

ALTOS NIVELES DE MANGANESO EN LA DIETA DE RATAS (*Rattus norvegicus albinicus*). I. EFECTO SOBRE LA REPRODUCCION¹

Ramón Corella Vargas²

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

RESUMEN

El presente ensayo se llevó a cabo para obtener mayor información respecto a la ingesta de dietas con altos niveles de manganeso. El objetivo fue estudiar los efectos tóxicos que este último ejerce en la producción animal, simulando los niveles encontrados en condiciones de campo.

Este trabajo es una investigación a nivel de laboratorio, preliminar y sistemática, efectuada con ratas y sus crías. Estas consumieron dietas con un nivel base de 50 ppm (0.91 mM) de Mn, más 0, 500 y 1,000 ppm de Mn (en base a materia seca) en cada tratamiento del experimento, con una duración de 7.5 meses, tiempo en el que ya se notan los efectos tóxicos del manganeso.

Se constató una falla en el comportamiento reproductivo, así como en el crecimiento del neonato y su supervivencia. Ello se reflejó en los estudios histológicos de las alteraciones epiteliales, folículos atrésicos y persistencia del cuerpo lúteo, lo que indica disfunción gonadal.

INTRODUCCION

No se han logrado esclarecer los mecanismos por los que el manganeso afecta la función reproductora. Wilson (1) usó el $MnSO_4$ como terapia para la infertilidad funcional de los bovinos (*Bos taurus*). Egan (2) encontró una respuesta positiva en el comportamiento reproductivo de ovejas suplementadas con Zn^{++} y/o Mn^{++} . Por su parte, Grace (3) observó, en áreas con más de 7.25 mM (400 ppm) de Mn en pastos en Nueva Zelanda,

Manuscrito modificado recibido: 23-5-84.

1 Este trabajo representa parte de la Tesis de Grado presentada por el Autor ante la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Costa Rica.

2 Sección de Bioquímica, Universidad Nacional, Apartado 86, 3000 Heredia, República de Costa Rica.

que el comportamiento reproductivo y las ganancias de peso eran inferiores a los obtenidos por ovinos en pasturas con bajos niveles de Mn.

En Costa Rica varios autores han señalado los altos niveles de Mn en los forrajes. Así, de Alba y Davis (4) y Lang (5) notifican niveles hasta de 55.9 mM (3,072 ppm) de Mn en pastos del género *Paspalum* en el valle de Orosí. Ello incide en el por ciento de parición anual de 58 y 64%, comparado con el de la lechería control, cuyo contenido de Mn es normal en sus pasturas, donde la parición fue de 90%. Además Lang (5), también señaló que se requieren más servicios por parto. Otro investigador, Amadeo (6), manifiesta que el hato lechero de Orosí "... mostró desde su inicio serios problemas en la reproducción por alto grado de infertilidad y nacimientos prematuros"; en los forrajes de su estudio el Mn osciló entre 2.37 y 3.82 mM (130 y 210 ppm). En nuestro país hay varias localidades donde el Mn en los pastos excede de 3.64 mM (200 ppm) en materia seca (datos no publicados del autor). Según el Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos (NRC) (7), los requerimientos son de 0.72 mM (40 ppm) de Mn en base a materia seca (M. S.).

Utilizando el modelo experimental de la rata, se realizó un estudio preliminar y sistemático tendiente a esclarecer el efecto de los altos niveles de Mn en la dieta de los animales de importancia económica.

MATERIAL Y METODOS

Animales de Experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en el bioterio de la Escuela de Zootecnia y el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizaron ratas blancas (*Rattus norvegicus albicus*) de una cepa local. Los animales se mantuvieron alojados en cajas de fibra de vidrio cubiertas con una tapa de malla metálica, y con granza de arroz como cama. Recibieron alimentación *ad libitum* con la dieta semisintética cuyos ingredientes se detallan en la Tabla 1⁴. En los casos en que se indica más adelante, a dicha dieta base (contiene 0.91 mM 49.4 ppm de Mn según análisis por absorción atómica), se le agregó óxido de manganeso II en niveles variables.

En los estudios sobre reproducción se usaron 36 hembras y 12 machos al destete (tres semanas). Estos fueron elegidos al azar y tenían un peso promedio de 39 g, alimentándose con dietas a las que se les agregó 9.1 y 18.2 mM (500 y 1,000 ppm) de Mn. A las seis semanas se aparearon durante siete días utilizando un macho por cada tres hembras. A las tres semanas después de la parición se destetaron las crías, y luego de una semana de descanso, los padres fueron apareados nuevamente. De la misma manera se repitió un último y tercer apareamiento. Las hembras y los

4 Como comederos se usaron frascos de vidrio colocados en el interior de cada jaula. El consumo de alimento no se estimó con exactitud, ya que las partículas de alimento dispersadas por la jaula fueron muchas. Sólo se notó si había o no un rechazo diario de alimento.

TABLA 1

COMPOSICION DE LA DIETA EMPLEADA EN LA ALIMENTACION DE LAS RATAS

Ingredientes	Contenido en base seca, 0/0
Harina de soya	30.00
Maíz molido (amarillo)	40.00
Acemite de trigo	17.50
Harina de pescado	5.00
Vitaminas y minerales*	0.25
Sal	0.20
CaCO ₃	1.00
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.00
DL-Metionina	0.13

* La fuente de vitaminas y minerales es una premezcla comercial (sal Wesson) de Withmoer (Phil., USA) que, en términos de 0/0 contiene los siguientes minerales: Ca, 0.49; P, 0.36; K, 0.53; Na, 0.15; Cl, 0.42; Mg, 0.06; Fe, 0.0129; Mn, 0.00025; I, 0.00014, y Cu, 0.00034. El contenido vitamínico es: vit. A, 10×10^6 U.I.; vit. C, 0.20/0; biotina, 0.0010/0; pantotenato de Ca, 0.020/0; colina, 20/0; ácido fólico, 0.0040/0; niacina, 0.10/0; piridoxina, 0.0060/0; riboflavina, 0.160/0; tiamina, 0.0250/0; vit. E, 0.020/0 y vit. D, 6×10^5 U.I. El contenido de proteína cruda de la dieta era de 22.5 (Kjeldahl). El análisis de los principales oligoelementos en la dieta se hizo por un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin - Elmer 303) y arrojó los siguientes valores: Mn, 49.4 ppm; Fe, 2.67 mM (151.2 ppm); Zn, 0.85 mM (55.2 ppm), y Cu, 0.14 mM (8.9 ppm).

machos, al igual que las crías, fueron pesados semanalmente durante los 255 días de experimentación, en el que también se llevó un control del número de crías y su sobrevivencia, como estimación de la respuesta reproductiva a los excesos de MnO en la dieta de ratas. Estas, por un lado se aparearon por tres veces consecutivas; por el otro lado, se utilizó la última descendencia y se apareó para ver si había algún efecto acumulativo (madre-hija) en la respuesta reproductiva, estimado como el 0/0 de parición de cada grupo.

Para los estudios histológicos sobre reproducción se obtuvo gónadas de machos y hembras de animales en varias fases del experimento. Este material se fijó en un amortiguador de formol-fosfato, y luego se tiñó con hematoxilina-eosina.

La energía metabolizable promedio era de 3.7 Kcal/kg. Los nutrientes se ajustan a las recomendaciones del NRC (Nutrient Req. of Lab. Animals, 1975). La ración se preparó moliendo el concentrado (Molino Standard, Model No. 3, Wiley Mill) con una cifra de 1 mm; luego se agregó el MnO (Mn 620/0) en las concentraciones indicadas en cada caso, pesando el elemento en una balanza analítica eléctrica (Mettler H 315) con exactitud de 0.1 mg. A efectos de una mejor homogenización, se preparó 1 kg de alimento cada vez.

En cuanto a las pruebas de significación estadística que se practicó a los valores medios, éstos fueron analizados con el criterio de la prueba "t" de Student. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los porcentajes de pariciones correspondientes a los tres apareamientos del lote de 36 hembras cuyas dietas fueron suplementadas con 0.91 y 18.2 mM (0, 500 y 1,000 ppm) de Mn se muestran en la Figura 1. También se indican los resultados obtenidos con los animales nacidos del tercer apareamiento de las 36 ratas.

El primer apareamiento se efectuó tres semanas después de iniciarse la suplementación con Mn y el porcentaje de parición no acusó diferencia entre los tres lotes de animales. Las pariciones correspondientes al segundo apareamiento de los animales con dietas suplementadas con 9.1 mM (500 ppm) fueron a niveles del 41.70/o, y las de 18.2 mM (1,000 ppm) al 750/o, y en los controles, del 90.90/o. En el tercero y último apareamiento, los controles mantuvieron un porcentaje de pariciones de 90.90/o, mientras que en los mantenidos en los niveles 9.1 y 18.2 mM (500 y 1,000 ppm), los porcentajes fueron de 66.7 y 75, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados de los tres apareamientos reveló un efecto negativo del nivel de 9.1 mM (550 ppm) de Mn sobre el porcentaje de pariciones, con un nivel de probabilidad de 950/o.

El porcentaje de pariciones del cruzamiento de las crías del último apareamiento, resultó notoriamente más bajo en los animales con la dieta suplementada con Mn. En este grupo, la parición fue de 33.30/o, mientras que en los controles fue de 83.30/o. Dichas diferencias son significativas, con un nivel de probabilidad de 950/o.

Los días transcurridos entre el inicio de los apareamientos y la parición en el grupo de 36 ratas, tendió a ser mayor en los animales tratados con Mn. Al respecto es dable apreciar esa tendencia indicativa de un mayor lapso entre el apareamiento y la concepción en los animales con dietas suplementadas con Mn. En el primer apareamiento las diferencias entre los controles y los otros grupos fueron significativas. Asimismo, se notó cierta tendencia al mayor lapso entre el servicio y la concepción en los animales cuya dieta contenía altos niveles de Mn, aunque los datos no son muy consistentes, ya que arrojan valores promedio de 24.5, 26.2 y 27.2 días, respectivamente, para los niveles de 0, 500 y 1,000 ppm de Mn. De lo expuesto se deduce que se necesitan más servicios por concepción, aun cuando la falla puede ser tanto de los machos como de las hembras, o de ambos. Según Suzuki *et al.* (9) con la toxicidad crónica de Mn, el deseo sexual decrece. También Lang (5) en sus estudios con vacas que consumían pasto con un alto contenido de Mn, encontró un mayor número de servicios por parto y, consecuentemente, un mayor intervalo entre partos. Según datos del muestreo actual de minerales, los pastos donde Lang trabajó contienen de 4.33 a 12.34 mM (238 a 678 ppm) (Escuela de Zootecnia, Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica, 1978).

La Figura 1 pone de manifiesto el notorio efecto que el Mn ejerce sobre la función reproductora de las ratas. En el primer parto no hubo diferencias, lo cual se atribuye al poco tiempo de exposición al Mn en la

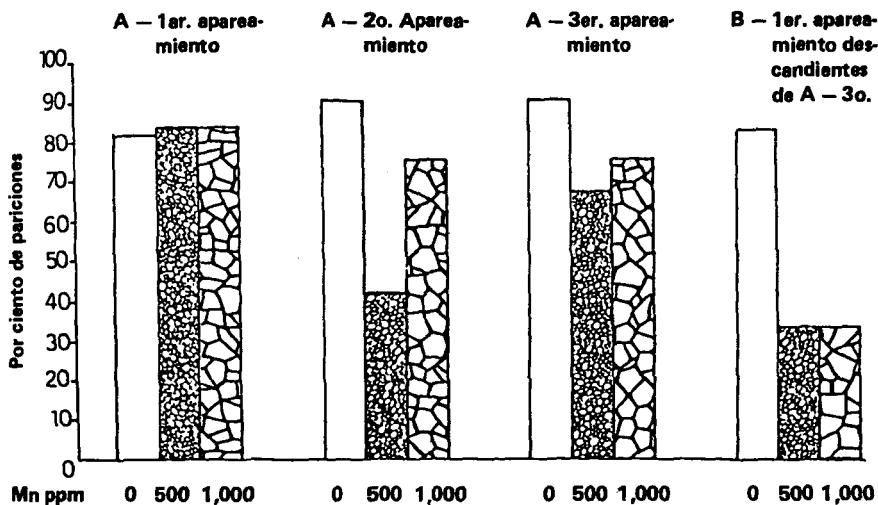


FIGURA 1

Efecto de distintos niveles de Mn suministrados en la dieta sobre el porcentaje de pariciones, en tres apareamientos sucesivos del lote de animales A (12 por tratamiento) y en el apareamiento de animales (B) descendientes del apareamiento A-3 (seis animales por tratamiento)

dieta (tres semanas) además de que provienen de ratas sin tratamientos. La poca uniformidad en las observaciones de Mn en animales consiste en el corto tiempo de exposición, la forma y administración del Mn, además de la procedencia del animal (de una madre saludable, o con toxicidad de Mn). Lo que sí fue evidente en este primer apareamiento, con diferencias altamente significativas, fue el efecto que produce en el desarrollo de las crías, el cual disminuyó conforme el nivel de Mn en la dieta ascendía. Los pesos al destete, a los 21 días, disminuyeron conforme el nivel de Mn en la dieta se incrementaba, ya que en las crías del primer apareamiento se observó un peso significativamente inferior, comparado con los animales suplementados con Mn, los que fueron 29, 33 y 36 g para 18.2, 9.1 y 0 mM (1,000, 500 y 0 ppm) de Mn, respectivamente.

Una explicación del menor peso de las crías en proporción con el Mn dietético sería el menor consumo de materia seca, lo que se comprobó en estos estudios. Además, hay que considerar una posible menor eficiencia de utilización del alimento, si es que las observaciones de Grace (3) en ovejas en pastoreo, son extrapolables a la rata.

Otra observación interesante fue la menor supervivencia de las crías y el número de nacidos por rata, aunque este efecto se hizo más notorio en las crías del tercer apareamiento, donde se observó un 33.3% de parición en ambos grupos. Se presume que el efecto tóxico del Mn es cada vez más severo en función del tiempo, con el agravante de que hay acumulación en la etapa prenatal, ya que en los controles hubo 83.3% de parición, siendo

dicha diferencia significativa al 95^o/o. En esta tercera descendencia el mayor efecto se constató en el número de nacidos por rata y en la supervivencia del neonato; este último disminuyó drásticamente al nivel de 18.2 mM (1,000 ppm) de Mn.

Hidiroglou y Shearer (10) analizan la concentración de Mn en los tejidos de ovejas con y sin estro, y encontraron el cuerpo lúteo (C.L.) con la mayor cantidad de Mn 0.0076 mM (423 ng/g de tejido fresco), notando un aumento significativo entre el 4o y 11o día (día 0 = día estro), a saber, 0.12 mM (645 ng/g de tejido fresco); ello sugiere una estrecha relación metabólica y posiblemente características funcionales entre el Mn y esta glándula endocrina. Por otro lado, Azhar y Menon (11) encontraron que la adenosina mono fosfato cíclica (c AMP) y las quinastas asociadas a la membrana del cuerpo lúteo de bovinos, presentan requerimiento absoluto de cationes divalentes, entre ellos el Mn. Es sabido que la inhibición de procesos enzimáticos ocurre con un exceso de Mn (12) y, además, que la afinidad del Mn por ciertos tejidos es proporcional a su contenido de mitocondrias como sugieren Maynard y Cotzias (13). Los cuernos uterinos y las carúnculas son también altos en cuanto a contenido de Mn, al igual que la vagina, donde hay una marcada diferencia en rumiantes con y sin estro.

Hidiroglou (14), analizó el Mn en los ovarios y el tracto reproductor de ovejas, de donde el folículo de Degraf y el C. L. toman más Mn que las demás partes del ovario. El cuerpo blanco y los folículos inmaduros fueron más bajos en la toma de Mn, contrario a los cotiledones, donde su alto contenido de Mn corrobora la proposición de ser un reservorio de Mn para el feto, como lo postula Hansard (15); se desconoce el significado biológico de tales cambios. En los cortes histológicos de los ovarios de las ratas de este experimento, se observan folículos atrésicos y cuerpos lúteos persistentes, lo que induce a pensar en inhibición de la función ovárica. La relación del Mn con las hormonas sexuales ha sido poco estudiada. Hidiroglou, Ivan y Ho (16) no hallaron interacción entre el Mn y la progesterona en el período estral. Según se ha establecido, con los estrógenos se eleva la concentración hemática del Mn, reduciéndose su excreción (17, 18).

Nelson, Jato Rodríguez y Mookerjea (19) analizaron el simergismo de las hormonas ováricas y la glicosiltransferasa donde el Mn tiene ingerencia. Al interrumpirse el equilibrio por exceso del ión es de suponer que ello ocasione problemas en la reproducción, como realmente lo detectaron. Otra observación de dichos autores fue la exigencia de Mn por enzimas del fluido amniótico y del hígado. Los efectos observados, por lo tanto, inducen a pensar en desarreglos de ovulación donde se requiere un delicado equilibrio hormonal; ya se ha mencionado la interacción entre el Mn y las hormonas. Un hallazgo que confirmaría tal aseveración sería la falta de deseo sexual que, como es sabido, se manifiesta en relación a ciertos niveles hormonales, principalmente el pico estrogénico y las pequeñas cantidades de progesterona, según establecen Stabenfeldt, Kindahl y Edqvist (20).

Otra posible causa podría ser un defecto de implantación producido por la inhibición de la biosíntesis de progesterona por iones Mn, inhibiendo el consumo de citrato y por ende su disponibilidad para génesis de prostágenos en las mitocondrias de la placenta (21).

La interacción Ca-Mn es otro factor que ayudaría a explicar la infertilidad por mala ovulación. Así, Jalabert y Szollosi (22) encontraron cierta

inhibición de la ovulación por el Mn^{++} en mamíferos, actuando sobre fenómenos Ca-dependientes por un efecto indirecto a través de $PGF_{2\alpha}$. Según se sabe, ésta actúa sobre la musculatura lisa de las células tecales que se contraen para expulsar el óvulo aunque, según parece, otros tipos de células diferentes a las musculares también se contraen con el mismo fin, recordando los folículos atrésicos y cuerpos lúteos persistentes que se observan en los ovarios de las ratas en este experimento.

El mayor intervalo entre partos informado por Lang (5), y el retraso de la parición de las ratas que encontramos en nuestro laboratorio, parecen deberse a ciclos estrales irregulares. En los animales infértiles, Stabenfeld, Kindahl y Edqvist (20) analizaron los perfiles hormonales de la ovulación y explican que los períodos prolongados de diestro que suceden en ausencia de preñez, se deben a la prolongación de la actividad del cuerpo lúteo no expulsado, el que provoca un desarreglo de la $PGF_{2\alpha}$. Este hecho comprobaría los hallazgos de Jalabert y Szollosi (22), ajeno a que explica los largos intervalos entre partos que Lang determinó (5).

Según Iman y Chandra (23) la esterilidad aparece con mucha anticipación a la encefalopatía, a los 15 días de inyectar conejos con 3.5 mg de $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ en 0.5 ml de solución salina por kg de P.V. Se observaron cambios degenerativos en algunos túbulos y no hubo evidencia de espermatogénesis. Los cambios histoquímicos aparecen mucho antes que las alteraciones morfológicas; así, con cinco días de tratamiento se inhibió la succinato deshidrogenasa de los túbulos seminíferos. Ello afecta la síntesis de energía, reduciendo el metabolismo celular a causa de la inhibición de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la NADH-diaforasa. De lo expuesto se concluye, pues, que la toxicidad temprana de Mn afecta la función germinal no obstante el corto período de 30 días, aunque no se notó inhibición de la síntesis de esteroides. La 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se notó estimulada, pero la G-6-P.D. se inhibió y, como es sabido, las dos enzimas participan en la síntesis de esteroides. Los estudios histológicos de los testículos revelaron una disminución de la espermatogénesis, y se observaron alteraciones epiteliales, lo que también sugiere que los machos son responsables en la falla reproductiva constatada en este experimento.

SUMMARY

HIGH LEVELS OF MANGANESE IN THE DIETS OF RATS (*Rattus norvegicus albinicus*). EFFECT ON REPRODUCTION

The present trial was conducted to obtain more information on the ingestion of diets containing high levels of manganese, and thus, elucidate its toxic effects on animal performance under field conditions.

This paper represents a preliminary and systematic laboratory investigation carried out in rats and their offspring. The animals were fed diets with basal Mn levels of 50 ppm (0.91 mM) plus the addition of 0, 500 and 1,000 ppm Mn (on a dry basis) for each group included in the experiment, and observing the appearance of toxic effects up to 7.5 months of treatment.

A failure in reproductive performance was noted, as well as in growth and survival of neonates. Histological studies of the testes and ovaries showed a reduction of

spermatogenesis, epithelial alterations, atresic follicles, and persistence of *corpus luteum*, indicative of a disfunction of the sexual glands.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. Néstor Marcilese y a la Dra. Renata Valsecchi, la asistencia técnica y didáctica con la que tuvieron a bien colaborar con el laboratorio. Asimismo, a la Srta. Lucía Corella y a la Sra. Ana Luisa Sánchez, por la primera y segunda labor mecanográfica del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Wilson, J. G. Bovine functional infertility in Devon and Cornwall response to Mn therapy. *Veterinary Record*, 79(20):562-566, 1966.
2. Egan, A. R. Reproductive response to supplemental zinc and manganese in grazing dorset horn ewes. *Australian J. Experimental Agr. and Animal Husbandry*, 12:131-135, 1972.
3. Grace, N. D. Effect of high dietary Mn⁺⁺ levels on the growth rate and the level of mineral elements in the plasma and soft tissues of sheep. *New Zealand J. Agricultural Research*, 16:177-180, 1973.
4. De Alba, J. & G. K. Davis. Minerales en la nutrición animal de América Latina. Turrialba, 7(1, 2):8-12, 1957.
5. Lang, C. Contenido de Mn en los Forrajes del Valle de Orosí y su Efecto sobre la Concentración en el Pelo y la Reproducción en Vacas Lecheras. Trabajo de Tesis, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 1971.
6. Amadeo, J. C. Acumulación de Mn⁺⁺ en las Partes Aéreas de Varias Especies Forrajeras y sus Posibles Implicaciones en el Consumo de éstas por los Animales. Trabajo de Tesis, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 1971.
7. National Research Council - National Academy of Sciences. *Nutrient Requirements of Domestic Animals. No. 3. Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* Washington, D. C., NRC-NAS, 1971.
8. National Research Council - National Academy of Sciences. *Nutrient Requirements of Domestic Animals. No. 10. Nutrient Requirements of Laboratory Animals.* Washington, D. C., NRC-NAS, 1972.
9. Suzuki, Y., K. Nishiyama, M. Doi, T. Hirose & H. Shibata. Studies on chronic manganese poisoning. *Tokushima J. Exper. Med.*, 7:124-130, 1960.
10. Hidiroglou, M. & D. A. Shearer. Concentration of manganese in the tissues of cycling and anestrus ewes. *Can. J. Comp. Med.*, 40(3):306-309, 1976.
11. Azhar, S. & K. M. Menon. Adenosine 3' - 5 -cyclic monophosphate dependent and plasma-membrane associated protein kinase from bovine corpus luteum. *Biochem. J.*, 151:2336, 1975.
12. Utter, M. F. The biochemistry of manganese. *Medical Clinics of North America*, 60(4):713-727, 1976.
13. Maynard, L. S. & C. G. Cotzias. The partition of Mn among organs and intracellular organelles of the rat. *J. Biol. Chem.*, 214:489-495, 1955.
14. Hidiroglou, M. Mn⁺⁺ uptake by the ovaries and reproductive tract of cycling and anestrus ewes. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 53(5):969-972, 1975.
15. Hansard, S. L. Physiological behavior of manganese in gravid cattle sheep and

- swine. In: **Isotopes Studies in the Physiology of Domestic Animals**. Vienna, 1972.
16. Hidiroglou, M., M. Ivan & S. K. Ho. Effect of human chorionic gonadotropin on the transport of Mn and Zn and tissue uptake of radioactivity following subcutaneous administration of tritiated estrone in manganese-deficient and non-deficient rabbits. *Canad. J. Comparative Med.*, 41(2):206-210, 1977.
 17. Panic, B. Mn and Fe metabolism studies in poultry and swine. In: **Mineral Studies with Isotopes in Domestic Animals**. Vienna, I. A. E. A., 1971.
 18. Cotzias, C. G. **Manganese in Mineral Metabolism**. Comar & Bronner (Eds.). Vol. 2, Part B. New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1962, p. 404-442.
 19. Nelson, J. D., J. Jato Rodríguez & S. Mookerjee. Effect of ovarian hormone on glycosyltransferase activities in the endometrium of ovariectomized rats. *Archives Biochem. Biophys.*, 169:181-191, 1975.
 20. Stabenfeldt, G. H., H. Kindahl & L. E. Edqvist. Radioisotopic techniques for the study of reproductive physiology in domestic animals. II. Physiological implications. In: **Nuclear Technics in Animal Production and Health**. Vienna, I.A.E.A., 1976.
 21. Bogulawski, W., J. Klimek, B. Tialowska & L. Zelewiske. Inhibition by Mn^{++} of citrate supported progesterone biosynthesis in mitochondrial fractions of human-term placenta. *J. Steroid Biochem.*, 1:39-44, 1976.
 22. Jalabert, B. & D. Szollosi. *In vitro* ovulation of trout oocytes: effect of prostaglandins on smooth muscle-like cells of the theca. *Prostaglandins*, 9(5):756-778, 1975.
 23. Iman, Z. & S. V. Chandra. Histochemical alterations in rabbits testes produced by $MnCl_2$. *Toxicol. and Applied. Pharmacol.*, 32:354-544, 1975.