

## Lesões cutâneas em bovinos associadas ao consumo de ervilhaca (*Vicia villosa*)

### Lesions in the Skin of Cattle Associated to Hairy Vetch Consumption (*Vicia villosa*)

Amaro Francisco Viero Silveira<sup>1</sup>, Welden Panziera<sup>1</sup>, Susy Hermes de Sousa<sup>1</sup>, Bianca Santana Cecco<sup>1</sup>,  
Claiton Ismael Schwertz<sup>1</sup>, Aldo Gava<sup>2</sup>, David Driemeier<sup>1</sup> & Luciana Sonne<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

**Background:** Hairy vetch (*Vicia* spp.) is a high-protein source forage to cattle. The poisoning is clinically characterized by a systemic granulomatous disease, which causes dermatitis, diarrhea, decreased milk production and weight loss. The specie of hairy vetch related to systemic granulomatous disease in cattle is *Vicia villosa*. This work aims to describe the epidemiological, clinical, gross, microscopic and immunohistochemistry features of the skin lesions caused by the consumption of *V. villosa* in cattle affected by the systemic granulomatous disease.

**Materials, Methods & Results:** A retrospective study of necropsy and biopsy exams performed between the period of 2005-2016 aiming for cattle with systemic granulomatous disease after consumption of hairy vetch was carried out in the archives of the Setor de Patologia Veterinária from the UFRGS. Epidemiological data included the sex, age, and breed of the animals affected. Gross and microscopical lesions, in addition to the immunohistochemistry anti-T lymphocytes (CD3), anti-B lymphocytes (CD79a), and anti-macrophages (CD68) features, were evaluated. The histological lesions and immunohistochemistry staining were quantified in mild (+), moderate (++), and severe (+++). The diagnosis of systemic granulomatous disease with skin lesions after consumption of *Vicia villosa* was observed in eight cattle. All animals were females, with 5-8 year-old (average 6.6 years), Holstein Friesian cattle (7) and Jersey (1) breeds. These cattle had a clinical history of severe pruritus, anorexia, apathy, decreased milk production, weight loss, and hyperthermia. Grossly, lesions were characterized by alopecia (8/8), crusts (7/8), lichenification and seborrhea (2/8), and exudative lesions (2/8), and involved the head (7/8), limbs (5/8), neck (4/8), trunk (4/8), perineum area (3/8), udder (3/8), and tail (3/8). Histology revealed a mild to moderate inflammatory infiltrate (7/7), composed by lymphocytes (7/7), macrophages (7/7), occasional eosinophils, and rare multinucleated giant cells (1/7). It was also classified in mild to severe perivascular dermatitis (7/7), mild to moderate perifolliculitis (4/7), superficial dermatitis (3/7), moderate to severe mural folliculitis (2/7), and hidradenitis (1/7). Another findings were moderate apocrine sweat gland ectasia, mild to moderate orthokeratotic hyperkeratosis, mild to moderate spongiosis, mild to moderate acanthosis, mild to severe serocellular crusts, mild pigmentary incontinence, mild to severe Munro's microabscesses, mild to moderate hydropic degeneration, apoptosis, ulcers, mild to moderate superficial edema of the dermis, variable epitheliotropism and erosions. Immunohistochemistry of all skin sections had mild to severe staining for T cell (CD3), mild staining for macrophages (CD68), and immunostaining was rare (4/7) or absent (3/7) for B cells (CD79a).

**Discussion:** Cutaneous lesions observed in this study were similar to those previously described by other authors for this condition, and were characterized by focal to coalescent areas of alopecia, lichenification and seborrhea, associated clinically to a severe pruritus. Histologically, these consisted of perivascular dermatitis, and perifolliculitis with an inflammatory infiltrate composed predominantly by lymphocytes, macrophages, with occasional eosinophils and multinucleated giant cells. Immunohistochemistry demonstrates a marked immunostaining for T cells, while it was mild for macrophages, which reinforces the involvement of the delayed type hypersensitivity (type IV) reaction in the pathogenesis of the disease.

**Keywords:** bovine disease, skin lesions, *Vicia villosa*, histology, immunohistochemistry.

**Descritores:** doenças de bovinos, lesões cutâneas, *Vicia villosa*, histopatologia, imuno-histoquímica.

## INTRODUÇÃO

*Vicia* spp. são plantas leguminosas, anuais ou perenes, conhecidas popularmente no Brasil como ervilhacas ou vicas. A intoxicação acomete quase que exclusivamente bovinos e está associada, principalmente, com a ingestão da espécie *V. villosa* e menos comumente a espécie *V. sativa* [1,12]. Bovinos adultos (acima de três anos) e das raças Holandesa e Aberdeen Angus, apresentam maior predisposição para o desenvolvimento da doença [1].

A intoxicação tem sido associada a três manifestações clínicas. A primeira delas é relacionada ao consumo de sementes causando distúrbios nervosos agudos e a morte dos bovinos. Na outra forma, descrita apenas em uma oportunidade, os bovinos afetados demonstram sinais clínicos predominantemente cutâneos [3,7]. A terceira síndrome e a mais estudada, caracteriza-se por uma doença granulomatosa sistêmica, que se desenvolve em duas a seis semanas após a ingestão da planta. Clinicamente, é caracterizada por dermatite, prurido, febre, conjuntivite, queda da produção de leite e perda de peso [1,3,7,9].

Na literatura há poucos dados relacionados com a caracterização de lesões cutâneas provocadas pela intoxicação por ervilhaca e que apresente também um enfoque simultâneo na identificação imuno-histoquímica dessas lesões [10]. Com isso, o objetivo deste estudo foi descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos das lesões de pele em bovinos afetados pela forma granulomatosa da intoxicação por *V. villosa*, além de utilizar a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para auxiliar na caracterização morfológica das lesões.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Estudo retrospectivo*

Foi realizado um estudo retrospectivo dos arquivos de exames de necropsia e biópsia de bovinos do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no período de 2005-2016, com diagnóstico de doença granulomatosa sistêmica associada ao consumo de ervilhaca (*V. villosa*). Os aspectos epidemiológicos incluíam sexo, raça e idade. Laudos de necropsia e fotografias foram consultados para avaliação macroscópica a fim de localizá-las e quantificá-las.

### *Avaliação histológica*

Blocos de parafina com amostras de pele foram cortados e corados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica e as lesões foram quantificadas em leves, moderadas e acentuadas. As avaliações microscópicas foram realizadas em sete animais, pois em um não foi possível a realização de novos cortes para microscopia e imuno-histoquímica devido à escassez do material.

### *Teste imuno-histoquímico*

Realizou-se também testes imuno-histoquímicos (IHQ) em cortes histológicos de 3 µm obtidos a partir da pele dos bovinos confeccionados em lâminas positivas<sup>1</sup>. Para as técnicas de IHQ utilizaram-se anticorpos para imunomarcagem de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD79a) e macrófagos (CD68). Em cada técnica, foram utilizados controles positivos previamente testados. As seções de pele foram submetidas aos protocolos de IHQ descrito a seguir (Tabela 1). As lâminas foram posteriormente contracoradas com hematoxilina de Har-

**Tabela 1.** Protocolos imuno-histoquímicos utilizados em cortes de pele dos bovinos.

Anti-corpo	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Método de detecção	Cromógeno
CD3	Policlonal (Dako) <sup>3</sup>	Protease XIV (Sigma) <sup>4</sup> por 15 min	1:250	MACH 4-HRP, Biocare Medical <sup>5</sup>	AEC (Invitrogen) <sup>6</sup>
CD79a	HM57 (Dako) <sup>3</sup>	Tris-EDTA pH 9,0 - 96°C durante 20 min em pressão	1:50	MACH 4-HRP, Biocare Medical <sup>5</sup>	DAB (Dako) <sup>3</sup>
CD68	EBM11 (Dako) <sup>3</sup>	Protease XIV (Sigma) <sup>4</sup> por 15 min	1:100	MACH 4-HRP, Biocare Medical <sup>5</sup>	AEC (Invitrogen) <sup>6</sup>

ris por 20 s e montadas com Entellan<sup>2</sup>. A quantificação da imunomarcção foi baseada no método utilizado para as alterações observadas nas lâminas de HE.

## RESULTADOS

No período analisado observou-se oito casos da doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *V. villosa*. Os bovinos eram fêmeas, com idade que variou de 5 a 8 anos (média de 6,6 anos), sendo sete da raça Holandesa e um da raça Jersey. O tempo de evolução das lesões variou de 5 dias a 26 dias. Os casos ocorreram nas regiões noroeste (6/8) e nordeste do Rio Grande do Sul (1/8) e região serrana de Santa Catarina (1/8). Em 37,5% (3/8) foi relatado ou observado prurido, diminuição na produção de leite (7/8), perda de peso (6/8), anorexia (6/8) e hipertermia (2/8). Macroscopicamente, observou-se: alopecia (8/8), crostas (7/8), liquenificação e descamação (2/8) e exsudação (2/8). As lesões macroscópicas estavam assim distribuídas: cabeça (7/8), membros (5/8), pescoço (4/8), tronco (4/8), períneo (3/8), úbere (3/8) e cauda (3/8) [Figura 1A-1F]. Na microscopia o infiltrado inflamatório variou de leve a moderado (7/7) e era distribuído em: dermatite perivasculare leve a acentuada (7/7) [Figura 2A], perifoliculite leve a moderada (4/7) na dermatite superficial (3/7), foliculite mural moderada a acentuada (2/7) [Figura 2B] e hidradenite (1/7) [Figura 2C]. O infiltrado inflamatório é composto por linfócitos (7/7), macrófagos, epitelioides (7/7), ocasionais eosinófilos (4/7) e ainda raras células gigantes multinucleadas (1/7). Constatou-se também ectasia de glândulas sudoríparas moderada (7/7), hiperqueratose ortoqueratótica leve a moderada (6/7), espongiose leve a moderada (4/7) acantose leve a moderada (3/7) [Figura 2D], crostas serocelulares leves a acentuadas (3/7), incontinência pigmentar leve (3/7), microabscessos de Munro leves a acentuados (3/7), degeneração hidrópica leve a moderada (2/7), figuras apoptóticas (2/7), úlceras (2/7), edema superficial de derme que variou de leve a moderado (2/7), epiteliotropismo variável (1/7) e erosões (1/7). Em um dos casos não foram localizados os blocos de parafina com as amostras de pele não sendo possível avaliá-lo novamente na histologia.

Na imuno-histoquímica observou-se marcação para linfócitos T (CD3) nos sete casos analisados [Figura 2E], com imunomarcção acentuada em dois casos, moderada em quatro e discreta em um caso. Para macrófagos (CD68) visualizou-se marcação

discreta em todos os casos analisados (Figura 2F). Na marcação para linfócitos B (CD79) observou-se raras células positivas em quatro casos e nos demais não foram observadas imunomarcções.

## DISCUSSÃO

A associação dos aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos, constituem características importantes que auxiliam na suspeita e no diagnóstico definitivo da doença granulomatosa sistêmica associada à ingestão de *V. villosa* em bovinos [9].

O acometimento de bovinos adultos e de raças leiteiras provenientes das regiões noroeste e nordeste do Rio grande do Sul e serrana de Santa Catarina, constituíram aspectos epidemiológicos importantes da intoxicação por ervilhaca nesse estudo. No Sul do Brasil, devido ao alto valor nutritivo, pastagens de *Vicia* spp. são cultivadas quase que exclusivamente em regiões produtoras de leite e em propriedades com criações intensivas [1]. Embora bovinos adultos de raças de corte (principalmente Aberdeen Angus e Hereford), também sejam suscetíveis a intoxicação [5,6,9], casos da doença dificilmente são diagnosticados nessas raças, pois esses bovinos são criados extensivamente e raramente tem acesso a pastagens cultivadas de ervilhaca.

Lesões cutâneas representam características clinico-patológicas importantes da intoxicação por *Vicia* spp. em bovinos e estão associadas ao tempo de ingestão da planta, que geralmente é acima de duas semanas [1]. À semelhança do que é descrito na literatura [1,3,9,10], clinicamente os bovinos desse estudo apresentaram intenso prurido, que geralmente estava associado a anorexia, perda de peso, queda da produção de leite e febre. O tempo de evolução das lesões é variável [12] e no presente trabalho oscilou entre 5 a 26 dias. Macroscopicamente, as lesões cutâneas são caracterizadas por múltiplas áreas focais a coalescentes de alopecia, liquenificação e descamação, o que confere um aspecto enrugado à pele [1,3,9,10]. Essas características morfológicas cutâneas foram também observadas nos bovinos desse estudo e quando associadas aos dados clínicos e epidemiológicos já permitem um diagnóstico presuntivo de intoxicação por *Vicia* spp., que acaba sendo confirmatório através da lesão histológica de inflamação granulomatosa.

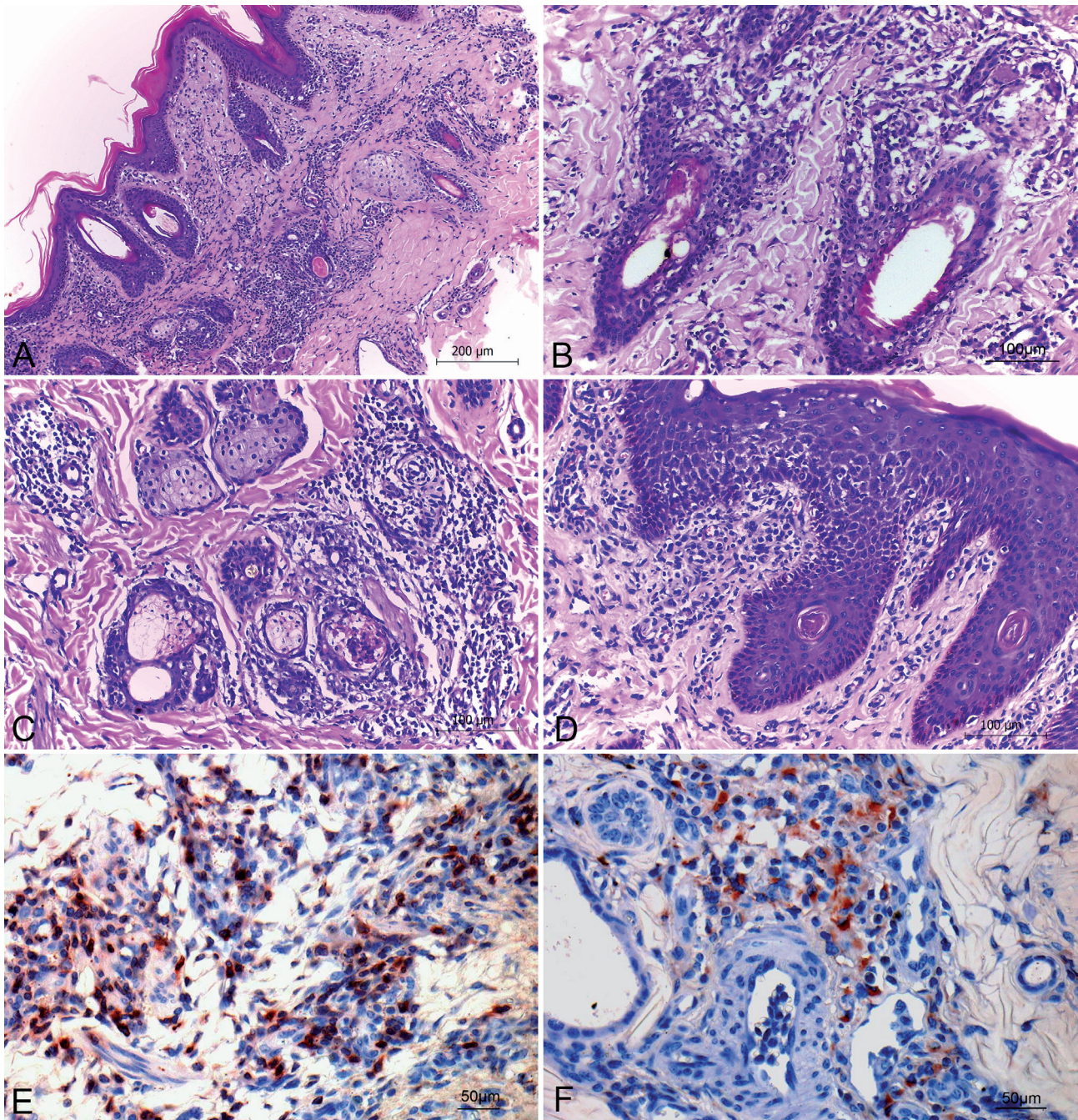
Existe uma disparidade na literatura quanto a distribuição das lesões cutâneas, porém a maioria das alterações são visualizadas, principalmente, na cabeça,



**Figura 1.** A- Bovino com sinal clínico de prurido. Na imagem é possível observar ainda áreas de alopecia na pele da face e pescoço. B- Bovino com acentuada lesão cutânea caracterizada por áreas extensas e coalescentes de marcada alopecia e liquenificação da pele da face, orelhas e pescoço. Observa-se também aspecto enrugado da pele. C- Focinho demonstrando áreas de alopecia com crostas. D- Lesão alopécica e crostosa na pele da glândula mamária e tetos. E- Áreas multifocais de alopecia e crostas visualizadas com maior detalhe na pelagem escura. F- Membro pélvico esquerdo. Observa-se material exsudativo amarelado aderido aos pelos, associado a áreas de escoriações cutânea. Clinicamente esse bovino apresentava intenso prurido.

pescoço, membros, tronco, períneo, úbere, mama e cauda [1,3,5,6,9,10], semelhantemente ao que também foi demonstrado em nosso estudo. Alguns autores afirmam que as lesões ocorrem principalmente no períneo, úbere, cauda e pescoço e que, após algum tempo,

surgem na cabeça, tronco e membros [9]. Em outros casos, apenas a pele da cabeça e do peito dos bovinos pode ser afetada [8]. Embora as lesões apresentem distribuição variável, sugere-se que a cabeça, pescoço e tronco sejam os principais sítios de envolvimento e



**Figura 2.** Pele de bovinos com doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia villosa*. A- Dermatite acentuada com predomínio perivascular (coloração de HE). B- Perifoliculite e foliculite mural com infiltrado de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raras células gigantes multinucleadas (coloração de HE). C- Dermatite perivascular e hidradenite com infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. D- Pele com acantose, espongiose e dermatite superficial (coloração de HE). E- Pele com imunomarcção positiva acentuada para linfócitos T (IHQ anti-CD3, método polímero, AEC). F- Teste imuno-histoquímico demonstrando marcação para macrófagos (IHQ anti-CD68, método polímero, AEC).

sempre deve haver suspeita da doença quando forem observadas áreas de alopecia, crostas, liquenificação e descamação cutânea, associadas a manifestação clínica de prurido.

De maneira geral, as lesões histológicas visualizadas na pele dos bovinos desse estudo foram semelhantes as descritas na literatura para intoxicação por ervilhaca [1,3,5,6,9,10]. Há um consenso de todos

os autores que as alterações dérmicas mais proeminentes incluem dermatite perivascular, alterações em estruturas anexas e edema, enquanto que os achados histológicos mais importantes observados na epiderme envolvem degeneração hidrópica, hiperqueratose, acantose, espongiose, erosão/ulceração focal com formação de crostas serocelulares e microabscessos [1,3,5,6,9,10]. Esses aspectos também foram consta-

tados no presente estudo e constituem as principais lesões histológicas dérmicas e epidérmicas observadas nos casos de intoxicação por ervilhaca. Lesões vasculares descritas por alguns autores e vistas sob a forma de espessamento e hialinização da parede de vasos ou até mesmo como vasculite [5,7,9], não foram constatadas, assim como também não foram observadas em outro estudo [3]. Com isso, sugere-se que essa não seja uma lesão constante nos casos da doença.

Em alguns casos, pode ser realizada uma correlação entre a característica da lesão microscópica com o tempo de evolução da doença. Para isso, torna-se importante a caracterização do infiltrado inflamatório (na histologia ou através da IHQ), aliado ao tipo de lesão histológica. Lesões mais iniciais demonstram, geralmente, infiltrado de neutrófilos e marcado edema dérmico e epidérmico, enquanto que lesões com tempo maior de evolução caracterizam-se por predomínio de células mononucleares e multinucleadas [9]. Nesse estudo, observou-se que as alterações cutâneas eram predominantemente crônicas e foram identificadas através do infiltrado preponderante de linfócitos e macrófagos em todos os casos, tanto na histologia, quanto na IHQ. Além disso, outras características que denotaram cronicidade, embora não visualizados em todos os bovinos, foram a presença de ocasionais células gigantes multinucleadas, lesões erosivas e ulcerativas na epiderme e um número ínfimo de casos com edema. Infiltrado de eosinófilos foi observado em quatro casos nesse estudo e constitui um achado histológico frequente nos casos da doença. Alguns autores associam sua presença a quadros mais iniciais da intoxicação [5,9].

Os testes imuno-histoquímicos dos bovinos estudados demonstraram que o infiltrado inflamatório era constituído principalmente por macrófagos e linfócitos. Em relação a imunofenotipagem linfocitária, observou-se predomínio de linfócitos T nas lesões (todos os casos), quando comparados aos linfócitos B (visualizados raramente em somente quatro casos). Esses achados reforçam o envolvimento da reação de hipersensibilidade tardia (ou tipo IV) na patogênese da doença. Sugere-se que constituintes da planta (alternativamente uma lectina de *V. villosa*) após serem absorvidos, reagem como antígenos ativando linfócitos Th1, que por sua vez irão secretar interleucinas (IL) e interferons (IFN). Essas proteínas,

atuam estimulando a resposta celular, principalmente, de macrófagos e linfócitos T citotóxicos específicos [1,9]. A presença de células gigantes multinucleadas observado nesse estudo, indica que um ou mais componentes do processo são substâncias persistentemente estranhas [9].

As lesões granulomatosas cutâneas, assim como em outros órgãos, constituem uma característica histológica distinta da intoxicação por *V. villosa* e quando associadas aos dados epidemiológicos permitem o diagnóstico da toxicose [9]. Entretanto, alguns diagnósticos diferenciais de intoxicação por ervilhaca devem ser destacados. Dentre eles, deve-se diferenciar as lesões cutâneas provocadas por intoxicação pela polpa cítrica [4,12], dermatofitose (principalmente por *Trichophyton verrucosum*), dermatofilose (*Dermatophilus congolensis*) [3], lesões cutâneas parasitárias como sarna sarcóptica (*Sarcoptes scabiei* var. *bovis*), sarna psoróptica (*Psoroptes ovis*), sarna corióptica (*Chorioptes bovis*) e sarna demodécica (*Demodex bovis*) [2], fotossensibilização [12] e deficiência de cobre [10]. Nesses casos, a diferenciação poderá ser feita principalmente pela epidemiologia, tipo de lesão cutânea, distribuição das lesões, presença ou ausência de outros sinais clínicos e histologia [3].

#### CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, bovinos, fêmeas, predominantemente na raça Holandesa, com média de 6,6 anos de idade, representam a categoria mais predisposta para o desenvolvimento de lesões granulomatosas sistêmicas associada ao consumo de ervilhaca. Clinicamente, a doença cutânea se manifestou por intenso prurido, anorexia, diminuição na produção de leite, perda de peso e hipertermia. As alterações macroscópicas apresentaram tempo de evolução de 5-26 dias e foram caracterizadas por alopecia, liquenificação, descamação e exsudação, sendo observadas com maior frequência na cabeça, pescoço, tronco e membros. As lesões histológicas predominantes incluíram dermatite perivascular e perifoliculite com infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, macrófagos, e ocasionalmente eosinófilos e células gigantes multinucleadas. Na técnica de imuno-histoquímica houve imunomarcagem expressiva para linfócitos T e discreta de macrófagos, o que reforça o envolvimento da reação de hipersensibilidade tardia na patogênese da doença.

MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn. The Netherlands.

<sup>2</sup>Merck & Co., Inc. Kenilworth, NJ, USA.

<sup>3</sup>Dako Denmark A/S. Glostrup, Denmark.

<sup>4</sup>Sigma Aldrich Brasil. Jurubatuba, SP, Brazil.

<sup>5</sup>BioCare Medical Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>6</sup>Invitrogen Corporation. Carlsbad, CA, USA.

cesso 481576/2013-4).

**Acknowledgements.** Aos alunos e colegas do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS pelo auxílio, em especial para Cíntia De Lorenzo e Matheus Viezzer Bianchi.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

**Funding.** This work was financial supported by CNPq (Pro-

REFERENCES

- 1 Barros C.S.L., Figuera R.A., Rozza D.B., Rech R.R., Sallis S.V. & Langohr I.M. 2001.** Doença granulomatosa sistêmica em bovinos no Rio Grande do Sul associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia* spp.). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(4): 162-171.
- 2 Blowey R.W. & Weaver A.D. 2011.** Integumentary disorders. In: *Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle*. 3rd edn. Philadelphia: Mosby Elsevier, pp.29-51.
- 3 Figuera R.A., Souza T.M. & Barros C.S.L. 2005.** Lesões de pele em bovinos com doença granulomatosa sistêmica associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia* spp.). *Ciência Rural*. 35(2): 406-411.
- 4 Gava A. & Barros C.S.L. 2007.** Intoxicação por polpa cítrica. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. v.2. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, pp.98-102.
- 5 Harper P., Cock R.W., Gill P.A., Fraser G.C., Badcoe L.M. & Power J.M. 1993.** Vetch toxicosis in cattle grazing *Vicia villosa* spp *dasycarpa* and *V. benghalensis*. *Australian Veterinary Journal*. 70(4): 140-144.
- 6 Johnson B., Moore J., Woods L.W. & Galey F.D. 1992.** Systemic granulomatous disease in cattle in California associated with grazing hairy vetch (*Vicia villosa*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 4: 360-362.
- 7 Kellerman T.S., Coetzer J.A.W., Naudé T.W. & Botha C.J. 2005.** The skin and adnexa. In: *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*. 2nd edn. Oxford: University of Oxford, pp.288-289.
- 8 Odriozola E., Paloma E., Lopez T. & Campero C. 1991.** An outbreak of *Vicia villosa* (hairy vetch) poisoning in grazing Aberdeen Angus Bulls in Argentina. *Veterinary and Human Toxicology*. 33(3): 278-280.
- 9 Panciera R.J., Mosier D.A. & Ritchey J.W. 1992.** Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) poisoning in cattle: Update and experimental induction of disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 4: 318-325.
- 10 Sonne L., Raymundo D.L., Boabaid F.M., Watanabe T.T.N., Oliveira L.G.S., Vaz Jr. I.S. & Driemeier D. 2011.** Achados patológicos e imuno-histoquímicos em bovinos com doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia villosa* (Leg. Papilionoideae) no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(4): 307-312.
- 11 Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Barbosa J.D., Brito M.F. & Döbereiner J. 2010.** Deficiência de cobre. In: *Deficiências Minerais em Animais de Produção*. Rio de Janeiro: Helianthus, pp.88-102.
- 12 Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012.** Plantas que causam doença granulomatosa sistêmica. In: *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2.ed. Rio de Janeiro: Helianthus, pp.431-436.

