

DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO EM BOVINOS PELOS EXAMES HISTOLÓGICOS E MICRORRADIOGRÁFICOS DE COSTELAS¹

Célso Pilati², Iveraldo S. Dutra³, Konrad Behrens⁴, Jürgen Döbereiner⁵
e Klaus Dämmrich⁶

ABSTRACT.- Pilati C., Dutra I.S., Behrens K., Döbereiner J. & Dämmrich K. 1996. [**Diagnosis of phosphorus deficiency in cattle by histologic and microradiographic examination of ribs.**] Diagnóstico da deficiência de fósforo em bovinos por exames histológicos e microrradiográficos de costelas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):27-33. Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, UDESC, Cx. Postal 281, Lages, SC 88520-000, Brazil.

The objective of the present study was to show the efficiency of histologic and microradiographic techniques performed on rib bone samples as a mean of diagnosing the phosphorus status of cattle raised on phosphorus deficient pastures and receiving different mineral supplements. The rib samples were obtained from cattle of different ages which died from disease that was clinically and epidemiologically diagnosed as botulism. Ten out of 24 juvenile and adult animals studied exhibited alterations of osteomalacia, while the others without those alterations served as controls. It is suggested that the method could be useful to improve the diagnosis of phosphorus deficiency of cattle in Brazil.

INDEX TERMS: Phosphorus deficiency, cattle, diagnosis, histologic and microradiographic examination, rib bone.

SINOPSE.- O objetivo do presente estudo foi de mostrar a eficácia de exames histológicos e microrradiográficos de costelas para avaliar o "status" de fósforo em bovinos criados em pastagens deficientes neste elemento e que rece-

beram suplementos minerais diversos. As amostras de costelas foram coletadas de animais de diferentes idades, os quais morreram de doença com diagnóstico clínico e epidemiológico de botulismo. Dez dos 24 bovinos estudados mostraram alterações de osteomalácia, ao passo que os outros sem estas alterações serviram de controles. Sugere-se que o método poderia ser útil para aperfeiçoar o diagnóstico da deficiência de fósforo em bovinos no Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Deficiência de fósforo, bovinos, diagnóstico, exames histológicos e microrradiográficos, costela.

INTRODUÇÃO

O custo de suplementar fósforo aos bovinos em pastagens deficientes é relativamente elevado, sendo o elemento responsável por mais de 50% do ônus representado pelo uso de misturas minerais. Por esta razão, pesquisadores de países como os Estados Unidos, África do Sul e Austrália vêm buscando uma técnica eficiente de diagnóstico do "status" de fósforo dos bovinos, que permita prever a quantidade do elemento a ser suplementada e os resulta-

¹ Aceito para publicação em 10 de janeiro de 1996.

Parte do trabalho de tese de Doutorado do primeiro autor defendida na Universidade Livre de Berlin, em 11 de julho de 1994, como bolsista do CNPq/DAAD (Convênio bilateral Brasil/Alemanha).

² Laboratório de Patologia Animal, CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Cx. Postal 281, Lages, SC 88520-000.

³ Depto Produção e Saúde Animal, Unesp-Campus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 793, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16050-680; bolsista do CNPq (305967/85-1).

⁴ Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Setor de Anatomia Patológica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), como bolsista consultor de ensino e pesquisa do CNPq/DAAD (Convênio bilateral Brasil/Alemanha).

⁵ Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista do CNPq (305294/88-1).

⁶ Institut für Veterinär-Pathologie, Freie Universität Berlin, Strasse 518, Nr. 15, D-14163 Berlin, Alemanha.

dos a esperar. Neste contexto, técnicas tradicionais - tais como dosagem do P inorgânico no sangue, determinação da concentração de P em amostras de ossos (esterno, costelas, vértebras) obtidos por biópsia, medidas da espessura da camada cortical dos ossos - têm-se mostrado ineficientes para prever a condição de nutrição fosfórica do animal e para diferenciar entre bovinos suplementados ou não sob condições de moderada deficiência do elemento. Tais técnicas têm-se mostrado efetivas apenas nos casos de extrema e prolongada deficiência do mineral na dieta e/ou nas condições em que as demandas do elemento se acham exacerbadas, como no caso de vacas nos primeiros meses de lactação.

Com o objetivo de encontrar uma alternativa para a melhor avaliação da eficácia da suplementação de fósforo em rebanhos bovinos, criados em pastos deficientes neste elemento (Tokarnia et al. 1988), foram empregadas técnicas histológicas e microrradiográficas em uso no Instituto de Patologia Veterinária da Universidade Livre de Berlin, para o exame de costelas coletadas de bovinos, mantidos em regime de criação extensiva de campo, com e sem deficiência de fósforo, na Região Centro-Oeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Bovinos

Os animais estudados foram necropsiados em regiões com deficiência de fósforo e suplementação mineral variável, no decorrer de diagnósticos clínicos e epidemiológicos de botulismo, nos Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo (Döbereiner et al. 1990, Dutra et al. 1993). Foram examinados 24 bovinos, fêmeas, mestiços Zebu, com 2 a 8 anos de idade, dos quais foram coletadas amostras de costelas para os estudos histológicos e microrradiográficos, realizados no Instituto da Patologia Veterinária da Universidade Livre de Berlin, Alemanha.

Costelas

As amostras foram obtidas do corpo costal e da junção condrocostal das 6ª ou 13ª costelas através de corte transversal e fixados em formol neutro a 10%.

Preparação do material

Os exames foram realizados em cortes não descalcificados, do material incluído em metilmetacrilato. A inclusão procedeu-se da seguinte maneira: as amostras fixadas foram lavadas em água corrente e desidratadas em etanol (etanol 70% durante 3 dias, etanol 96% durante 2 dias e etanol absoluto durante 4 dias, trocando-se o etanol após 2 dias), seguido por desidrigentamento em etanol-clorofórmio 1:3 durante 4 dias, com uma troca no segundo dia. As amostras foram então colocadas em acetona por 2 dias. Para a inclusão em metilmetacrilato foi feita a seguinte mistura:

Metilmetacrilato (Merck 800590)	2000 ml
Poliétilenoglicol 1500 (Merck 807489)	400 ml
Peroxido de benzoila (Merck 8016419)	40 g

Após 1 dia de imersão na solução de metilmetacrilato, esta foi trocada. A polimerização foi obtida lentamente em um banho-maria para melhorar a penetração da solução nas amostras. A

água do banho-maria tinha uma temperatura de 26°C aumentando-a até 32°C. A polimerização completa ocorria no máximo em 10 dias.

Exames histológico-morfométricos

Dos fragmentos de costelas em metilmetacrilato foram tirados cortes longitudinais de 7µm de espessura com um micrótomo de cortar tecidos duros (K-mot. Fa. Jung, Heidelberg). Os cortes foram realizados com auxílio de uma fita Durex cristal-clara. Após secar entre duas lâminas de vidro a 38°C, os cortes foram corados sem retirar a fita Durex e o metilmetacrilato pelo método do tricromico de Goldner (Romeis 1989).

Para a interpretação morfométrica usou-se um aparelho de análise de campo ASM 68K da Firma Leitz/Wetzlar. Calculou-se a espessura das bainhas osteóides na superfície das trabéculas e da superfície interna da compacta, pela medida da área da bainha osteóide (µm²) dividida pelo seu maior comprimento (µm). Nos canais de Havers a espessura das bainhas osteóides foi calculada através da média de quatro medidas em pontos diferentes. A correlação da superfície quiescente, da superfície de aposição e da superfície de reabsorção foi estimada semiquantitativamente com auxílio de uma retícula ocular.

Estudo microrradiográfico

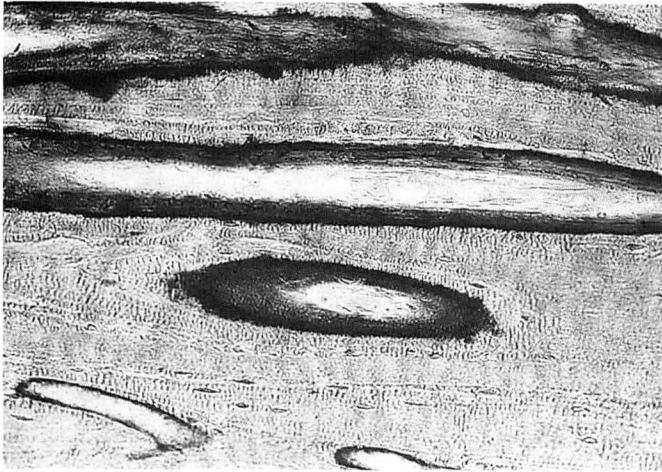
Dos blocos de metilmetacrilato foram tirados cortes de cerca 80µm de espessura por meio de serra mineralógica (Fa. Steeg & Reuter), utilizando-se uma lâmina HSS. Os cortes foram feitos sob água corrente e colocados entre duas placas de vidro e postos em estufa a 38°C para secar. Em seguida, os cortes foram colocados sobre uma "Kodak High Resolution Plate" para realização da microrradiografia de contato. Como fonte de irradiação foi usado um aparelho de raio-X (MUR Fa. Phillips) operando a 20 kv.

As microrradiografias foram examinadas com auxílio de um microscópio com aumentos de até 100 vezes. Foi interpretado o grau de mineralização das lamelas dos osteôneos, das lamelas do endóstio e o das trabéculas, onde um alto grau de mineralização correspondia ao das lamelas intersticiais; em comparação com esses osteôneos foram identificados osteôneos com médio e baixo grau de mineralização.

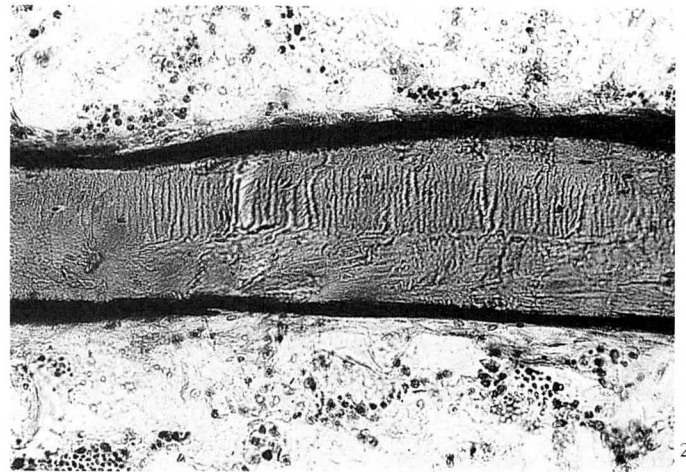
RESULTADOS

Das 24 amostras de costelas de bovinos jovens e adultos, examinadas através dos estudos histológicos e microrradiográficos, dez apresentaram alterações de osteomalácia onde nos cortes histológicos observou-se um aumento na espessura da bainha de osteóide, atingindo espessura máxima de até 19,4µm no revestimento dos canais de Havers, espessura de 25,9µm na superfície do endóstio e de 27,5µm na superfície das trabéculas (Quadros 1 a 3). Nos casos de osteomalácia, a superfície óssea revestida por osteóide era muito maior nos animais com deficiência crônica de fósforo do que nos animais sem essa deficiência. Por vezes toda superfície da trabécula ou do endóstio estava revestida pela substância osteóide. O número de osteôneos revestidos por osteóide era muito superior nos animais com osteomalácia do que nos sem osteomalácia (Fig. 1 a 4).

Ao exame microrradiográfico verificou-se que nos animais com hipofosfatemia crônica predominavam os osteô-



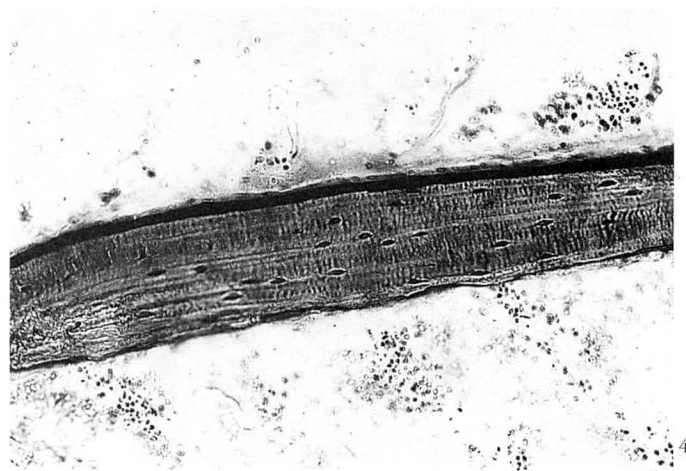
1



2



3



4

Fig. 1. Revestimento dos canais de Havers por tecido osteóide. Corte longitudinal da compacta de costela de bovino com osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 25.

Fig. 3. Osteôneos com canais de Havers uniformemente estreitos e com bainhas osteóides delgadas. Corte longitudinal da compacta de costela de bovino sem osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 10.

Fig. 2. Trabécula esponjosa coberta, de todos os lados, da bainha osteóide, em costela de bovino com osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 25.

Fig. 4. Bordo de reabsorção sem osteóide e bordo oposto de aposição com bainha de osteóide, numa trabécula esponjosa de costela de bovino sem osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 25.

neos com baixo grau de mineralização sobre os de alto e médio grau. Constatou-se também que frequentemente formaram-se fendas entre o tecido bem mineralizado e o com teores menores de cálcio. Observou-se ainda que um maior número de osteôneos tinha o canal osteônico alargado, as lacunas dos osteócitos apresentavam-se aumentadas e que a compacta tornava-se mais fina com o evoluir da doença (Fig. 5 a 8).

Em seguida resumimos os achados microrradiográficos e histológicos nas costelas dos bovinos examinados.

Bovinos em crescimento (Quadro 1)

Os oito animais deste grupo tinham idades diferentes e a remodelação da compacta laminar juvenil em sistemas de osteôneos tinha evolução variável. A remodelação em osteôneos de três animais ainda não tinha se iniciada. Em cinco animais até dois terços da compacta lateral eram re-

modelados em osteôneos. A remodelação em osteôneos era sempre menos evidente na compacta pleural. As lamelas especiais dos osteôneos eram, na maioria dos ossos, densamente mineralizadas e deixavam reconhecer uma zona marginal mais mineralizada na lamela interna do canal vascular (bordo de absorção). Nos osteôneos com canal de Havers alargado as lamelas especiais eram menos mineralizadas que as lamelas intersticiais. Em poucos espaços largos de Havers havia lacunas de reabsorção. Em canais de Havers largos com aposição de tecido ósseo lamelar ocorriam bainhas osteóides com 9,2 a 17,7 μ m de largura. Na superfície periostal formavam-se lamelas tangenciais interligadas por lamelas radiais curtas. Na compacta lateral e pleural encontrava-se uma lamela geral endostal. Nos animais mais jovens a lamela geral ainda não tinha se formada completamente. Também observava-se reabsorção endostal por osteoclastos no sentido ex-

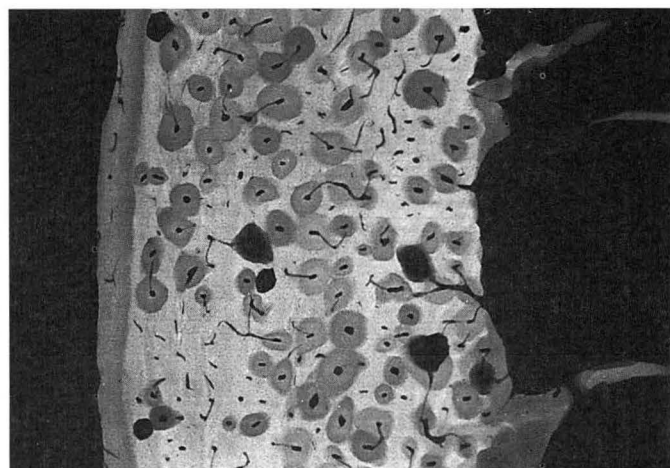
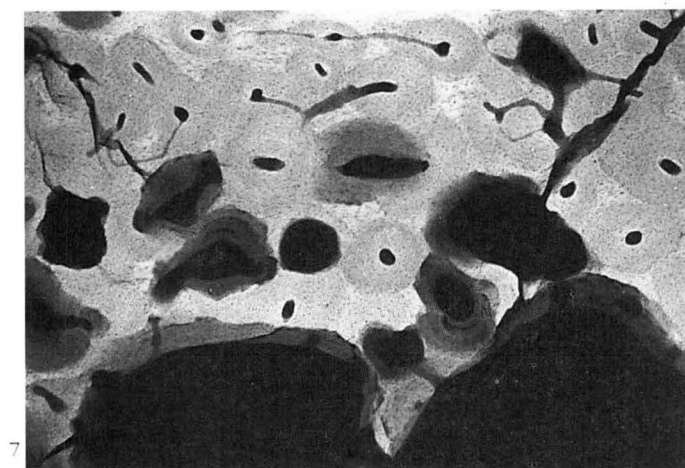
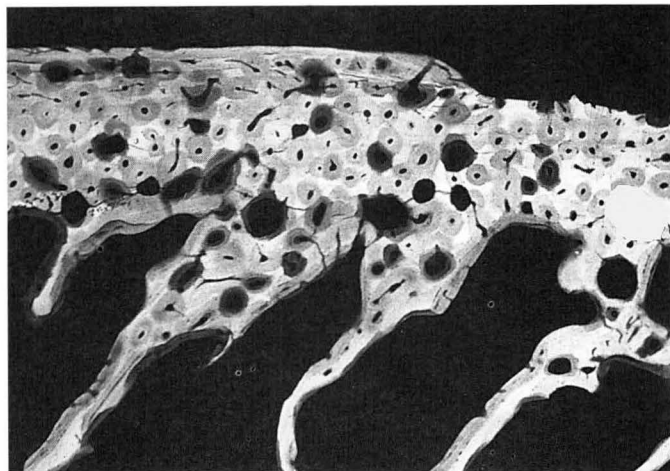
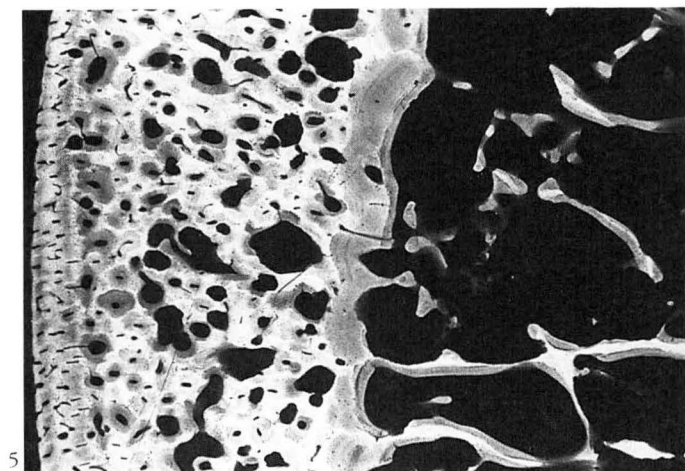


Fig. 5. Numerosos canais de Havers alargados e lamelas especiais e gerais fracamente mineralizadas. Corte transversal de costela de bovino em crescimento (juvenil) com osteomalácia. Microrradiograma, obj. 2,5.

Fig. 7. Canais de Havers alargados e revestimento das lacunas de reabsorção por tecido ósseo fracamente mineralizado. Corte transversal de costela de bovino com osteomalácia. Microrradiograma, obj. 10.

Fig. 6. Canais de Havers alargados e lacunas de reabsorção com tecido ósseo fracamente mineralizado. Corte transversal de costela de bovino adulto com osteomalácia. Microrradiograma, obj. 2,5.

Fig. 8. Osteôneos com canais de Havers estreitos e lamelas especiais apresentando médio e alto níveis de mineralização. Corte transversal de costela de bovino adulto sem osteomalácia. Microrradiograma, obj. 2,5.

cêntrico, sob forma focal. As lamelas gerais eram uniformemente mineralizadas e cobertas em alguns pontos por bainhas osteóides com 8,7 a 14,4 μ m de espessura. As trabéculas esponjosas tinham, em certos trechos, bainhas osteóides com 6,1 a 16,8 μ m de espessura. Em dois bovinos as bainhas osteóides eram muito finas não sendo possível determinar sua espessura.

Resumindo pode se constatar que, nos bovinos ainda em crescimento, foram verificadas diferenças de estrutura nas costelas examinadas que somente existiam em face das diferenças de idade dos animais. A mineralização do tecido ósseo aconteceu regularmente. A espessura das bainhas osteóides nos canais de Havers, bem como nas lamelas gerais e nas trabéculas esponjosas não podia ser interpretada como sinal de um distúrbio de mineralização no sentido de osteomalácia.

Bovinos adultos (Quadro 2)

Neste grupo de seis animais a compacta mostrou uma lamela geral estratificada externa e interna. A compacta lateral de quatro animais era inteiramente transformada em osteôneos, de maneira que as lamelas intersticiais quase não eram perceptíveis. Em dois animais somente os dois terços internos da compacta tinham estrutura de osteôneos. Na compacta pleural de três animais ambos os terços internos e, de três animais, o terço interno eram transformados em osteôneos. As partes da compacta lateral e pleural que ainda não eram transformadas em osteôneos, consistiram de lamelas radiais e tangenciais. Em relação ao grau de mineralização dos osteôneos, em três animais observaram-se sobretudo osteôneos de teor mineral alto e, em três animais, osteôneos de conteúdo mineral médio. A maioria dos osteôneos mostraram um bordo de absorção clara-

Quadro 1. Bovinos em crescimento que possuíram estrutura óssea normal, de acordo com a sua idade

Animal n ^o	Frequência de osteôneos com canais de Havers estreitos, largos e alargados, no dorso das costelas	Espessura das bainhas osteóides (µm)		
		Canal de Havers	Lamela geral	Superfície da esponjosa
1113	3:1:1	12,7	14,0	13,7
1115	- ^c	17,7	9,6	10,2
1116	3:1:1	9,7	14,4	9,7
1121	2:2:1	7,8	9,2	6,1
1120b	2:1:1	12,0	8,9	16,8
1120c	- ^c	9,2	8,7	9,7
1333	1:1:1	- ^d	-	-
1083	- ^c	- ^d	-	-

^a Na superfície periosteal ainda há formação de lamelas radiais e tangenciais.

^b Espessura (µm) das bainhas osteóides nos canais de Havers, na lamela geral interna e nas trabéculas esponjosas.

^c Os animais apresentavam compacta juvenil não se estabelecendo relação entre os canais de Havers.

^d A espessura da bainha de osteóide era muito fina não sendo medida.

Quadro 2. Bovinos adultos que possuíram estrutura óssea normal^a

Animal n ^o	Frequência de osteôneos com canais de Havers estreitos, largos e alargados, no dorso das costelas	Espessura das bainhas osteóides (µm) ^b		
		Canal de Havers	Lamela geral	Superfície da esponjosa
1118	3:1:1	18,6	17,6	17,6
1119	3:1:1	20,5	18,8	20,9
1120f	3:1:1	19,0	17,8	15,2
1120g	2:1:1	13,3	14,1	12,1
1120i	3:2:1	10,4	12,2	10,0
1123a	3:1:1	13,7	113,5	14,4

^a A compacta da costela está fechada através da lamela geral externa e interna estratificada.

^b Espessura (0m) das bainhas osteóides nos canais de Havers, na lamela geral estratificada.

mente reconhecível da lamela especial interna. Nitidamente predominavam os osteôneos com canais de Havers estreitos. Um animal mostrou grande número de canais de Havers também largos. Além disso também existiam raros canais de Havers com lacunas de reabsorção. As bainhas osteóides dos canais de Havers largos, com aposição de tecido ósseo lamelar, tinham uma espessura de 10,4 a 20,5µm. As lamelas especiais dos osteôneos com canais vasculares largos mostravam teor mineral médio. A superfície interna da compacta em dois animais era coberta por uma lamela geral estreita, em dois animais por uma lamela geral de largura média e em dois animais por lamela geral larga. Em todos os animais, as lamelas gerais mostravam teor mineral médio e tinham bainhas osteóides com 12,2 a 18,8µm de largura. Em alguns pontos as lamelas gerais eram desgastadas sob forma de lacunas pelos osteoclastos. Nas trabéculas esponjosas observaram-se, em certos trechos, bainhas osteóides com espessura de 10,0 a 20,0µm. Nas trabéculas esponjosas também ocorreram lacunas de Howship.

Resumindo, pode se verificar que os bovinos desse grupo mostraram estruturas que corresponderam a uma com-

compacta de costela após término de crescimento. As bainhas osteóides eram mais largas que as nos animais em crescimento do grupo anterior.

Bovinos jovens e adultos com osteomalácia (Quadro 3)

Neste grupo são descritos os resultados de dez animais, em conjunto. Cinco animais (1117,1120e, 1122a, 1122b, 1123b) mostram uma compacta ainda em crescimento com formação subperiosteal de lamelas radiais e tangenciais. A compacta de um destes animais consistiu de tecido ósseo juvenil com canais vasculares estreitos e sob a forma de fendas. Nos outros quatro animais a compacta lateral e pleural até dois terços estava transformada em osteôneos. Nos cinco animais restantes (1120a, 1120d, 1120h, 1334, 1335) a compacta era fechada por uma lamela geral estratificada externa e outra interna. Neste casos a largura da lamela geral era variável. A lamela geral externa tinha um teor mineral mais baixo que as lamelas intersticiais. Nesses cinco animais a compacta era em grande parte transformada em osteôneos. Nas costelas com transformação parcial ou completa em osteôneos, ocorreram frequentemente osteôneos com lamelas especiais fraca-

Quadro 3. Bovinos jovens e adultos que tiveram alterações de osteomalácia

Animal n ^o	Frequência de osteôneos com canais de Havers estreitos, largos e alargados, no dorso das costelas	Espessura das bainhas osteóides (µm) ^a		
		canal de Havers	Lamela geral	Superfície esponjosa
1117 (jovem)	1:2:1	17,2	19,8	26,7
1120e (jovem)	2:2:1	18,6	25,9	27,5
1122a (jovem)	1:2:1	19,4	16,3	17,4
1122b (jovem)	1:3:2	13,2	14,5	15,4
1123b (jovem)	0:1:2	12,6	17,3	19,2
1120a (adulto)	3:2:1	15,2	16,9	15,8
1120d (adulto)	3:2:1	16,6	11,5	13,6
1120h (adulto)	2:2:1	12,9	19,5	18,2
1134 (adulto)	3:2:1	17,3	23	18,8
1135 (adulto)	3:2:1	12,4	18,1	18,1

^a Espessura (µm) das bainhas osteóides nos canais de Havers bem como na lamela geral interna e nas trabéculas esponjosas.

mente mineralizadas, enquanto que em cinco animais eram os osteôneos fracamente mineralizados mais frequentes que os osteôneos de teores minerais médio e alto. Em todos os nove animais observaram-se osteôneos com duas camadas diferentes, uma com lamelas especiais internas mais acentuadamente mineralizadas e outra, com lamelas especiais externas mais fracamente mineralizadas. As lamelas especiais variavelmente mineralizadas haviam sido separadas por uma linha fortemente mineralizada ("Kittlinie"). Frequentemente havia fendas entre essas camadas lamelares. Em sete animais havia somente alguns poucos destes osteôneos com as duas camadas, em dois animais esses eram mais numerosos. Os osteôneos de conteúdo mineral mais baixo não deixaram reconhecer bordos de mineralização mais acentuada. Em todos os animais osteôneos com canais vasculares alargados eram presentes em número variável. Os canais vasculares em poucos osteôneos também eram dilatados por osteoclasia. Em osteôneos com o canal de Havers largo e aposição de tecido ósseo lamelar, o tecido ósseo depositado era fracamente mineralizado e coberto por bainhas osteóides com 12,6 a 19,4µm de espessura. A compacta interna (endostal) de todos os animais era coberta de uma lamela geral variavelmente larga. As lamelas gerais tinham, nos dez animais, um teor mineral mais baixo. Quando as lamelas gerais no espaço medular eram constituídas de duas camadas, na camada interna o teor mineral era mais alto. Entre as camadas variavelmente mineralizadas das lamelas gerais internas havia frequentemente fendas. A superfície das lamelas gerais era quase completamente coberta de bainhas osteóides mineralizadas com 11,5 a 25,9µm de espessura. A superfície das trabéculas esponjosas era formada de tecido ósseo fracamente mineralizado que era quase completamente coberto de bainhas osteóides com espessura de 13,6 a 27,5µm.

Resumindo, pode-se verificar que as costelas dos dez animais mostraram diferenças ligadas à idade. Os achados patomorfológicos corresponderam aos de osteomalácia. O tecido ósseo formado durante a evolução do

processo mostrou duas formas de alteração. Quando o tecido mineralizou, o teor mineral ficou baixo. Quando o tecido ósseo em formação não mineralizou, bainhas osteóides cobriram quase inteiramente a superfície endostal das costelas com espessura de até 27,5µm. A osteogênese era hipoplásica em graus variáveis, assim que os espaços internos lentamente se alargaram durante a remodelação.

DISCUSSÃO

Dos 24 bovinos examinados neste estudo dez apresentaram alterações de osteomalácia que caracteriza-se pela não-mineralização do tecido osteóide, do novo osso em formação. Nos animais em crescimento encontra-se tecido osteóide principalmente na superfície periosteal e na superfície endostal. Em animais adultos encontra-se tecido osteóide sobretudo nos locais de remodelamento interno, isto é, nas trabéculas esponjosas e nos canais de Havers.

Para o diagnóstico de osteomalácia foram consideradas a espessura da camada de osteóide e a extensão da bainha de osteóide sobre a superfície interna do osso, a superfície das trabéculas ósseas e dos canais de Havers. Este último critério mostrou-se mais eficiente no diagnóstico da deficiência crônica de fósforo, uma vez que as colunas de osteóide estendem-se por uma superfície maior do que nos animais sem deficiência. A espessura da bainha não mostrou-se tão eficiente no diagnóstico; isso deve-se provavelmente ao fato que a deficiência de fósforo normalmente está acompanhada de deficiência de energia e proteína, havendo com isso menor deposição de tecido ósseo pelos osteoblastos (Palmer 1992). Há nestas circunstâncias um afinamento da compacta e um maior número de canais de Havers alargados com o evoluir da doença.

Sugerimos que a metodologia utilizada poderia ser aproveitada, no Brasil, na avaliação da eficácia da suplementação de fósforo em rebanhos bovinos criados em regime extensivo de campo em regiões com solos deficientes neste elemento.

Agradecimentos.- Ao Dr. Ivan Valadão Rosa, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, pelas informações e estímulo dados para a realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic botulism of cattle in Brazil. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 99(5):188-190.
- Dutra I.S., Weiss H.E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4):83-86.
- Palmer N. 1992. Bone and joints, p. 1-181 In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Romeis B. 1989. *Mikroskopische Technik*. 17., neubearbeitete Auflage. Hrsgb. P. Böck. Urban & Schwarzenberg, München, S. 499-500.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J & Moraes S.S. 1988. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 8(1/2): 1-16.