de osteomalacia

ocurrido en enero de 2019 (descrito en Schild et al 2021, como brote 1) el rodeo afectado (330 vacas de cría) fue suplementado *adlibitum* con 100g P/kg, preventivamente, desde la septiembre a febrero (6 meses) durante dos ejercicios económicos y desde ese momento hasta la fecha no se registraron nuevos brotes de osteomalacia, con la salvedad de 2 a 3 vacas por temporada que evidenciaron leves alteraciones en la marcha (Comunicación personal Ing. Agr. Alejandro Botello). Más estudios que permitan evaluar prácticas de suplementación mineral en establecimientos con severa o marginal deficiencia de P en ambiente, combinadas o no con practica de manejo como el tipo de destete deber ser profundizadas. En verano otras estrategias de manejo como el ajuste de la carga animal, oferta adecuada de forraje, destete anticipado y/o la suplementación energética-proteica serían importantes prácticas de manejo para maximizar las respuestas a la suplementación con P, aunque debe ser considerada la relación costo-beneficio de su aplicación en el sistema de producción.

En función del promedio de la concentración de P en la fracción verde del forraje del campo natural durante la primavera (1,83 g/kg MS) y considerando un consumo de forraje (25mg MS/kg p.v.) y un peso estimado de 350 kg, las vacas de primera cría estarían consumiendo sólo 12-15 de los ~21 g P requeridos por día. En este contexto, serían necesarios 6 a 9 g P/día, los cuales se lograría, por ejemplo, con un consumo de 80-100 g de sales minerales comerciales de 60 a 100 g P/kg. Para lograr este consumo de P en las vacas de cría, en establecimientos con severa deficiencia de P en forraje (<1,5 g P/kg MS) sería necesario usar sales que contengan entre 80-100 g P/kg; mientras que en establecimientos cuyo forraje contienen 1,5-2,0 g P/kg MS sería suficiente el uso de sales que contengan 60-80 g P/kg. En nuestro estudio solamente 1 (3,12%) de los 32 establecimientos tenía adecuadas concentraciones de P en suelo (7,8 mg P<sub>B</sub>/kg) y forraje (> 2,2 g P/kg MS) simultáneamente y, por lo tanto, en este caso no sería necesario el uso de sales minerales fosfatadas ya que la respuesta esperada a la suplementación mineral con P sería baja o nula (Dixon et al., 2020a).

En nuestro estudio durante la primavera las vacas estaban en su pico de lactación (Espasandín et al., 2013) por lo que, al igual que el Ca, una importante cantidad de P (~1 g/L) es excretado en la leche (Dixon et al., 2020b), explicando en parte las bajas concentraciones (aunque no severamente deficientes) de Pi (1,31 mmol P/L) observadas en esta época en comparación con las concentraciones de Pi observadas en el verano (1,42 mmol P/L). A pesar de que las concentraciones de Pi en sangre en la primavera estuvieron por debajo de los valores esperados (> 1,6 mmol/L) la relación Ca/P (1,49) si fue adecuada (< 2) (Schild et al., 2022). En cambio, en esta misma época las vacas que tuvieron severa deficiencia de Pi ( $\leq 1$  mmol/L), también tuvieron altas relación Ca/P (2,62) como las que frecuentemente se observa en la osteomalacia (Anderson et al., 2017; Barbosa et al., 2018). El incremento de Pi en el verano podría explicarse por una menor producción de leche y por la movilización ósea de P desde los huesos (Espasandín et al., 2013; Dixon et al., 2017) ya que las concentraciones de P en forraje fueron menores en verano (1,27 g P/kg MS) que en primavera (1,83 g P/kg MS).

Ante un eventual brote de osteomalacia o sospecha de carencia de P, el primer paso es confirmar el diagnóstico. En el presente estudio, los establecimientos donde se observaron animales con pica tuvieron ~7 y ~3 veces más riesgo de tener deficientes de P en el forraje y la sangre respectivamente que en los predios en los que no se registró pica. En 4 brotes de osteomalacia ocurridos en verano (descritos en el capítulo II), se detectaron animales con pica; en estos campos la concentración de P en forraje y sangre fue ~1,2 g P/kg MS y ~1,1 mmol/L respectivamente, las cuales coinciden con los valores internacionales registrados para la carencia severas de P (Dixon et al., 2020a). Por lo que este signo clínico (pica) podría ser un excelente indicador de la enfermedad cuando está presente. Otros indicadores como la osteopenia determinada por la prueba de la aguja y

la fosfatemia también son excelentes herramientas de diagnóstico (Tokarnia et al., 2010; Schild et al., 2021a). Sin embargo, ninguno de estos indicadores nos permite definir estrategias de suplementación mineral. En este sentido estimar la concentración de P en el forraje por los métodos convencionales o mediante los mapas aquí planteados nos puede ayudar a seleccionar una sal mineral (adecuada a la principal categoría afectada, las vacas de primera cría) con una concentración de P complementaria al aporte de P del forraje de los campos naturales que nunca fueron fertilizados y/o que no tienen mejoramiento forrajero.

A pesar de los avances del presente trabajo, en nuestra región faltan estudios que nos ayuden a desarrollar y evaluar estrategias de suplementación mineral para incrementar la productividad, así como para prevenir alteraciones musculoesqueléticas en animales en crecimiento en establecimientos con severa deficiencia de P.

## **9.5. CONCLUSIÓN**

Los sistemas productivos basados en campo natural que nunca fueron fertilizados, que no tienen mejoramientos forrajeros y con evidencia de animales con pica, tienen deficiencia P en suelo y forraje, limitando la producción de las vacas de primera cría durante la primavera y verano. En la primavera es donde la suplementación mineral con P tendría mayor efecto preventivo y/o retorno económico. En el verano, además del déficit de P también ocurrieron limitaciones en la oferta y en el contenido de proteína cruda del forraje. Por lo tanto, al momento de decidir la suplementación con sales minerales con P se debería hacer un análisis integral de la carencia de P en conjunto con la disponibilidad de forraje y la concentración de proteína. En regiones con carencia de P, por ejemplo, el noreste de Uruguay, para cubrir los requerimientos de las vacas de primera cría durante la primavera deberían usarse sales minerales comerciales con mayores concentraciones de P (ej., 80-100 g P/kg) cuando la deficiencia de P es severa, mientras que, en regiones con carencia marginal de P, por ejemplo, el centro-norte de Uruguay, deberían usarse sales minerales comerciales que contengan moderadas concentraciones de P (ej., 60-80 g P/kg).

## **9.6. AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecemos a los veterinarios de ejercicio liberal y productores de los establecimientos incluidos en el estudio por permitirnos realizar los muestreos; agradecemos al personal técnico Alfonso Albornoz, Saulo Díaz, Mauricio Silveira de INIA Tacuarembó; agradecemos al Daniel Basaund, Raquel García y María Cuneo del laboratorio de suelos y de nutrición animal de INIA La Estanzuela por la ayuda en el procesamiento de las muestras.

## **9.7. FINANCIACIÓN**

Este trabajo fue financiado por el proyecto FMV\_1\_2017\_1\_136347 de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Una beca de doctorado y una beca para culminar el doctorado fueron otorgadas a Carlos Schild por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y la Comisión Académica de Posgrado de Universidad de la República.

## 9.8. MATERIAL SUPLEMENTARIO DE CAPÍTULO 4

**Tabla suplementaria 1.** Principales especies vegetales observadas en los campos naturales durante primavera y verano de los 32 establecimientos estudiados.

	Frecuencia	Proporción (%)
<u>Gramíneas y Leguminosas</u>		
<i>Axonopus affinis</i>	20	27,8
<i>Paspalum notatum</i>	17	23,6
<i>Cynodom dactilon</i>	8	11,1
<i>Sporobolus indicus</i>	4	5,6
<i>Botriocloa laguroides</i>	3	4,2
<i>Paspalum dilatatum</i>	3	4,2
<i>Desmodium incanum</i>	3	4,2
<i>Juncus sp</i>	3	4,2
<i>Dichondra macrocalix</i>	3	4,2
<i>Stipa setigera</i>	3	4,2
<i>Stipa charruana</i>	3	4,2
<i>Saccharum angustifolius</i>	2	3,0
<i>Andropogon lateralis</i>	1	1,4
<i>Schizachyrium microstachyum</i>	1	1,4
<u>Hierbas, graminoídes y arbustos</u>		
<i>Baccharis coridofolia</i>	21	31,3
<i>Cyperus sp</i>	11	16,4
<i>Eryngium pandanifolium</i>	7	10,4
<i>Baccharis trimera</i>	6	9,0
<i>Senecio sp</i>	6	9,0
<i>Eryngium echinatum</i>	5	7,5
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	2	3,0
<i>Amaranthus sp</i>	1	1,5
<i>Amis viznaga</i>	1	1,5



## 10. DISCUSIÓN GENERAL

En Uruguay la deficiencia mineral de P en los sistemas de producción basados en campos naturales sigue ocurriendo debido a la falta o inadecuado uso de sales minerales. En este contexto, son necesarios más estudios que nos permitan evaluar como los productores están usando las sales minerales, lo que nos permitiría detectar debilidades y fortalezas en la nutrición mineral de los bovinos.

El uso de suplementos minerales inyectables como tratamiento y/o prevención de la deficiencia crónica de P debe desalentarse por varios motivos: (a) los productos farmacéuticos generalmente contienen dosis de P que nos son metabólicamente útiles en animales con severa deficiencia de P (Soto & Reinoso, 2012), como fueron registrados en los brotes 1 y 2 del Capítulo II; (b) algunos productos farmacéuticos con compuestos orgánicos deben hidrolizarse primero para poder aportar la fracción útil de P, (muchos de ellos fallan en realizar esa conversión, eliminando más del 75% del producto en distintas excreciones), dejando en evidencia el bajo aporte de P (Grünberg, 2014); (c) algunos productos como los hipofosfitos tienen una tasa de excreción renal tan rápida (12 h) que fallan en incrementar el Pi (Grünberg, 2014); y (d) además de que es impracticable, desde el punto de vista logístico, el encierro diario de los animales severamente enfermos puede ser un riesgo para las fracturas debido al atropellamiento que los animales sufren en los corrales.

En el estudio de los brotes del Capítulo II, en todos los establecimientos se observó que algunos los animales además de ‘osteofagia’ tenían otra forma de alotrofagia, como ‘geofagia’, la cual también está asociada a otras deficiencias minerales como la de Na (Tokarnia et al., 2010). A pesar de que las concentraciones de Na en sangre, saliva y forraje no fueron determinadas, no observamos los clásicos signos (polidipsia, poliuria) y lesiones (impactación ruminal e hipertrofia de la zona glomerular de glándula adrenal) reportados en animales con severa deficiencia de Na (Cunha et al., 2022; Tokarnia et al., 2010). Esto sugiere que la ‘geofagia’ observada posiblemente estuvo asociada a la deficiencia de P y/o a una deficiencia subclínica de Na dado que la mayoría de los campos naturales de Uruguay tienen bajas concentraciones de ambos minerales (Ungerfeld, 1998). Como la deficiencia de Na, al contrario de la deficiencia de P, es fácilmente revertida con casi cualquier sal mineral comercial que contenga NaCl, la elección de la sal mineral a suplementar debe basarse en función de deficiencia de P y no en la deficiencia de Na.

La deficiencia de Vitamina D en bovinos produce las mismas lesiones y signos clínicos que la deficiencia de P (Stöber et al., 2005; Constable et al., 2017) y ocurre principalmente en latitudes  $>31^\circ$  y con una angulación solar  $<35^\circ$ , donde no hay una suficiente penetración de luz ultravioleta en la piel (Dittmer & Thompson, 2011). El Dr. Rubino ya en 1928 se preguntaba acerca del efecto de esta vitamina en los brotes de osteomalacia en Uruguay. En bovinos, para que la deficiencia de vitamina D ocurra, adicionalmente a las condiciones antes mencionadas, es necesario que los animales no ingieran otras fuentes naturales (forraje) o sintéticas (sales minerales) de Vitamina de D (Craig et al., 2016; Constable et al., 2017). En Uruguay un trabajo realizado en humanos, en Montevideo, reveló que solamente el 10,9% de 175 uruguayos, de todas las edades, tenía niveles suficientes de esta vitamina durante el invierno (Bagattini et al., 2017). En el brote 1 descrito en el Capítulo II, las sales inyectables y los bloques minerales contenían vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, sin embargo, los aportes diarios de ambas sales no cubrían los requerimientos diarios de 30 UI Vit D<sub>3</sub>/kg p.v. para vacas en lactación (NRC, 2016) sin tener en cuenta el aporte de vitamina D por parte del forraje. La mayor parte del territorio uruguayo está ubicado en una latitud Sur  $>31^\circ$ , sin embargo, todos los brotes descritos ocurrieron en vacas que pastoreaban campos naturales durante fin de la primavera y verano donde la angulación solar en la región es de  $> 55^\circ$ , lo que es adecuado para la síntesis de vitamina D

(Dittmer & Thompson, 2011). Estudios que permitan poner a punto las técnicas para determinar los metabolitos de la vitamina D tanto en animales como en plantas son necesarios para mejorar los diagnósticos y comprender mejor el rol fisiológico de la vitamina D como fue detallado en el Capítulo I.

En el Capítulo III, a pesar de las diferencias observadas en el tratamiento de vacas con osteomalacia, cabe remarcar que las necesidades de P se cubrieron en ambos grupos experimentales, lo que sugiere que ambas formas (mezclas mineral sueltas y/o mezclas minerales comprimidas en bloques) de suplementación mineral podrían usarse para prevenir la deficiencia de P en bovinos sin severa osteomalacia. Así, la elección de uno de ellos, como manejo preventivo en condiciones extensivas, dependerá de la relación costo-beneficio de cada establecimiento debido a las ventajas y desventajas que tiene cada una de estas formulaciones (ej., las mezclas sueltas necesitan más inversión, tiene menor costo por kg P, y necesitan más mano de obra; mientras que las mezclas comprimidas en bloques son resistentes a la intemperie, tienen mayor costo por kg P, la distribución es más fácil y requieren menos mano de obra) (Jackson et al., 2012).

Las predicciones de las concentraciones de P en suelo y forraje planteadas en el Capítulo IV actualmente tienen limitaciones ya que la relación del semivariograma en la validación cruzada no fue muy alta ( $r^2 < 0,80$ ) entre los valores observados y los valores estimados. Esta relación se puede mejorar incrementando el número de predios evaluados o agregando covariables predictoras como la capa vectorial del tipo de suelo uruguayo. Estas áreas de mejoras en el análisis de los resultados se están discutiendo con investigadores de INIA GRAS.

## 11. CONCLUSIONES GENERALES

- I. La deficiencia de fósforo (P) es una de las principales carencias de los sistemas de cría en campos naturales del norte de Uruguay.
- II. En Uruguay la lesión de osteomalacia es la principal consecuencia de la deficiencia crónica de P, afectado principalmente a vacas de primera cría en lactación y en verano asociada a las bajas contracciones de P en los suelos y en los forrajes de los campos naturales.
- III. A pesar de haber sido descripta hace más de 101 años en Uruguay la enfermedad sigue ocurriendo debido a la falta o incorrecto uso de las sales minerales.
- IV. La observación de signos clínicos, incluyendo la osteofagia, la determinación de la osteopenia por la prueba de la aguja y la concentración de fósforo inorgánico en sangre, en conjunto, son excelentes indicadores para el diagnóstico de rutina de la enfermedad.
- V. Las vacas con osteomalacia que consumen forrajes deficientes en P pueden tratarse de manera efectiva mediante la provisión *ad libitum* vía oral de sales minerales con 100 g P/kg durante 3 meses.
- VI. El P administrado en mezclas minerales sueltas es más afectivo, en el tratamiento de las deficiencias severas de P, que el P administrado en mezclas comprimidas en bloques.
- VII. Las bajas concentraciones de P en forraje son una de las principales limitantes productivas de la cría vacuna durante la primavera y verano por lo que preventivamente o para tener mayor retorno económico es en primavera donde debe realizarse la suplementación mineral con P. Adicionalmente en establecimientos con severa deficiencia de P en el forraje y con antecedentes de osteomalacia en los animales la suplementación mineral con P de forma preventiva debe deber extenderse hasta fines del verano inicio de otoño.
- VIII. En regiones con forrajes con severa deficiencia de P deben usarse sales minerales comerciales que contengan altas concentraciones de P (ej., 80-100 g P/kg), mientras que en regiones con forrajes con carencia marginal de P deben usarse sales minerales comerciales con moderadas concentración de P (ej., 60-80 g P/kg).

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson S.T., Kidd L.J., Benvenuti M.A., Fletcher M.T., Dixon R.M. (2017). New candidate markers of phosphorus status in beef breeder cows. *Anim Prod Sci* 57: 2291-2303.
2. Arroyo G., Mauer E. (1982). Efecto de la suplementación mineral sobre el comportamiento reproductivo y evolución del peso en vacas de cría Hereford y su relación con la concentración mineral en el suero y tejidos de reserva y estudio del aporte de mineral por las praderas naturales del noreste Uruguay (Tesis). Facultad de Agronomía, Udelar, Montevideo.
3. Bagattini J.C., Barrios E., Barañano R., Moratorio G., Montes J.M., Laporte S.G., Ordoqui R., Cavalleri F.L., Ortega C., Forster T. (2017). Estado de la vitamina D en adultos uruguayos aparentemente saludables, en invierno y en Montevideo. *Rev Méd Urug* 33 (2): 126-137.
4. Barbosa F.P.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Rocha B.P., Soares P.C., Silva Filho G.B., Chavez H.A., Mendonça F.S. (2018). Deficiência de fósforo em caprinos no semiárido de Pernambuco. *Pesq Vet Bras* 38 (6): 1117-1124.
5. Barrios J., Bertolotti C., Polio J. (1984). Influencia de la suplementación mineral sobre el comportamiento reproductivo de vacas de cría Hereford (Tesis). Facultad de Agronomía, Udelar, Montevideo.
6. Benvenuti M., Dixon R., Goodwin K., Kidd L., Mayer B., Fletcher M., Anderson S. (2015). Responses of *Bos indicus* cows in early lactation to dietary phosphorus deficiency. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia Conference. School of Environmental and Rural Science, University of New England, School of Environmental and Rural Science*, pp: 47-48.
7. Bhan A., Rao A.D., Rao D.S. (2010). Osteomalacia as a result of vitamin D deficiency. *Endocrinol Metab. Clin N Am* 39: 321-331.
8. Beilharz R.G., Zeeb K. (1982). Social dominance in dairy cattle. *Appl Anim Ethol (Appl Anim Behav Sci)* 8: 79-97.
9. Black W.T., Tash L.H., Jones J.M., Kleberg Jr. R.J. (1943). Effects of phosphorus supplements on cattle grazing on range deficient in this mineral. *USDA Technical Bulletin n° 856*.
10. Bomjardim H.A., Olivera C.M.C, Silvera J.A.S., Silva N.S., Duarte M.D., Faial K.C.F., Brito M.F., Barbosa J.D. (2015). Deficiência mineral em lactação da vaca leiteira do município de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq Vet Bras* 35 (5): 409-416.
11. Bowman J.G.P., Sowell B.F. (1997). Delivery method and supplement consumption by grazing ruminants: a review. *J Anim Sci*, 75: 543-550.
12. Burtis C.A., Brunz D.E. (2015). *Tietz fundamental of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Ed. Elsevier Saunders, 7<sup>th</sup> ed., St Louis Missouri, USA, pp:741-768.
13. Cabrera C.M., Pittaluga A., Del Puerto M., Asuaga A., Astigarraga L. (2019). *Uso Sostenible de Campo Natural*. Ed INIA Montevideo, Uruguay, pp: 169.
14. Call J.W., Butcher J.E., Shupe J.L., Blake J.T., Olson A.E. (1986). Dietary phosphorus for beef cows. *Am J Vet Res*, 47 (2): 475-485.
15. Call J.W., Butcher J.E., Shupe J.L., Lamb R.C., Boman R.L., Olson A.E. (1987). Clinical effects of low dietary phosphorus concentrations in feed given to lactating dairy cows. *Am J Vet Res*, 48 (1): 133-136.
16. Campos M., Sanguinetti C. (2021). Factores preanalíticos que afectan la concentración de fósforo inorgánico en suero sanguíneo en bovinos de carne en Uruguay (Tesis). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.
17. Cantón G., Campero C., Odriozola E. (2008). Inusual cuadro de deficiencia mineral en vacas lecheras de alta producción. VI Reunión Argentina de Patología Veterinaria y II Seminario de la subdivisión Argentina de la Fundación Charles Louis Davis. Corrientes, Argentina, Julio.
18. Carriquiry R., Frade S. (2017). Estudio de la nutrición mineral de bovinos sobre pasturas naturales del Uruguay. *Plan Agropecuario*, 164: 32-34.

19. Cortelezzi A., Mondelli M. (2014). Censo General Agropecuario 2011: Interpretación de los principales resultados y cambios observados. Ed Anuario OPYPA, Montevideo, Uruguay, pp: 471–490.
20. Centro de Investigaciones Alberto Boerger (CIAAB). (1971). Fertilización de pasturas. Boletín de divulgación, (5), 12-13. Disponible de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5895/1/CIAAB-BD-5-1971.pdf>.
21. Coates D.B. (1994). The effect of phosphorus as fertilizer or supplement on pasture and cattle productivity in the semi-arid tropics of north Queensland. *Trop Grassl*, 28: 90-108.
22. Coates D.B., Dixon R.M., Murray R.M., Mayer R.J., Miller C.P. (2016). Bone mineral density in the tail-bones of cattle: effect of dietary phosphorus status, liveweight, age and physiological status. *Anim Prod Sci*, 58 (5): 801-810.
23. Coates D.B., Dixon R.M., Mayer R.J. (2019). Between-year variation in the effects of phosphorus deficiency in breeder cows grazing tropical pastures in northern Australia. *Tropical Grasslands* 7: 223–233.
24. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H., Grünberg W. (2017). *Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Ed. Elsevier, 11<sup>th</sup> ed., St. Louis Missouri, USA, pp 1482 – 1497.
25. Craig L.E., Dittmer K.E., Thompson K.G. (2016). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Ed by Maxie G.M. Ed. Elsevier Saunders, 6<sup>a</sup> ed., St. Louis Missouri, USA, vol. 1, pp: 68-74.
26. Cseh S., Odeón A., Gamieta I. Mugarza S. (2008). Deformaciones articulares en terneros causadas por deficiencia de fósforo. *Rev argent prod animal*, Supl 28 (1): 31-37.
27. CSIRO. (2007). *Nutrient requirement of domestic ruminants*. Ed. CSIRO Publishing, 7<sup>th</sup> ed., Melbourne, Australia, pp. 118-128.
28. Cuadro R. (2019). Profundidad de muestreo y método de determinación de P extractable en suelo para el diagnóstico de la fertilidad en pasturas (Tesis de Maestría). Facultad de Agronomía, Udelar, Montevideo.
29. Cuenca L., Fernandez A., Alonso T., Decía C. (1981). Niveles de minerales en pasturas y tejidos de bovinos de carne en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 77: 103-109.
30. Cunha W.R.X., Silva Fiho G.B., Bom H.A.S.C., Fonseca S.M.C. Wicpolt N.S., Pontes R.M. Olivera Filho E.F. Soares P.C., Almeida V.M., Mendonça F.S. (2022). Hyponatremia in sheep in Northeastern Brazil. *Pesq Vet Bras* 42:e07023.
31. Da Trindade J.K., Pinto C.E., Neves F.P., Mezzalira J.C., Bremm C., Genro T.C., Tischler M.R., Nabinger C., Gonda H.L., Carvalho P.C. (2012). Forage allowance as a target of grazing management: implications on grazing time and forage searching. *Rangel Ecol Manag* 65: 382-393.
32. De León Lora L.A. (1963). Efecto de suplementación de fósforo sobre la eficiencia reproductiva de Hereford en pasturas naturales de Uruguay (Tesis de Maestría). Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA). Centro de Enseñanza e Investigación, Turrialba. Disponible de <http://hdl.handle.net/11554/1402>
33. De Nava G., Arrospide A., Delgado E., Cavestany D. (2008). Efecto de la administración parenteral de vitaminas y minerales sobre la fertilidad de las vaquillonas de carne inseminadas artificialmente. *Veterinaria (Montevideo)*, 43 (169): 7-12.
34. De Vries M.F. (1995). Estimating Forage Intake and Quality in Grazing Cattle: A Reconsideration of the Hand-Plucking Method. *J Range Manag (Rangel Ecol Manag)*, 48 (4): 370-375.
35. Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). (2020). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Ed. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay, pp: 270.
36. Dittmer K.E., Thompson K.G. (2011). Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: a review. *Vet Pathol* 48 (2): 389-407.
37. Dixon R.M., White A., Fry P., Petherick J.C. (2003). Effects of supplement type and previous experience on variability in intake of supplements by heifers. *Aust J Agric Res* 54: 529-540.

38. Dixon R., Coates D., Holmes B., English B., Rolfe J. (2011). Phosphorus nutrition and management – overcoming constraints to wider adoption. Northern Beef Research Update Conference. Darwin, North Australia Beef Research Council 3 & 4 of August, pp. 102-109.
39. Dixon R.M., Kidd L.J., Coates D.B., Anderson S.T., Benvenuti M.A., Fletcher M.T., McNeill D.M. (2017). Utilising mobilisation of body reserves to improve the management of phosphorus nutrition of breeder cows. *Anim Prod Sci*, 57 (11): 2280-2290.
40. Dixon R.M., Fletcher M.T., Goodwin K.L., Reid D.J., McNeill D.M., Yong K.W.L., Petherick J.C. (2019a). Learned behaviours lead to bone ingestion by phosphorus-deficient cattle. *Anim Prod Sci*, 59 (5): 921-932.
41. Dixon R.M., Coates D.B., Mayer R.J., Miller C.P. (2019b). Alternative rib bone biopsy measurements to estimate changes in skeletal mineral reserves in cattle. *Animal* 13, 119–126.
42. Dixon R.M., Anderson S.T., Kidd L.J., Fletcher M.T. (2020a). Management of phosphorus nutrition of beef cattle grazing seasonally dry rangelands: a review. *Anim Prod Sci*, 60 (7): 863–879.
43. Dixon R.M., Fletcher M., Anderson S., Kidd L., Benvenuti M., Mayer B., McNeill D., Goodwin K. (2020b). Improved management of cattle phosphorus status through applied physiology. Final report project B.NBP.0689. Meat and Livestock Australia, pp. 46-51.
44. Doncel B., Capelesso A., Giannitti F., Cajarville C., Macías-Rioseco M., Silveira C., Riet-Correa F. (2019). Hypomagnesemia in dairy cattle in Uruguay. *Pesq Vet Bras*, 39 (8): 564-572.
45. Doncel B., Puentes J.D., Caffarena R.D., Riet-Correa F., Costa R.A., Giannitti, F. (2021). Hipomagnesemia em bovinos de corte. *Pesq Vet Bras*, 41, e06826.
46. Dutra F. (2009a). Osteomalacia. *Archivo Veterinario del Este*, 1 (1): 5.
47. Dutra F. (2009b). Osteomalacia. *Archivo Veterinario del Este*, 1 (2): 5.
48. Dutra F. (2011a). Osteomalacia. *Archivo Veterinario del Este*, 3 (2): 4.
49. Dutra F. (2011b). Osteomalacia. *Archivo Veterinario del Este*, 3 (3): 4-5.
50. Dutra F. (2016). Enfermedad del músculo blanco en novillitos. *Archivo Veterinario del Este*, (19): 8-9.
51. Espasandín A.C., Gutiérrez V., Casal A., Cáseres O., Cal V., Carriquiry M. (2013). Producción de leche de vacas puras y cruza pastoreando alta y baja oferta de forraje del campo nativo. FPTA-262. Ed. INIA Montevideo, Uruguay.
52. Fernandez Liñares J., Lussich D., Marizcurrena P. (1985). Influencia de la suplementación mineral sobre el comportamiento reproductivo y evolución del peso en vacas de cría Hereford (Tesis). Facultad de Agronomía, Udelar, Montevideo.
53. Fletcher M., Goodwin K., Benvenuti M., Reid D., Anderson S., Kidd L., Dixon R. (2016). Blood sampling for P screen – tail versus jugular., *Proceeding Northern Beef Research Update Conference*. North Australia Beef Research Council, Gympie: NABRC, pp: 191.
54. Francis R.M., Selby P.L. (1997). Osteomalacia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 11 (1): 145-163.
55. Giraldo R.H. (2002). Introducción a la geostadística: teoría y aplicación. Ed. Universidad Nacional de Colombia, pp: 32-52.
56. Gómez Haedo A., Amorín J. (1982). Suplementación mineral y proteica de novillos en crecimiento (Tesis). Facultad de Agronomía, Udelar, Montevideo.
57. Gonçalves E.N., Carvalho P.C.F., Silva C.E.G., Santos D.T., Díaz J.A.Q., Baggio C., Nabinger C. (2009). Relações planta-animal em ambiente pastoril heterogêneo: padrões de desfolhação e seleção de dietas. *R Bras Zootec* 38 (4): 611-617.
58. Goff JP. (2015). Large animal internal medicine. Ed by Smith BP. Elsevier Mosby, 5<sup>th</sup> ed., St Louis, Misuouri, USA, pp: 1265 – 1266.
59. Greco D., Stabenfeldt G.H. (2004). Fisiología veterinaria Ed. Elsevier Saunders., 3<sup>a</sup> ed., Madrid España, pp: 366-371.
60. Grünberg W. (2014). Treatment of phosphorus balance disorders. *Vet Clin Food Anim*, 30:383-408.

61. Guerrero J., Colucci P.E. (1987). Situación actual y perspectivas de la investigación sobre nutrición mineral de bovinos en el Uruguay. Dialogo XXX Suplementación Mineral: Reunión sobre determinación de carencias y suplementación mineral de bovinos. Campo Grande, Brasil, 8-12 Junio.
62. Haydock K.P., Shaw N.H. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. Aust J Exp Agric Anim Husb. 15: 663-670.
63. Hernandez J. (1884). Instrucción del Estanciero Tratado Completo para la Plantaecación y Manejo de un Establecimiento de Campo destinado a la Cría de Hacienda Vacuna, Lanar y Caballar. Ed. Imprenta y Librería de Mayo, 3ª ed., Buenos Aires Argentina. pp: 207-216.
64. Holmes W.E. (1990). Phosphorus and beef production in northern Australia. 11. A case study approach to the economic assessment of phosphorus supplementation. Trop grassl 24: 250-255.
65. Unidad Agro-clima y Sistema de información (GRAS) del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). (2022). Banco de datos agroclimático, precipitaciones. Disponible en: <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>.
66. Jackson M.L. (1964). Análisis químico de suelos. Ed. Omega, Barcelona España, pp: 662.
67. Jackson D., Rolfe J., English B., Holmes B., Matthews R., Dixon R., McDonald N. (2012). Phosphorus management of beef cattle in Northern Australia. Final report project B.NBP.0540. Ed. Meat and Livestock Australia Limited, Sidney Australia, pp: 58.
68. Jubb T.F., Crough K.F. (1988). Phosphorus supplementation of cattle. Aust Vet J, 65 (9): 264-267.
69. Judkins M.B., Wallace J.D., Parker E.E., Wright J.D. (1985). Performance and phosphorus status of range cows with and without phosphorus supplementation. J Range Manag (Rangel Ecol Manag), 38 (2): 139-143.
70. Karn J.F. (2001). Phosphorus nutrition of grazing cattle: a review. Anim Feed Sci Technol 89: 133-153.
71. Kerridge P.C., Gilbert M.A., Coates D.B. (1990). Phosphorus and beef production in northern Australia. 8. The status and management of soil phosphorous in relation to beef production. Trop Grassl, 24: 221-230.
72. Krsmanovic M., Djokovic R., Giadinis N., Panousis N., Bajkovski D., Savié-Stevanovic V., Bojkovski, J. (2015). Determination of macroelement parameters in different productive stages of simmental cows. Israel J Vet Med,70 (1): 12-15.
73. Lisbôa A.N., Kuchembuck M.R.G., Kohayagawa A., Bomfim S.R.M., Santiago A.M.H., Dutra I.S. (1996). Resultados de patologia clínica e dosagens de elementos minerais em bovinos acometidos pelo botulismo epizoótico no Estado de São Paulo. Pesq Vet Bras 16 (4): 91-97.
74. Little D.A., Robinson P.J., Playne M.J., Haydock K.P. (1971). Factor affecting blood inorganic phosphorus determination in cattle. Aust Vet J, 47: 153-156.
75. Little D.A. (1972). Bone biopsy in cattle and sheep for studies of phosphorus status. Aust Vet J 48: 668-670.
76. Little D.A., Shaw N.H. (1979). Superphosphate and stoking rate effects on native pasture oversown with *Stylosanthes humilis* in central coastal Queensland. 5. Bone phosphorus levels in grazing cattle. Aust Exp Agric Anim Husb, 19:645-651.
77. Malafaia P., Peixoto P.V., Soares Gonçalves J.C., Lopes Moreira A., Pereira Borges da Costa D., Soares Correa W. (2004). Ganho de peso e custos em bovinos de corte submetidos a dois tipos de suplementos minerais. Pesq Vet Bras, 24 (3), 160-160.
78. Malafaia P., Salcedo Y.T.G., Uscategui R.A.R., Souza V.C., Costa D.F.A., Berchielli T.T. (2017). A simple and fast sampling method for chemical analyses and densitometry of bones through rib biopsies in cattle. Pesq Vet Bras, 37 (1) :31-35.
79. Malafaia P., Garcia F.Z., Lopes S.P., Souza V.C., Canella Filho C.F.C., Costa D.F.A., Veiga C.C.P. (2018). Evaluation of an inexpensive needle test for the diagnosis of phosphorus

- deficiency and management of phosphorus supplementation for cattle: a multiple case study. *An Acad Bras Cienc*, 90 (4): 3337-3352.
80. Mattioli G. (2013). *Nutrición mineral y vitamínica de bovinos*. Ed. CCB Academic, 1<sup>a</sup> ed., Buenos Aires, Argentina, pp: 41-60.
  81. McDowell L.R. (2003). *Minerals in animal and human nutrition*. Ed. Elsevier Academic, 2<sup>nd</sup> ed., New York, USA, pp: 33-100.
  82. McGrath J.J., Savage D.B., Godwin I.R. (2013). The potential for pharmacological supply of 25-hydroxyvitamin D to increase phosphorus utilization in cattle. *Anim Prod Sci*, 53:1238-1245.
  83. McFarlane D., Fleming S.A. (2016). *Large Animal Internal Medicine*. Ed. Elsevier, 5<sup>a</sup> ed., St. Louis Missouri, USA, pp: 1223-1275.
  84. McKean S.J. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal*. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT., Cali, Colombia, pp: 35-42.
  85. Miller M.A. (2017). *Pathology basis of veterinary disease*. Ed by Zachary J.F. Ed. Elsevier, 6<sup>th</sup> ed., St Louis Missouri USA, pp: 687.
  86. Miller C.P., Winter W.H., Coates D.B., Kerridge P.C. (1990). Phosphorus and beef production in northern Australia. 10. Strategies for phosphorous use. *Trop Grassl*, 24: 239-249.
  87. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). (2003). *La ganadería en Uruguay Contribución a su conocimiento*. Ed. MGAP, Montevideo, Uruguay, pp:87.
  88. Montedónico L.A., Fynn C.A, Vadani F.O. (1939). Resultados de los ensayos de suministro de fosfosal en campos afectados por osteomalacia. *Rev Fac Agron Montevideo*, 18: 115 - 141.
  89. Montiel L., Tremblay A., Girard V., Chorfi Y. (2007). Preanalytical factor affecting blood inorganic phosphate concentration in dairy cows. *Vet Clin Pathol*, 36 (3): 278-280.
  90. Mufarrege D.M. (1999). Los minerales en la alimentación de vacunos para carne en la Argentina. Disponible en [https://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion\\_mineral/60-minerales\\_en\\_la\\_alimentacion\\_vacunos.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion_mineral/60-minerales_en_la_alimentacion_vacunos.pdf).
  91. Mufarrege D.M. (2004). El fósforo en los pastizales de la región de NEA. Noticias y comentarios n° 388. EEA INTA Mercedes, Corrientes, Argentina. Disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion\\_mineral/52-fosforo\\_en\\_pastizales\\_corrientes.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion_mineral/52-fosforo_en_pastizales_corrientes.pdf).
  92. National Research Council (NRC) of National Academies of Sciences (2016). *Nutrient requirements of beef cattle*. Ed. The National Academies, 8<sup>a</sup> ed., Washington, USA, pp: 112-114.
  93. Nakamichi Y., Udagawa N., Suda T., Takahashi N. (2018). Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 177: 70-76.
  94. Nores J.G., Santoro R. (1940). La composición bromatológica y calcicofosfatada de diversos forrajes ensilados. *Rev Fac Agron Montevideo*, 26: 27-40.
  95. Nores J.G. (1944). Contenido de algunos elementos trazas en praderas naturales de Uruguay. *Rev Fac Agron Montevideo*, 35: 23-35.
  96. Odriozola E., Achilles E., Nuñez M., Riccio B., Cseh S., Cantón G., Drake M., Yarrar M. (2008). Desbalance mineral en bovinos de engorde a corral. XVII Reunión Científica y Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Santa Fe Argentina, Octubre.
  97. Olson E.J., Carlson C.S. (2017). *Pathology basis of veterinary disease*. Ed by Zachary J.F. Ed. Elsevier, 6<sup>th</sup> ed., St Louis Missouri USA, pp: 982.
  98. Peixoto P.V., Malafaia P., Barbosa J.D., Tokarnia C.H. (2005). Principles of mineral supplementation in ruminants. *Pesq Vet Bras*, 25 (3): 195-200.
  99. Perna R. (2009). *Manejo Clínico del Síndrome Vaca Caída*. Ed. Intermédica, 2<sup>a</sup> ed., Buenos Aires Argentina, pp: 30-36.
  100. Pittaluga O. (1980). Experimentos de suplementación realizados en Basalto. Primera Jornada ganadera de Basalto. Molles del Queguay: CIAAB- Estación Experimental Agropecuaria del Norte, Junio, pp: 50-55.

101. Pittaluga O. (2007). Efecto de la suplementación con fósforo sobre el comportamiento productivo y reproductivo de vacas Hereford y Braford, en Basalto y Areniscas. Día de Campo "Cría vacuna en suelos arenosos, Unidad Experimental La Magnolia INIA Tacuarembó, pp:17-20.
102. Pittaluga O. (2009). Rol de los minerales en la producción de bovinos para carne en Uruguay. Boletín de Divulgación 96. Ed. INIA Montevideo, Uruguay, pp: 1-25.
103. Pittaluga O., Allegri M., Corbo M., Riet F. (1980). Relevamiento de minerales en las pasturas y en sangre de vacas de cría y su relación con reproducción y cambios de peso en suelos arenosos, bajo distintos esquemas de suplementación. Investigaciones Agrómicas, 1 (1): 42-45.
104. Podesta M., Colucci P., Armentano J., Da Fonseca D., Ohanian C. (1976). Distrofia Muscular Nutricional (DMN): Primera comprobación en bovinos del Uruguay. Veterinaria (Montevideo), 63: 19-35.
105. Quigley S., Poppi D. (2013). Re-alimentation of phosphorus deficient cattle. Final report project B.NBP.0565. Ed. Meat and Livestock Australia Limited, Sidney Australia, pp: 8-18.
106. Quigley S., Poppi D., Schats T. (2015). Validation and demonstration of a diagnostic tool for phosphorus status of beef cattle. Final Report Project B.NBP.0537. Ed. Meat & Livestock Australia Limited, Sydney Australia, pp: 18-44.
107. Quintans G., Barreto S., Jimenez de Aréchaga, C. (2005). Suministro de sales minerales durante el postparto en vacas multíparas. Jornada Anual de Producción Animal. Estudio Preliminar, Unidad Experimental Palo de Pique, INIA, Treinta y Tres, pp: 8-14.
108. Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. (2011). Veterinary medicine a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs, and horses. Ed. Saunder Elsevier, 10<sup>th</sup> ed., St Louis Missouri, USA, pp: 1691-1701.
109. Rae D.O., Kunkle W.E., Chenoweth P.J., Sand R.S., Tran T. (1993). Relationship of parity and body condition score to pregnancy rates in Florida beef cattle. Theriogenology 39: 1143-1153.
110. Razaque M.S. (2009). The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. Nat Rev Endocrinol, 5: 611-619.
111. Read M.V.P., Engels E.A.N., Smith W.A. (1986a). Phosphorus and the grazing ruminant. 2. The effects of supplementary P on cattle at Glen and Armoedsvlakte. S Afr J Anim Sci 16 (1): 7-12.
112. Read M.V.P., Engels E.A.N., Smith W.A. (1986b). Phosphorus and the grazing ruminant. 3. Rib bone sample as an indicator of the P status in cattle. S Afr J Anim Sci 16 (1): 14-17.
113. Read M.V.P., Engels E.A.N., Smith W.A. (1986a). Phosphorus and the grazing ruminant. 4. Blood and faecal grab samples as indicators of the P status of cattle. S Afr J Anim Sci 16 (1): 18-22.
114. Riet-Correa F. (2004). Suplementação mineral em pequenos ruminantes no semi-arido. Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife, 7 (2/3): 112-130.
115. Riet-Correa F. (2007). Doenças de ruminantes e equinos. Ed. Livraria São Pablo, 3<sup>a</sup> ed., São Pablo Brasil, pp: 224-280.
116. Riet-Correa F., Gevehr Fernandez C. (2002). Botulismo em bovinos de Río Grande del Sur y Uruguay. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Junio, pp: 7-9.
117. Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Tokarnia C.H., Carvalho C.J.S., Franklin F.L.A.A., Dias A.C.S., Ferreira R.M.M., Silva S.M.M.S. (2012). Botulism by *Clostridium botulinum* type C in goats associated with osteophagia. Small Rumin Res, 106: 201-205.
118. Riet-Correa F., Oliveira J.A., Méndez M.C., Schild A.L. (1983). Poluição industrial como causa de intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. Pesq Vet Bras 3 (4): 107-114.
119. Rodriguez A.M., Schild C.O., Cantón G.J., Riet-Correa F., Armendano J.I., Caffarena R.D., Giannitti, F. (2018). White muscle disease in three selenium deficient beef and dairy calves in Argentina and Uruguay. Ciencia Rural, 48 (5): 1-6.

120. Rodríguez Vieytes M. (1995). Fisiología Veterinaria. Ed by Garcia Sacristan A., Castejón Montijano F., De la Cruz Palomino L.F., Gonzáles Gallego J., Murillo López de Silanes M.D., Salido Ruiz G. Ed McGraw-Hill Interamericana, 1era ed., Madrid, España, pp: 719-738.
121. Rose A.L. (1927). Osteomalacia in cattle in N.S.W. Aust Vet J, 122-127.
122. Rose A.L. (1954). Osteomalacia in the northern territory. Aust Vet J, 172-177.
123. Rosol T.J., Gröne A. (2016). Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Ed by Maxie G.M. Ed. Elsevier Saunders, 6ª ed., St. Louis Missouri, USA, vol. 3, pp: 395.
124. Rubino M.C. (1928). Contribución al estudio de la osteomalacia en los bovinos. Revista de Medicina Veterinaria, 2 (31): 563-579.
125. Rubino M.C. (1934). Influencia de la composición del suelo y de los pastos sobre el desarrollo de la osteomalacia de los bovinos (hipofosforosis). Revista Argentina de Agronomía, 1 (4): 411-437.
126. Sacco S.R., Lopes R.S. (2011). Urolitíase: estudo comparativo em bovinos Guzerá oriundos de propriedades com e sem o problema. Pesq Vet Bras 31 (3): 206-212.
127. Sharifi K., Mohri M., Rakhshani A. (2007). The relationship between blood indicators of phosphorus status in cattle. Vet Clin Pathol, 36 (3): 354-357.
128. Schiersmann, G. (1965). Efecto de la suplementación con Fósforo sobre la eficiencia reproductiva y crecimiento de un hato de ganado Hereford en praderas naturales del Uruguay. (Tesis Magister). Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. Centro de Investigación y Enseñanza para la Zona Templada. La Estanzuela, Colonia.
129. Schild C.O., Boabaid F.M., Olivera L.G.S., Machado M., Vildoza A., Saravia A., Custodio A., Command C., Martinez A., Jaurena M., Dixon R., Riet-Correa, F. (2021a). Osteomalacia as a result of phosphorus deficiency in beef cattle grazing subtropical native pastures in Uruguay. J Vet Diagn Invest, 33 (5): 1018-1022.
130. Schild C.O., Boabaid F.M., Olivera L.G.S., Saravia A., Riet-Correa F. (2021b). Raquitismo debido a deficiencia crónica de fósforo: reporte de un brote en bovinos de carne criados en pasturas naturales. ALPA, 29 (1): 132-135.
131. Schild C.O., Boabaid F.M., Machado M., Saravia A., Olivera L.G.S., Díaz S., Vildoza A., Martinez A., Martinez R., Barros S.S., Riet-Correa F. (2021c). *Nierembergia rivularis* poisoning in cattle. Toxicon 204: 21-30.
132. Schild C.O., Boabaid F.M., Olivera L.G.S., Saravia A., Custodio A., Algorta J., Alvarez C., Jaurena M., Dixon R.M., Riet-Correa F. (2022). Response of cows with osteomalacia grazing sub-tropical native pastures to phosphorus supplementation with loose mineral mix or feed blocks. Accepted in The Veterinay Journal. Jun 2022.
133. Shupe J.L., Butcher J.E., Call J.W., Olson A.E., Blake J.T. (1988). Clinical signs and bone changes associated with phosphorus deficiency in beef cattle. Am J Vet Res, 49 (9): 1629-1636.
134. Soto C., Reinoso V. (2012). Suplementación con fósforo en ganado de carne a pastoreo. Rev Eléctron Vet 13 (7): 1-14 Recuperado de [https://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion\\_mineral/172-fosforo\\_suplementacion.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion_mineral/172-fosforo_suplementacion.pdf).
135. Spangenberg G.E., Nores J.G., Montedeónico L.A., Fynn C.A. (1941). La producción y calidad de las pasturas naturales en relación a las tierras y clima. Rev Fac Agron Montevideo, 25: 9-77.
136. Spangenberg G.E. (1944). Importancia de las deficiencias minerales en nuestras praderas naturales. Rev Fac Agron Montevideo, 36: 9-32.
137. Suttle N. F. (2010). Mineral Nutrition of Livestock. Ed. Cabi, 4ª ed., Cambridge, England, pp:122-165.
138. Stöber M. (2005). Medicina interna y cirugía del bovino. Ed by Dirksen G, Gründer H, Stöber M. Ed. Intermédica, 4ª ed., Buenos Aires, Argentina, vol 2, pp: 916-920.
139. Tafernaberry J., Udaiola L. (2021). Respuesta de terneras de cría suplementadas con sales minerales en ambientes (suelo y forraje) con carencia severa y marginal de fósforo (Tesis). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.

140. Theiler A. (1911). Stiff-sickness or Stifjziekte in cattle. Onderstepoort J Vet Res, 84-94. Disponible en <https://repository.up.ac.za/handle/2263/10512>.
141. Theiler A. (1912). Facts and theories about stijfziekte and lamziekte. Onderstepoort J Vet Res, 7-78. Disponible en <https://repository.up.ac.za/handle/2263/13245>.
142. Theiler A. (1931). The pathological aspect of phosphorus and calcium deficiency in cattle. Vet Rec, 46 (11):1143-1147.
143. Theiler A., Green H.H., Du Toit P.J. (1924). Phosphorus in the livestock industry. Journ Dep Agric Union of South Africa, 460-504.
144. Theiler A., Green H.H., Du Toit P.J. (1927). Minimum mineral requirements in cattle. Journ of Agrif Sci 17 (7): 291-314.
145. Ternouth J.H. (1990). Phosphorus and beef production in northern Australia. 3. Phosphorus in cattle – a review. Trop grassl, 24: 159-169.
146. Tokarnia C.H., Canella C.F.C., Guimarães J.A., Döbereiner J., Langenegger J. (1970a). Deficiência de fósforo em bovinos no Piauí. Pesq Agropec Bras 5: 483-494
147. Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H., Veras de Carvalho E. (1970b). Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq Agropec Bras 5: 465-472.
148. Tokarnia C.H., Döbereiner J., Peixoto P.V. (2000). Deficiência minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. Pesq Vet Bras, 20 (3): 127-138.
149. Tokarnia C.H. Peixoto P.V., Barbosa D.J., Farias Brito M., Döbereiner J. (2010). Deficiência minerais em animais de produção. Ed. Helianthus, Rio de Janeiro Brasil, pp: 1-78.
150. Tothill J.C., Hargreaves J.N.G., Jones R.M., McDonald C.K. (1992). BOTANAL – A comprehensive sampling and computing procedure for estimating pasture yield and composition. 1. Field Sampling. CSIRO Aust Div of Trop Crops & Past, Trop Agron Tech Mem No.78. <https://doi.org/10.4225/08/58712e506e989>
151. Tuff P. (1923). Osteomalacia and its occurrences in cattle in Norway. J Com Pathol Ther, 36 (3): 143-155.
152. Underwood E.J. (1983). Los minerales en la nutrición del Ganado. Ed. Acribia, 2ª ed., Zaragoza, España, pp 1-8.
153. Ungerfeld R. (1998). Factores que afectan el contenido de los minerales en pasturas naturales y el estado nutricional de vacunos y ovinos en Uruguay. Ed. INIA, Montevideo, Uruguay, pp: 48-77.
154. Uriarte G., Piaggio L., Podestá C., García P. (2000). Efectos de distintas formulaciones de suplementación mineral sobre ganado de cría en pasturas naturales de suelos cretácicos. Reporte final de proyecto. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Montevideo, pp: 1-35.
155. Van Soest P.J., Roberston J.B, Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 74 (5): 3583-3597.
156. Warrick A.W., Myers D.E., Nielsen D.E. (1986). Geoestatical methods applied to soil science (Agronomy Monograph). Soil Conservation Service. Agricultural and Forestry Experiment Station. West Virginia University (USA) 9: 53-81.
157. Winks L. (1990). Phosphorus and beef production in northern Australia. 2. Response to phosphorus by ruminants: a review. Trop grassl, 24: 140-158.

## 13. ANEXOS

### 13.1. PUBLICACIONES

- Schild, C.O., Allasia, M., Angeli, E., Jaurena, M., Dixon, R.M., Riet-Correa, F. (2022). Phosphorus deficiency in beef cattle: a review. El artículo será enviado a <http://www.pvb.com.br/>. Este artículo refleja el **Capítulo I**.
- Schild, C.O., Boabaid, F.M., Olivera, L.G.S., Machado, M., Vildoza, A., Saravia, A., Custodio, A., Command, C., Martinez, A., Jaurena, M., Dixon, R., Riet-Correa, F., (2021). Osteomalacia as a result of phosphorus deficiency in beef cattle grazing subtropical native pastures in Uruguay. The Veterinary Journal of Diagnostic Investigation. <https://doi.org/10.1177/10406387211025828> . Este artículo refleja en parte el **Capítulo II**.
- Schild, C.O., Boabaid, F.M., Olivera L.G.S., Saravia, A., Custodio, A., Algorta, J., Alvarez, C., Jaurena, M., Dixon, R.M., Riet-Correa, F., Response of cows with osteomalacia grazing sub-tropical native pastures to phosphorus supplementation with loose mineral mix or feed blocks. Accepted in The Veterinary Journal. May 2022. <https://www.sciencedirect.com/journal/the-veterinary-journal>. Este artículo refleja el **Capítulo III**.
- Schild, C.O., Saravia, A; Campos M., André S., Eastman S., Olivera L.G.S., Jaurena, M., Riet-Correa, F., 2022 Phosphorus deficiency in first calf cow grazing sub-tropical grasslands in 32 beef cattle ranches of Northern Uruguay. Este artículo será enviado a <https://www.sciencedirect.com/journal/livestock-science>. Este artículo refleja el **Capítulo IV**



*...“Renunciar ya lo pensé, pero nunca lo tuve en cuenta porque hay más camino en mis ojos que cansancio en mis piernas, más esperanza en mis pasos que tristeza en mis hombros, más voluntad en mi espíritu que obstáculos en mi frente y más fortaleza en mi corazón que miedos en mi mente”...*

Adaptado de Cora Coralina (1889-1985)