

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

DETERMINACION HISTOQUIMICA DE FE ++ Y FE +++ EN LA
REGION YEYUNO- DUODENAL DE RATAS

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
SEVERO HERNANDEZ RIVERA

ASESORES:

M. V. Z. VICTOR BARRAGAN CANO
M. V. Z. JORGE HERNANDEZ GOBORA

Guadalajara, Jal., Julio de 1986

Determinación Histoquímica de Fe⁺⁺ y Fe⁺⁺⁺ en la Región Yeyuno-Duodenal de ratas

Tesis Profesional.

Que para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Presenta.

SEVERO HERNANDEZ RIVERA

Asesores: M.V Z. VICTOR BARRAGAN CANO
M V Z JORGE HERNANDEZ GOBORA

Guadalajara, Jalisco 1986

A LA MEMORIA DE MI HERMANO:

PROFR. J. SANTOS HERNANDEZ RIVEPA

A MI MAMA: JUANA RIVERA ORTEGA

LEONARDA

LAZARO

Y MUY ESPECIALMENTE A:

CONCEPCION ALVARADO GARCIA
POR SU INOLVIDABLE AYUDA PARA LA
REALIZACION DEL PROPOSITO EDUCATIVO DE
MI VIDA.

A MIS SOBRINOS:

ELIZABETH PONCE ALVARADO

ELBA

PORFIRIO

ABRAHAM.

Y CON RESPETO Y CARIÑO A:

ANA MA. LEDEZMA VELASCO
ARISTEO NAVARRO RODRIGUEZ
ADALBERTO NAVARRO RODRIGUEZ
EVA NAVARRO RODRIGUEZ
AMPELIA NAVARRO RODRIGUEZ
J. REFUGIO SERRANO RODRIGUEZ
DANIELA IVANIA SERRANO NAVARRO.

MI ETERNO AGRADECIMIENTO A:

M.V.Z. JOSE LUIS MATA BRACAMONTES.

A MIS ASESORES Y AMIGOS:

M.V.Z. VICTOR BARRAGAN CANO

M.V.Z. JORGE HERNANDEZ GOBORA

A MI HONORABLE JURADO:

M.V.Z. ALFONSO ORTIZ PEREZ

M.V.Z. GUILLERMO VALTIERRA ALVAREZ

M.V.Z. PABLO HARO HARO

M.V.Z. PALEMON GARCIA REAL

M.V.Z. RAFAEL BERBER IÑIGUEZ

A MI ALMA MATER.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

QUE SEÑALO MIS SENDEROS.

A MIS MAESTROS:

A TODAS AQUELLAS PERSONAS, AMIGOS POR SU INVOLVIDABLE COLABORACION.

EL AUTOR DESEA MANIFESTAR SU AGRADECIMIENTO A LA SRA. LUZ ELENA TORRES LOPEZ Y A LA SRA. RAJONA CALDERON MARISCAL, POR SU EXCELENTE COLABORACION EN LA MECANOGRAFIA DEL PRESENTE TRABAJO ASI COMO A LA BIOLOGA ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ POR SU APOYO CIENTIFICO EN EL DPTO. DE INVESTIGACION DE LA F.M.V.Z.

CON RESPETO A MI COMPAÑERO:

M. en C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA
POR SU BRILLANTE PARTICIPACION.

EL PRESENTE TRABAJO RECIBIO APOYO DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA DE LA F. M.V.Z. PARA SU REALIZACION, ASI COMO DE LA DIVI
SION DE BIOQUIMICA FARMACOLOGICA DE LA UNION DE INVESTIGACION BIOME
DICA DE OCCIDENTE DEL I.M.S.S.

JULIO DE 1986.

I N D I C E

<u>CONTENIDO:</u>	<u>PAGINAS.</u>
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	14
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	20
SUMARIO	21
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24

" DETERMINACION HISTOQUIMICA DE Fe⁺⁺ y Fe⁺⁺⁺ EN LA REGION
YEYUNO-DUODENAL DE RATAS " .

I N T R O D U C C I O N

El hierro ejerce en el organismo diversas funciones - importantes como:

- a) Acarreo de oxígeno a los tejidos.
- b) Participa como elemento estructural en proteínas - enzimas.
- c) Permite la recuperación de energía mediante la fosforilación oxidativa en el sistema de citocromos - de la cadena respiratoria. (12)

Una forma especializada de hemoglobina es la mioglobina, que permite transportar oxígeno especialmente al músculo estriado, solo cuando se producen trastornos en la síntesis de hemoglobina se desencadenan anormalidades sistémicas en los sujetos, manifestadas principalmente por anemias. Mismas que retardan la maduración de sistemas multi-enzimáticos particularmente en animales jóvenes.---
(12)

En las enzimas existen cofactores, algunas veces son metales como Mg., Mn., Zn., o Fe frecuentemente estos iones metálicos se unen a la porción polipeptídica de la enzima denominándose así grupo prostético y son necesarios'

para la actividad enzimática. (6)

La participación del Fe en el sistema de citocromos' permite agregar ortofósforo a cada molécula de ADP de -- tal forma que como resultado de la vía glucolítica ana-- erobia y ciclo de los ácidos tricarboxílicos se producen 38 moléculas de ATP. lo que permite aumentar la eficiencia energética de los sistemas biológicos. (6)

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL HIERRO.

El hierro se encuentra distribuido en el organismo - de la siguiente forma:

- 1.- Hemoglobina circulante 70%
- 2.- Mioglobina 5%
- 3.- Hierro de almacenamiento 20%
- 4.- Hierro funcional tisular que comprende a las enzimas respiratorias 5%.

Por lo anterior, aproximadamente el 75% de hierro -- corporal esta representado por hemoglobina, el 20% res-- tante como depósitos endógenos y el 5 % como elemento -- funcional no facilmente metabolizable.(6)

El hierro pone una gran capacidad oxido-reductiva - reversible. (6)

METABOLISMO DEL HIERRO

Los niveles de hierro en el organismo están regulados por su capacidad de absorción. En condiciones normales el hierro es absorbido en el tubo digestivo, principalmente en la región yeyuno - duodenal, además puede incorporarse por inyección parenteral. (5)

La forma más biodisponible del hierro⁺⁺ oral es la forma Fe^{++} por que a mayor electropositividad del elemento se dificulta más su absorción. Debido a que el transporte transepitelial sucede con participación de energía los compuestos ferrosos, son más eficaces para el tratamiento de deficiencias; que se presentan principalmente en animales recién nacidos. (12)

Para evitar la anemia ferropriva cuando existen grandes deficiencias de hierro debidas al aporte insuficiente de la leche materna, y a la imposibilidad de ingerirlo del medio ambiente se recurre generalmente a la

aplicación intramuscular profunda de compuesto hidrolizables. (12)

Bajo estas condiciones se producen intoxicaciones -- cuando se saturan los sistemas de depósito, mismas que se manifiestan por hemosiderosis en el sitio de la inyección y en los órganos que participan en la hematopoyesis (Hígado, Médula ósea, Bazo). (6)

Actualmente existen técnicas bioquímicas mediante colorimetría, que permiten cuantificar la cantidad de hierro presente en homogenados de tejidos. (6)

Sin embargo no es posible determinar las alteraciones celulares, que permitan establecer un diagnóstico diferencial con otras Patologías, tales como anemias hemolíticas masivas.

Por todo lo anteriormente expuesto y debido a que en Medicina Veterinaria la inyección de hierro es un procedimiento de rutina especialmente en cerdos, el presente trabajo tiene por objeto estandarizar la metodología neces-

ria que permite la identificación histoquímica del hierro y diferenciar Fe^{++} y Fe^{+++} además de precisar la localización y cantidad de éste en diferentes tejidos del tubo digestivo de ratas. (6)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hierro es un elemento indispensable para que puedan realizarse las actividades celulares, su incorporación al organismo sucede mediante absorción intestinal y existen además sitios de depósito en algunos tejidos como: Hígado, bazo, médula ósea etc. Durante las primeras etapas de vida de algunos animales se requieren --- grandes cantidades de hierro, como ocurre con los lechones, por lo que debe administrarse ya sea por vía -- oral o parenteral, cuando la cantidad es excesiva se -- provocan intoxicaciones que pueden progresar hasta la - muerte del animal.

Debido a la dificultad que se presenta para identificar un cuadro clínico de intoxicación por Fe, es necesario disponer de recursos diagnósticos específicos mediante técnicas de histoquímica que nos proporcionen ma yo información del estudio histopatológico que se realiza en situaciones como la descrita.

H I P O T E S I S

Mediante las técnicas de Lillie y Batofenantrolina específicas para la identificación de Fe^{++} y Fe^{+++} es posible establecer las modificaciones en el estado de oxidación-reducción de este elemento, así como la movilización de este en el intestino de ratas.

O B J E T I V O S

G E N E R A L

Estandarizar las técnicas histoquímicas de Lillie y Batofenantrolina para identificar Fe^{++} y Fe^{+++} en tejidos animales.

P A R T I C U L A R E S

- 1.- Identificar Hierro II y III mediante la técnica de Lillie.
- 2.- Demostrar la selectividad para evidenciar la presencia de Hierro II mediante la técnica de Batofenantrolina.
- 3.- Realizar un estudio descriptivo de la distribución del Hierro entre los diferentes componentes de la pared intestinal.
- 4.- Definir si existe Hierro endógeno en la región yeyuno-duodenal de ratas adultas Sprague Dawley.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 30 ratas adultas, hembras de la Ceba - Sprague Dawley con un peso promedio de 240 grs. Un grupo de 10 de estos animales, fué destinado para los experimentos con la técnica de Lillie un segundo grupo con igual número de ratas para desarrollo del procedimiento con Ba tofenantrolina y el resto como control.

Cada uno de estos animales se mantuvo sin alimentación durante 12 horas antes de iniciar los experimentos, se les inyectó tiopental sódico por vía intraperitoneal para anestésiarlos y practicar una laparatomía abdominal que permitió exponer el estómago y las primeras secciones intestinales. A una distancia de 6 cm. a partir del píloro se introdujo un cateter de polietileno rígido de 3 mm. de diametro interno, mismo que se sujeto mediante una ligadura, se introdujo un segundo cateter a 20 cm. de distancia de la primera ligadura, para después devolver las visceras al abdomen y suturar la herida (con seda trenzada de 000) con 6 puntos de sutura separados.

El primer cateter sirvió como vía de entrada para las soluciones que fueron perfundidas y que se colectaron mediante el segundo.

Bajo condiciones fisiológicas se hizo pasar una solución inicial de cloruro de sodio al 0.7 % para desalojar el contenido intestinal mediante la introducción de 10 ml., el procedimiento se repitió una segunda vez por que se observó turbidez en el líquido colectado, posteriormente se introdujeron soluciones de cloruro férrico 5 ml., cada 10 minutos durante 1 hora a una concentración de 40 mg./ml., este procedimiento fué el mismo para los animales que recibieron Fe^{++} y los controles a quienes solamente se les perfundió con solución salina fisiológica.

Una vez terminado este período se procedió a sacrificar al animal mediante sección de la arteria aorta abdominal, el asa intestinal se diseccionó y fijó por inmersión en una solución amortiguada de formáldehído al 4 %. Después de 24 horas el tejido fué procesado para inclusión final en parafina.

Se obtuvieron rebanadas de 6 μ m. de espesor del segmento intestinal incluido, mismas que fueron sometidas a las diferentes técnicas de Lillie y Batofenantrolina.

Mediante fotomicroscopía se realizó el estudio para'

las diferentes muestras, con distinta orientación.

Método de Lillie para la determinación de Hierro Férrico y Ferroso.

Procedimiento de tinción. Se uso una laminilla control, se empleo material de vidriería químicamente limpio.

- 1.- Desparafinizo e hidrato con agua destilada.
- 2.- Para hierro férrico se puso una sección en una solución de ferrocianuro de potasio por una hora.
- 3.- Se lavó bien en ácido acético glacial acuoso al 1 %.
- 4.- Se puso en una solución de fuschina básica por 10 minutos.
- 5.- Se enjuago con agua destilada.
- 6.- Se deshidrato en alcohol de 95%, luego en alcohol absoluto y por último aclaró en xilol, dos veces en cada uno.
- 7.- Se monto la laminilla con permount o histoclad o bálsamo de Cánada.

Resultados:

Hierro Férrico-----Azul de Prusia Oscuro.

Hierro Ferroso-----Azul Sucio Oscuro.

Control-----Rojo Claro.

Solución de Batofenantrolina.

Exclusivamente para sulfato ferroso (Fe^{++})

Procedimiento de tinción se uso una laminilla control.

Se uso material de vidriería químicamente limpio.

- 1.- Desparafinizo e hidrato en agua destilada.
- 2.- Se dejo en solución de Batofenantrolina (solución de trabajo)por 2 horas.
- 3.- Se enjuago en agua destilada.
- 4.- Se tiño en una solución de azul de metileno por 3 minutos.
- 5.- Se enjuago en agua destilada por 3 veces con duración de un minuto cada vez.
- 6.- Se escurrio y seco concienzudamente en estufa a -- 60°C.
- 7.- Se monto con permount o histoclad o Bálsamo de Cánada.

Resultados:

Hierro-----Rojo

Nucleina-----Azul.

OBSERVACION EN PORTUGALOS: -

Fe Presente en la región yeyuno - duodenal.		Fe Presente en el sedimento.		Localización en el epitelio intestinal.		Número total de muestras de tejido que revelan Fe	
+	32 %	+	29 %	Extracelularmente	62 %		
++	24 %	++	15 %	Intracelularmente - Extracelularmente	27 %	Celularmente	100 %
				Intracelularmente	11 %		

CLAVES USADAS PARA DETERMINAR CONCENTRACIONES DE Fe+++ :

+++ = Abundante

++ = Moderado

+ = Escaso

- = Nulo

Número total de muestras que se utilizaron 34 (100%)

Con la técnica de Batofenantrolina no se observó Fe⁺⁺

Figura # 1.- Fotomicrograffa de un corte de la region duodenal de rata.

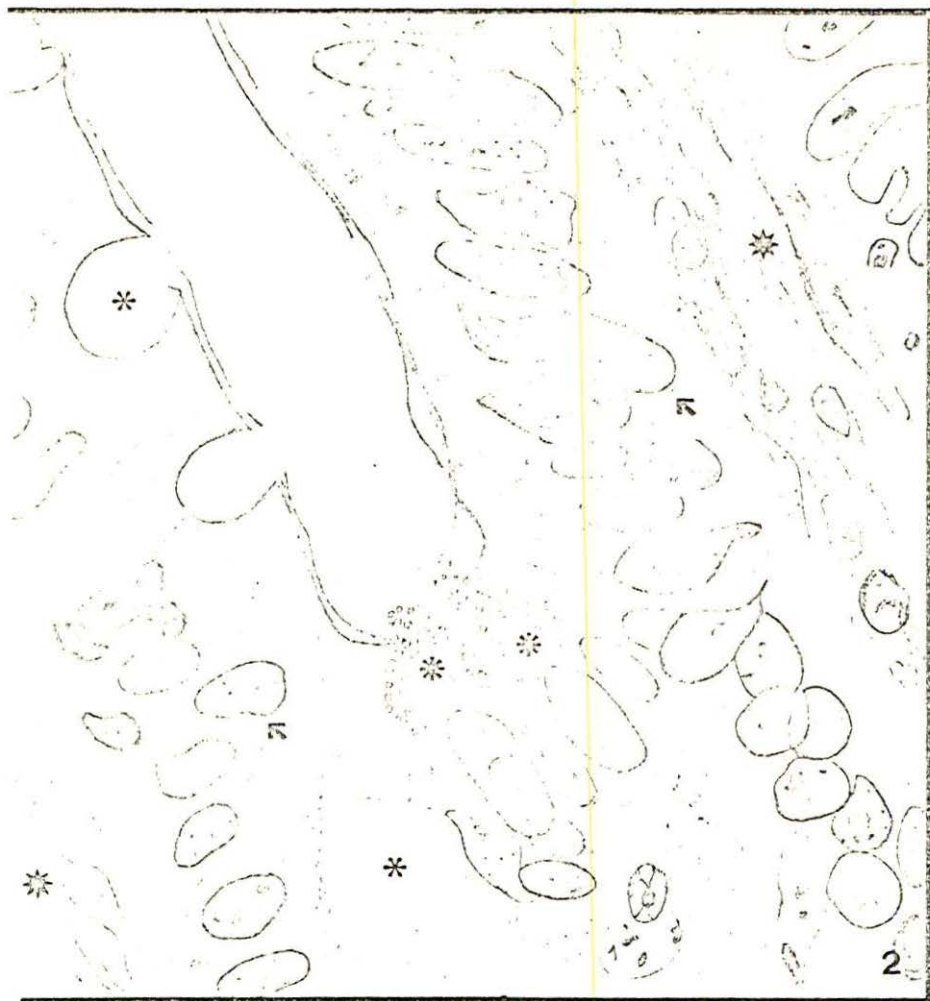


= Granulos de Fe^{+++} de color azul oscuro que aparecen, unicamente en la región media y apical de las vellosidades de la mucosa Duodeno-Yeyunal.

* = Células de Goblet secretoras de moco lubricante.

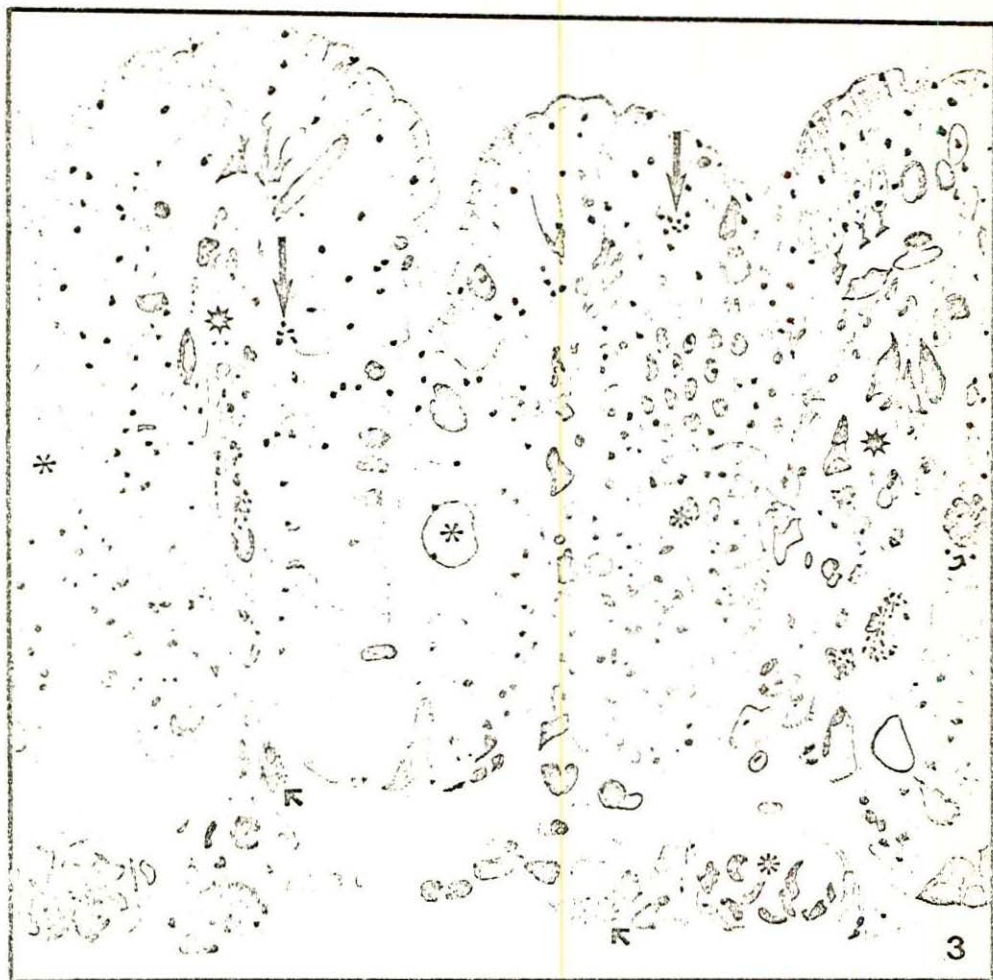
* = Lámina propia de las vellosidades.







2.- Fotomicrografia de la región basal de una cripta del epitelio yeyunal de rata



- = Células absortivas diferenciales
- * = Células de Goblet secretoras de moco lubricante.
- * = Células de Paneth productoras de Zimógeno.
- * = Lámina propia de las vellosidades.

Figura # 3.- Se muestra un corte longitudinal del duodeno de rata.



-  = Granulos de Fe^{+++} de color azul obscuro que aparecen en las regiones media y apical de la mucosa intestinal.
-  = Células eosinófilas de la lámina propia.
-  = Células absortivas en mitosis.
-  = Vasos sanguíneos.
-  = Células de Goblet secretoras de moco lubricante.
-  = Lámina propia de las vellosidades.

DISCUSION

Uno de los elementos más importantes para el funcionamiento celular es el hierro, éste se incorpora al organismo por vía intestinal. Para demostrar su presencia ya sea en estado oxido-reductor se utilizaron técnicas histoquímicas específicas (de Lillie para Fe^{++} y Fe^{+++} y Batofen--
nantrolina, unicamente para Fe^{++} .)

Al Fe^{++} no fué posible observarlo con ninguna de las Técnicas que a continuación se menciona, porque su absorción es más rápida que la del Fe^{+++} . Para cuantificar dicho elemento se empleó una técnica espectrofotométrica; con la cual se demostró que en cuanto a la cantidad de Fe^{++} -- que presento en mucosa es insuficiente para poder observar lo histoquímicamente.

Posiblemente en casos de grandes cantidades será útil la técnica de Batofen--
nantrolina.

Por otra parte en cuanto al Fe^{+++} fué detectable mediante la técnica de Lillie. Al hacer la observación se apreciaron pequeños granulos de un color azul oscuro a nivel intracelularmente, en la porción media y apical de las

vellosidades, con esta técnica se han probado que el hierro férrico, es más difícil su absorción a nivel celular razón por la cual fué detectable. La posición se debe a que el elemento se inyectó en el lumen intestinal, por lo tanto las primeras regiones que la capturaron fueron las vellosidades en la parte apical y media.

La toma de muestras se realizó al azar a lo largo de la región duodeno-yeyunal, por lo tanto la distribución y absorción del Fe fué homogénea, todo esto se comprobó con las observaciones microscópicas de las laminillas.

" CONCLUSIONES "

En el presente estudio se utilizaron 2 técnicas citológicas para la localización del "Fe" en la mucosa -- del intestino de ratas adultas.

Con los resultados obtenidos se concluye que:

- 1.- Con la técnica de batofenantrolina; no se puede Detectar el Fe debido a que se encontraron en este estado cantidades demasiado pequeñas como para ser detectadas histológicamente con el microscopio óptico.

TECNICA DE LILLIE

En esta técnica es sensible a Fe^{++} y Fe^{+++} únicamente.

- 2).- Con la técnica de Lillie se detecto Fe^{+++} por que este tipo de hierro es de absorción más difícil por lo que dura más tiempo presente en el intestino.
- 3).- Para poder estandarizar la técnica de batofenantrolina se sugiere para trabajar posteriormente, suministrar una cantidad mayor de Fe^{++}
- 4).- La aplicación de la técnica de Lillie en lechones sería de gran utilidad para valorar la eficacia de compuestos para la administración oral de hierro.

SUMARIO

En el estudio de investigación se utilizaron dos --
Técnicas:

Técnica de Lillie y la Técnica de Batofenantrolina - para la observación de Fe^{++} y Fe^{+++} se utilizaron 30 ratas adultas, hembras de la cepa Sprague Dawley se dietaron durante un tiempo de 12 Hrs. antes de los experimentos; se les anestesió con tiopental sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 50 mg. por Kg. de peso.

Se practicó una insición en la región abdominal para la extracción de vísceras. Con una distancia de 6 cms. a partir del píloro se introdujo un cateter de politileno - de 3 mm. de diametro interno, posteriormente un segundo - cateter a 20 cms. de una distancia de la primera ligadura. El primer cateter sirvió como vía de entrada para las soluciones que se perfundieron y se colectaron mediante el segundo.

Se introdujo soluciones de cloruro férrico 5 ml. cada diez minutos durante una hora a una concentración de 40 mg./ml. este procedimiento fué el mismo para los animales que recibieron Fe^{++} y los controles. Una vez que se

TESIS/CUCBA

termino el período se sacrificó el animal, el asa intestinal se diseccionó y se fijo por inmersión en una solución amortiguada de formaldehído al 4 %, el tejido fué procesado en inclusión en parafina; se hicieron rebanadas de --- seis ($\mu\text{m.}$) de espesor del fragmento intestinal y se tiñeron con las técnicas de Lillie y Batofenantrolina de -- las distintas soluciones perfundidas se tomaron muestras' en tubos de ensaye, los cuales centrifugaron 5 mm. y se - tomaron muestras del sedimento el cual se tiño con las -- técnicas de Lillie y Batofenantrolina.

Resultados obtenidos: En la técnica de Lillie el Fe' presente en la región yeyuno-duodenal se expresó con los' siguientes símbolos + = escaso 32 %, ++ = moderado 24 %, Fe presente en el sedimento + = escaso 29 %, ++ = moderado 15 %, localización en el epitelio intestinal. Extracelular 62 %, intracelular y extracelular 27 %, intracelular 11 %, número total de muestras a manejar 34 (100 %).

Para Fe⁺⁺ se tomaron varias muestras de intestino se lavaron en agua corriente se hizo una molienda y se depositaron en tubos de ensaye, para ser centrifugados durante 5 mm. a 2,500 revoluciones por minuto se checó la lec-

tura para medir el pH, para finalizar éste método se hizo el estudio en el aparato espectrofotómetro para ver lecturas y ser cuantificado el Fe.

En la técnica de Batofenantrolina nose pudo observar Fe por existir muy pequeñas cantidades.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- A Pfau, K Rudolphi, H.C. Heinrich, E. E. Gabbe., --
Whole-Body iron - 59 retention measurements for esti-
mating the iron status of piglets. In nuclear techni-
ques in animal production and health. Vienna, Aus-
tria; International Atomic Energy Agency. (1979)
127-140 En, 45 ref.; Discussion 140-141 Inst. Anim.
Breeding Behaviour - (fal), Mariensee, German Fede-
ral Republic.
- 2.- Blood D. C., Henderson J. A., Rodastits O. M., Medi-
cina Veterinaria, Nueva Editorial Interamericana, Re-
impresión quinta Edición en Español. Año de 1982, --
Págs. 936-939.
- 3.- Borton A., Hints F.A., Dalevan Vleck L. El caballo,
Publicación E. E. U. U. Por W. H. Freeman And Compa-
ny. Editorial Acribia, Zaragoza (España), Año de --
1979. Págs. 262.
- 4.- Bradi P. S., Ku P. K. Ullrey, D. E., E. R. Evaluation
of an amino acid - iron chelate hematinic for the baby
pig. Journal of animal science (1978) 47 (5) ----

1135-1140 en, ref. Dep. Anim. Husb., State Univ., --
East Lansing, Michigan 48824, USA.

- 5.- C. Guyton Arturo, Tratado de Fisiología Médica, Saunders, Company, Philadelphia. Editorial Interamericana, Año de 1963. Págs. 61-63.
- 6.- Cantarrow Abraham, Tratado de Bioquímica, Editorial Interamericana, Año de 1969; Págs. 624-627.
- 7.- Co. Merck, El Manual Merck de Veterinaria, Segunda -- Edición en Español. Rahway, New Jersey, E. U. A. Año' de 1979, Págs. 805.
- 8.- D.P. Ivanov, Khatskevich, Valakhanovich A.I., Effect' of dextran preparations containing iron, opper and co balt on the blood picture and growth of piglets. Vete rinarnye Institut (1975) 13, 177 - 179 Ru Veterinar nyi Institut, Minsk, Belorussk - aya SSR, USSR.
- 9.- Grassmann, E. Utilization of suboptimun supplements - of various iron compounds in the rat. Zur verwertung' suboptimaler Zulagen verschiedener Eisenverbindungen - durch die ratte Zentralblatt fur Veterinarmedizin --- (1977) 24 A (10) 817-826.

- 10.- H. J. P. Geurt., R.A. Oterwoud, J. Sol, Effect of -- various preparations of iron on the growth and haemoglobin levels of newborn piglets. (1979) 104(3) 124-127.
- 11.- H. Schmitz., E. Schaub, A. Muller. Intramuscular --- iron the rapy (in piglets) (1976) 118 (10) 441- - 479.
- 12.- Kolb Gurtler. Fisiología Veterinaria, Zaragoza (España) Editorial Acribia. Año de 1976, Págs. 148-150.
- 13.- K. Rudolphi.: A. Pfau Model experiments on oral iron supplements for unweaned piglets. (1979) 50 (3) -- 227-233.
- 14.- Leeg Luna, H. T. (ASCP) Manual of Histologic Staining Methods of the Armand Forces, Institute of Pathology; Third Edition Chief Histopathology, the Blakiston Division. Mc. Graw-Hill Book. Company New York Toronto' London Sydney, Año de 1978.
- 15.- Meyer Jones, Farmacología y Terapéutica Veterinaria -

Ames Lawa, E. U. A. Derechos Reservados 1980, Editorial Uthea Año de 1980, Págs. 329.

- 16.- Pond W. G.; Maner J. H., Producción de Cerdos en Climas Templados y Tropicales, Zaragoza (España) Editorial Acribia Año de 1979. Págs. 416-418-184.
- 17.- Sladic Simic D.: M. Cvetkovic. Iron resorption and iron stores in piglets after intramuscular injection of Fe - iron dextran (1978) 25 A (8) 680-683.
- 18.- R.D. Lillic And Harold M. Fullmer. Histopathologic - Tenchnic And Practical Histochemisstry.