

LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE FLUOROSIS POR INGESTIÓN DE NaF EN HUESOS DE CORDEROS

SEMIQUANTITATIVE EVALUATION OF FLUOROSIS IN LAMB BONES BY FLUORESCENCE MICROSCOPY

Chaso, M.A.¹, D. Patón² y R. Pascual¹

¹Unidad de Nutrición Animal. Departamento de Zootecnia. Facultad de Veterinaria. Avda. de la Universidad s/n. 10071 Cáceres. España.

²Unidad de Producción Animal. Departamento de Zootecnia. Facultad de Veterinaria. Avda. de la Universidad s/n. 10071 Cáceres. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Flúor. NaF. Huesos. Cordero. Eosina Y.

ADDITIONAL KEYWORDS

Fluoride. NaF. Bones. Lamb. Eosine Y.

RESUMEN

Se propone el uso generalizado de la técnica de tinción de la hematoxilina-eosina bajo fluorescencia para determinar el daño relativo por fluorosis dietaria en tejido óseo. Los resultados muestran una intensa vacuolización del tejido óseo y una elevada fluorescencia verde-amarilla en el tratamiento con NaF. La fluorescencia es más intensa en los tejidos esponjosos (vértebra) que en los largos (fémur) y aumenta a lo largo del periodo de tratamiento de 8 meses. Este efecto es concordante con la teoría de que el flúor disminuye la polaridad del tejido óseo. La metodología propuesta es un método rápido y sencillo de analizar el efecto *in situ* de la fluorosis. Este factor podrá ser usado en nuevas investigaciones en las que se teste un mayor intervalo de tratamientos para un mayor número de tejidos.

SUMMARY

The stain procedure of haematoxylin-eosin in fluorescence microscopy is proposed for the

determination of relative tissue damage by dietary fluorosis. Results show a high yellow-green fluorescence in the NaF treatment associated to a high vacuolization of tissue. This fluorescence is greater in the vertebra than in femur and increase along the 8 months of treatment. These results are concordant with the theory of reduction of tissue polarity produced by fluoride. The proposed methodology permit to analyze the *in situ* effect of fluorosis in new researches that use a wider interval of fluoride concentration for a higher number of tissues.

INTRODUCCIÓN

El flúor es el decimotercer elemento mineral esencial y el segundo elemento traza más abundante después del hierro (Underwood, 1983). Los fluoruros (forma iónica del flúor) son los halógenos más negativos de la tabla

periódica, formando con el hidrógeno ácidos débiles. El HF es el tercer contaminante aéreo más importante después de los óxidos de nitrógeno y azufre, absorbiéndose por los pulmones, estómago e intestino.

El flúor actúa como componente estructural de huesos y dientes (Underwood, 1983) y forma cristales de fluorapatita que son menos solubles en medio ácido que los de hidroxiapatita. De este modo, se reduce la aparición de caries dental y maloclusiones. Asimismo, el flúor inhibe las enzimas bacterianas productoras de los ácidos que atacan el esmalte (Brudevold, 1966; Cartón *et al.*, 1985).

Las intoxicaciones por flúor (fluorosis) pueden producirse por el elevado contenido en flúor de ciertos tipos de agua (hasta 5 mg/l) y suelos, los fosfatos de roca usados en alimentación (1-4 p.100) y la contaminación industrial. Ciertas plantas como las del género *Dichapetalum* son tóxicas para el ganado por sus altos contenidos en flúor. Los peces marinos presentan un contenido elevado de flúor con valores entre 6 a 27 mg/kg. La amplia variabilidad poblacional en la susceptibilidad a la fluorosis se debe a diferentes respuestas metabólicas, con base genética, del equilibrio ácido-base y del pH de la orina (Whitford, 1989). Los animales más sensibles a la fluorosis son los ovinos y caprinos, mientras que son escasas las intoxicaciones en aves.

El exceso de flúor se elimina por la orina y se acumula en huesos hasta porcentajes de saturación entre 15.000 a 20.000 mg/kg. Pasado el punto de saturación, el flúor pasa a los tejidos blandos alterando el metabolismo y causando la muerte por anorexia. La

fluorosis produce dos alteraciones enzimáticas principales: una es incrementar la actividad de la fosfatasa alcalina y la otra inhibir la glucosa 6P deshidrogenasa con lo que se altera el metabolismo de los hidratos de carbono. El exceso de flúor causa un reemplazamiento del carbonato del hueso aumentando la concentración relativa de magnesio. Este efecto es mayor en los huesos esponjosos, los cuales se blanquean, se vacuolizan, se vuelven quebradizos, aumentan su periostio y disminuyen su endostio. La fluorosis causa una alteración de los cristales de hidroxiapatita que pasan de 528.921 Å en corderos control a 524.084 Å en animales que ingieren 100 mg/kg de flúor (Jokl y Skinner, 1973). Se cree que el flúor produce una sustitución del ion hidroxilo, lo que explicaría la disminución del tamaño de los cristales de hidroxiapatita, no alterándose sin embargo la relación Ca/P (Neumam y Neumam, 1958; Weidmann *et al.*, 1959; Zipkin *et al.*, 1960). Diferentes estudios muestran que la forma no iónica del flúor (HF) es la que se moviliza en el transporte de membranas desplazándose siempre hacia las zonas de mayor basicidad (Whitford, 1989).

Por su dificultad de absorción, los vegetales presentan bajos contenidos en flúor. No obstante, puede incrementarse por contaminación industrial hasta niveles de 240 mg/kg (Boese *et al.*, 1995). Los pastizales presentan 5,3 mg/kg (Allcroft *et al.*, 1965), 3,6 mg/kg los heno de alfalfa (Suttie, 1969) y entre 1-3 mg/kg los subproductos de cereales (McClure, 1949). Los piensos comerciales pueden llegar a 200 mg/kg (Suttie, 1969), si bien los fosfatos de

roca desfluorinados presentes en ellos no causan fluorosis (Suttie, 1978). Los huesos son los tejidos que acumulan más flúor (hasta el 99 p.100 del existente en el cuerpo) en corderos (Chaso, 1990).

La absorción de flúor varía según la fuente de la que procede. Es total en el NaF y más lenta en compuestos menos solubles como la harina de carne, CaF_2 , criolita (Na_3AlF_6) y sepiolita (Chaso, 1991).

La microscopía de fluorescencia se ha venido empleando en tejido óseo con el objetivo de determinar su desarrollo (Pilipili *et al.*, 1995). La eosina Y (C.I. 45380; índice de color del colorante; ver Rowe, 1963) es un colorante aniónico perteneciente al grupo de los hidroxixantenos caracterizado por su fuerte fluorescencia (Gurr, 1971; Lillie, 1977; Armas-Portela y Stockert, 1979; Espada *et al.*, 1993). La eosina Y es usada principalmente como contra-tinción en la técnica de hematoxilina-eosina y mucho menos como fluorocromo (Horobin, 1982). No obstante, como fluorocromo ha sido utilizada en la microfluorimetría de las histonas (Fu y Bloch, 1975), como marcador covalente en estudios de fluorescencia (Eshaghpour *et al.*, 1979; Waggoner, 1986), para visualizar mitocondrias (Rashid y Horobin, 1991) o para localizar tubulinas en células en división (Espada *et al.*, 1993). La eosina Y muestra afinidad por sustratos básicos con los que se une electrostáticamente (Bradbeer *et al.*, 1994) y secundariamente tiene una afinidad hidrofóbica (Horobin, 1982), incrementando su fluorescencia en solventes orgánicos (Seliger y McElroy, 1965). La fluorescencia de la eosina fluctúa según su

concentración. Así para una excitación azul-violeta (436 nm) y a baja concentración su fluorescencia es verde (Espada *et al.*, 1993). A más alta concentración su fluorescencia es verde-brillante, amarilla o incluso roja. La observación de la eosina Y presenta como ventajas el permitir una rápida caracterización de la estructura del tejido, determinar áreas acidófilas y observar las preparaciones durante mucho tiempo debido al bajo nivel de fadeo que presenta. La tinción de hematoxilina-eosina garantiza la eliminación de la autofluorescencia del tejido (Burns y Whitehead, 1966). Aunque el flúor puede absorber fotones fluorescentes (Boese *et al.*, 1995), a concentraciones altas de eosina este efecto es imperceptible. En el presente trabajo abordamos, mediante técnicas histoquímicas de fluorescencia, el daño relativo que se produce en huesos de cordero por fluorosis debida a la adición de NaF a la dieta. Nuestro principal objetivo es proponer una metodología de tinción rápida que permita evaluar el grado relativo de fluorosis. La técnica es especialmente útil en huesos, ya que son los tejidos en los que más se acumula el flúor. Adicionalmente, resulta importante poder determinar si la técnica semicuantitativa propuesta permite diferenciar entre niveles relativos de fluorosis no solo entre huesos, sino también a lo largo del tiempo de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ALIMENTACIÓN

Se utilizaron 36 corderos machos

destetados de raza Merina, separados aleatoriamente en dos lotes homogéneos y alojados individualmente.

Como ración diaria recibieron un concentrado comercial, así como paja de cereal, ambos *ad libitum*. Los ingredientes y composición química del concentrado se indicada en la **tabla I**. Los animales permanecieron 10 días en período de adaptación a la nueva dieta y medio.

LOTES EXPERIMENTALES

- Lote 1 (control): formado por 18 animales con un peso medio de $15,39 \pm 0,32$ kg y alimentados con el concentrado base cuyo contenido de flúor fue de $37,4 \pm 1,1$ mg/kg.

- Lote 2 (NaF): formado por 18 corderos con un peso medio inicial de $15,53 \pm 0,3$ kg y alimentados con la misma dieta que el grupo control a excepción del contenido en flúor, que fue de $215,0 \pm 3,1$ mg/kg debido a la adición de un 0,044 p.100 de NaF en el concentrado.

DETERMINACIÓN DEL FLÚOR DE HUESOS

A los 2, 4 y 8 meses de tratamiento se sacrificaron 6 animales de cada lote. Se obtuvieron muestras de hueso esponjoso (2ª vertebra cervical) y de hueso compacto (sección de la diáfisis femoral). Las muestras fueron calcinadas a 500°C durante 8 horas. A 200 mg de cenizas se añadieron 10 ml de CIH 1 N en agitación durante 30 min neutralizando a continuación con NaOH 0,5 N y enrasando a 100 ml. Posteriormente se tomaron 25 ml a los que se agregaron 2,5 ml de TISAB III.

Para la determinación del flúor se utilizó la técnica de adición de patrón (Singer y Armstrong, 1968) realizándose

Tabla I. Composición y valor nutritivo del pienso comercial utilizado en la alimentación de los corderos. (Composition and nutritive value of commercial fodder used in feeding of lambs).

Ingredientes p.100		Composición p.100	
maíz	5,0	materia seca	88,00
cebada caballar	75,2	proteína	13,30
salvado de trigo	6,3	grasa bruta	4,10
girasol 37	6,0	fibra bruta	7,10
soja	5,1	azúcares totales	2,22
NaCl	0,5	cenizas	5,35
Ca ⁺⁺	1,4	Ca ⁺⁺	0,70
Ca ₂ P ₂ O ₇	0,3	P	0,56
Corrector*	0,2	UF	0,93
		F ⁻ (mg/kg)	37,40

*dohyfral ovino

se una recta de calibración con patrones de 100, 10, 1 y 0,1 mg/kg de F⁻ mediante un electrodo de referencia de doble puente salino (Orion 96-09) y uno selectivo de flúor (Orion 94-09) conectados a un potenciómetro digital (Crison 2002) con compensador automático de temperatura. Para el cálculo de la concentración de flúor se aplicó la fórmula siguiente:

$$C_m = C_p * e / (1 + e) * 10^{(\Delta E / S) - 1}$$

C_m= concentración de la disolución (mg/kg de flúor).

C_p= concentración del patrón añadido (mg/kg).

ΔE= incremento de potencial.

S= pendiente de la recta de calibración.

e= volumen patrón añadido/volumen de muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los contenidos de flúor tanto en vértebra como en fémur fueron so-

MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA PARA DETERMINACIÓN DE LA FLUOROSIS

metidos a análisis de la varianza de una vía (ANOVA).

PREPARACIONES HISTOLÓGICAS

Seis muestras de vértebras y fémur de cada grupo (control y NaF) y edad (2, 4 y 8 meses) fueron obtenidas y fijadas en un proceso SHANDON-Duplex durante 24 horas. Cada pieza de tejido fue lavada en agua corriente, deshidratada en etanol de 70, 96 y absoluto, limpiada en xileno y embebida en parafina (Panreac, Barcelona, Spain). Fueron obtenidas secciones de 5 mm usando un microtomo MEDIM, DDM System. Las preparaciones fueron teñidas en hematoxilina de Mayer durante 5 minutos, lavadas en agua corriente y contrateñidas en una solución acuosa al 0,5 p.100 de eosina Y (Aldrich, lot 6045379, Aldrich, Stein-

heim/Albuch, Germany). Las preparaciones fueron montadas en Merckglas (Merck) y observadas bajo campo claro y epifluorescencia en un fotomicroscopio Zeiss Axioskop MC-80 (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipado con un filtro de excitación de luz ultravioleta (365 nm). La fluorescencia se evaluó semicuantitativamente según la siguiente escala:

- + Predomina el campo oscuro con pequeñas zonas fluorescentes.
- ++ Predominan las zonas fluorescentes en verde con grandes áreas oscuras.
- +++ Todo el hueso emite fluorescencia verde-amarilla o incluso roja.

RESULTADOS

Los niveles de flúor en hueso esponjoso (vértebra) y hueso compacto (fémur) mostraron un marcado incremento, tanto a lo largo del tiempo de tratamiento como por efecto del contenido en flúor de la dieta (**tabla II**). Las diferencias entre el grupo control y el grupo que ingiere NaF fueron significativas, siendo en este lote mucho más elevados los depósitos de flúor en ambos tipos de hueso (**tabla II**).

Bajo excitación con luz ultravioleta (365 nm) las secciones de fémures y vértebras de animales tratados con NaF mostraron una intensa fluorescencia verde-amarilla debida a la eosina Y (**figura 1A y 1C**). Esta fluorescencia no es autofluorescencia, ya que la tinción de hematoxilina-eosina tiene la propiedad de eliminarla. La fluorescencia aumentó con respecto a la edad de los animales tanto en el grupo con-

Tabla II. Valores medios \pm desviación estándar de flúor (ppm) en vértebra y fémur de corderos en función de su concentración en la dieta y de los meses de tratamiento (n=6). (Average \pm standard deviation of fluoride (ppm) in vertebra and femur of lambs as function of diet level and month of treatment (n=6)).

Meses	Control	NaF	p
Vértebra			
2	167,47 \pm 7,71	1783,92 \pm 128,88	***
4	245,36 \pm 9,92	3568,03 \pm 142,31	***
8	251,34 \pm 18,53	4138,84 \pm 179,45	***
Fémur			
2	142,34 \pm 7,47	1438,91 \pm 138,64	***
4	243,26 \pm 7,52	3481,52 \pm 82,72	***
8	248,61 \pm 17,71	4048,83 \pm 168,59	***

***p-valor (p) del ANOVA < 0,001

Tabla III. Evaluación semicuantitativa de la fluorescencia de la eosina Y bajo excitación azul-violeta en huesos de corderos en función de la concentración de F⁻ en la dieta y de los meses de tratamiento (n=6). (Semi-quantitative evaluation of eosin Y fluorescence under violet-blue light excitation in the two bones observed for control and NaF groups. Are shown the changes in three different times of treatment: 2, 4 and 8 months (n=6)).

	Meses	Control	NaF
Vértebra	2	-	+
	4	+	+++
	8	+	+++
Fémur	2	-	+
	4	-	+
	8	-	++

trol como en el grupo de NaF, si bien la fluorescencia en el grupo control fue menor para todos los casos.

La metacromasia tanto en amarillo como incluso en rojo, fue observada en las muestras de 8 meses. Las preparaciones de fémur de los corderos sacrificados a los 8 meses de tratamiento con NaF (**figura 1A**) mostraron una matriz muy vacuolizada en la que destacan por su intensa fluorescencia las cavidades donde se alojan los osteocitos y los canales de comunicación entre ellos.

El grupo control no mostró fluorescencia en ningún caso (**tabla III**). Las vértebras fueron las estructuras que mostraron más fluorescencia en el tratamiento con NaF (**figura 1C** y **tabla III**) y escasa fluorescencia en el grupo control de 4 y 8 meses (**figura 1B** y **tabla III**).

DISCUSIÓN

La elevada concentración de flúor plasmático (**tabla IV**), como consecuencia de la alta biodisponibilidad del ion (Chaso *et al.*, 1991) en los animales que ingerían NaF, provocó una importante deposición en tejidos calcificados mostrando, además, cierta preferencia por el hueso esponjoso frente al compacto, de acuerdo con diferentes autores (Whitford *et al.*, 1979, 1980; Armstrong y Singer, 1980). La técnica semicuantitativa propuesta es no obstante, lo suficientemente precisa como para poder determinar diferencias por el tipo de hueso.

Como posibilidad para posteriores trabajos en la misma línea, podría construirse una ecuación de regresión que permitiera determinar el grado de flúor en diferentes tejidos en base al nivel de fluorescencia del tejido, esta vez evaluada cuantitativamente por espectrofluorimetría. Los resultados semicuantitativos parecen indicar una lige-

Tabla IV. Valores medios \pm desviación estándar de flúor en plasma (ng/ml) en función de su concentración en la dieta y de los meses de tratamiento (n=6). (Average \pm standard deviation of plasma fluoride levels (mg/ml) as function of diet level and month of treatment (n=6)).

Meses	Control	NaF	p
2	0,39 \pm 0,03	0,80 \pm 0,04	***
4	0,41 \pm 0,01	0,93 \pm 0,04	***
8	0,42 \pm 0,03	1,02 \pm 0,04	***

***p-valor (p) del ANOVA < 0,001

ra subida de la fluorescencia a lo largo de los meses de tratamiento que quizá pueda deberse a un simple efecto acumulativo del daño por fluorosis. Incluso en el grupo control se aprecia una ligera fluorescencia que podría ser provocada por un nivel basal de flúor difícil de eliminar. No obstante, sólo evaluaciones más precisas por fluorimetría permitirían contrastar estadísticamente este efecto por la edad de tratamiento.

Aparte de las consideraciones sobre el daño al tejido, resulta interesante discutir la metodología histológica empleada. Es evidente, que la técnica de la hematoxilina-eosina no cuantifica el contenido en flúor del hueso, pero sí sirve para evaluar por fluorescencia el deterioro causado por éste. Sabemos que el flúor tiene la propiedad de sustituir radicales OH de la hidroxiapatita por lo que es evidente que reduce la polaridad del tejido. Como la eosina Y muestra dos tipos de uniones, una electrostática a sustratos básicos y otra hidrofóbica, podemos concluir que el incremento en la apolaridad del tejido (por disminución de radicales OH) tiene como efecto un incremento de los niveles de eosina Y que son fijados en hueso.

Por ello, consideramos que la técnica empleada es un método indirecto y semicuantitativo de determinar los cambios en la polaridad del tejido, que junto a consideraciones de otro tipo, como nivel de vacuolizaciones, puede ser usada en la cuantificación rápida y barata de los daños por fluorosis. No obstante, no descartamos que la mayor apolaridad del tejido no pueda ser también provocada por otras sustancias, por lo que la técnica propuesta al ser

Figura 1. Fluorescencia por la eosina Y en preparaciones de 8 meses de fémur de un animal tratado con NaF (A), una vértebra del grupo control (B) y una vértebra de un animal tratado con NaF (C). (Eosin Y fluorescence in histological samples of animals of 8 months for fémur with NaF (A), vertebra of control group (B) and vertebra of NaF treatment).

indirecta no puede sustituir, aunque si complementar, a determinaciones específicas del nivel de flúor realizadas por otros medios.

CONCLUSIONES

1.- La metodología descrita, rápida y sencilla, de tinción con hematoxilina-eosina puede ser usada para evaluar el daño relativo por fluorosis en tejido óseo.

2.- Esto permite la introducción de elementos histológicos de evaluación

del daño por fluorosis como por ejemplo el nivel de vacuolizaciones y no sólo referirse al nivel que alcanza el flúor en el tejido.

3.- La vacuolización y fluorescencia es mayor en el tejido óseo esponjoso, lo cual concuerda con la mayor acumulación de flúor en este.

4.- Las propiedades histológicas de la eosina Y, especialmente su afinidad hidrofóbica, son concordantes con los resultados obtenidos y estos con la teoría de que el flúor disminuye la polaridad del tejido por reducción del número de radicales -OH.

BIBLIOGRAFÍA

- Allcroft, R., K.N. Burns and C.N. Hebert. 1965. Fluorosis in cattle 2. Development and alleviation experimental studies. En: *Animal Disease Surverys Report* 2(2): 58 pp. HMSO Londres.
- Armas-Portela, R. and J.C. Stockert . 1979. Chromatin fluorescence by pyronin staining. *Experientia* 35: 1663-1664.
- Armstrong, W.D. and L. Singer. 1980. Fluoride tissue distribution: intracellular fluoride concentrations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 164: 500-504.
- Boese, S.R., D.C. MacLean and D. El-Mogazi. 1995. Effects of fluoride on chlorophyll alpha fluorescence in spinach. *Environmental Pollution* 89: 203-208.
- Bradbeer, J.N., M. Riminucci and P. Bianco. 1994. Giemsa as a fluorescent stain for mineralized bone. *J. Hist. Cytoch.* 42: 677-680.
- Brudevold, F. 1966. The role of fluorides in tooth chemistry and in prevention of dental caries. Springer Verlag 20: 173-220.
- Burns, J. and R. Whitehead. 1966. Staining of Paneth cells with thioflavine T. *Nature* 221: 769-771.
- Cartón, B., A. Casado, J.L. Hernando y C. Fernández. 1985. Flúor en las aguas de consumo de la provincia de Guipúzcoa. *Rev. San. Hig. Pub.* 59: 1415-1428.
- Chaso, M.A. 1990. Efectos del flúor en la alimentación de corderos. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Chaso, M.A., R. Pascual, J.A. Madrid and G.M. Salido. 1991. Bioavailability of fluoride from dietary sepiolite in the lamb. *Ann. Res. Vet.* 22: 71-75.
- Eshaghpour, H., D. Söll and D.M. Crothers. 1979. Specific chemical labeling of DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 7: 1485-1495.
- Espada, J. P. Valverde and J.C. Stockert. 1993.

MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA PARA DETERMINACIÓN DE LA FLUOROSIS

- Selective fluorescence of eosinophilic structures in grasshopper and mammalian testis with haematoxylin-eosin. *Histochemistry*, 99: 385-390.
- Fu, C.T. and D.P. Bloch. 1975. A method for the flow-microfluorometric analysis of histones. *Exp. Cell Res.* 93: 363-367.
- Gurr, E. 1971. Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. Academic Press, Londres. Nueva York.
- Horobin, R.W. 1982. Histochemistry. Gustav Fischer, Stuttgart. New York. USA.
- Jokl, P. and H.C. Skinner. 1973. Fluoride induced changes in ashed bone mineral of growing sheep. *Journal of Bone and Joint Surgery* 55a: 761-770.
- Lillie, R.D. 1977. H.J. Conn's biological stains, 9ª ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- McClure, F.J. 1949. Fluoride in foods: survey of recent data. *Public Health Reports* 64: 1061-1074.
- Neumam, W.F. and M.W. Neumam. 1958. The chemical dynamics of bone mineral. Ed. University of Chicago Press. Chicago.
- Pilipili, C.M., C. Nyssen-Behets and A. Dhem. 1995. Microradiography and fluorescence microscopy of bone remodeling on the basal crypt of permanent mandibular premolars in dogs during eruption. *Connect Tissue Res.* 32: 171-81.
- Rashid, F. and R.W. Horobin. 1991. Accumulation of fluorescent non-cationic probes in mitochondria of cultured cells: observations, a proposed mechanism and some implications. *J. Microsc.* 163: 233-241.
- Rowe, F.M. 1963. Colour index, 2ª ed. Bradford, England; Society of Dyers and Colourists. Lowell, Massachusetts.
- Seliger, H.H. and W.D. McElroy. 1965. Light: physical and biological action. Academic Press, New York, London.
- Singer, L. and W.D. Armstrong. 1968. Determination of fluoride in bone with the fluoride electrode. *Anal. Chem.* 40: 613-615.
- Suttie, J.W. 1969. Fluoride content of commercial dairy concentrates and alfalfa forage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17: 1350-1352.
- Suttie, J.W. 1978. Effects of fluoride on animals. En: First International Minerals Conference. St. Petersburg, Florida 87 pp. Illinois, International Minerals and Chemical Corporation.
- Underwood, E.J. 1983. Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª edición. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Waggoner, A.S. 1986. Fluorescent probes for analysis of cell structure, function and health by flow and imaging cytometry. En: Applications of fluorescence in the biomedical sciences (eds. Taylor, D.L., A.S. Waggoner, F. Lanni, R.F. Murphy and R.R. Birge). Liss, New York, 3-28.
- Weidmann, S.M., J.A. Weatherell and R.G. Whitehead. 1959. The effect of fluorine on the chemical composition and calcification of bone. *J. Path. Bact.* 78: 435-445.
- Whitford, G.M. 1989. The metabolism and toxicity of fluoride. Ed. Karger, Suiza.
- Whitford, G.M., D.H. Pashley and K.E. Reynolds. 1979. Fluoride tissue distribution: short-term kinetics. *Am. J. Physiol.* 236: 141-148.

CHASO, PATÓN Y PASCUAL

Whitford, G.M., R.S. Callan and D.E. Pearson.
1980. Radiofluoride distribution in rat lung,
colon and heart. *J. Dent. Res.* 59: 1171-
1175.

Zipkin, I., F.J. McClure and W.A. Lee. 1960.
Relation of the fluoride content of human
bone to its chemical composition. *Arch. Oral.
Biol.* 2: 190-195.

Recibido:14-10-97. Aceptado:31-3-98.

Archivos de zootecnia vol. 47, núm. 180, p. 638.