

# EL COMPLEJO SINAPTONEMICO EN CONEJO

## CARIOTIPO MEIOTICO OBTENIDO A PARTIR DE COMPLEJOS SINAPTONEMICOS EN MICROESPARCIDOS DE ESPERMATOCITOS PAQUITENICOS

JUAN JOSE FILGUEIRA D.\*

CLAUDIA PATRICIA TINJACA E.\*

LUIS CARLOS TRUJILLO F.\*

Dr. FERNANDO PALOMINO Q. \*\*

Dr. FABIO ANDRES RODRIGUEZ C.\*\*\*

### RESUMEN

Espermatoцитos de conejo, fueron procesados mediante una técnica modificada de microesparcidos, que contribuyó a aumentar el conocimiento sobre el Complejo Sinaptonémico (CS) y la sinapsis meiótica de los cromosomas del conejo. Los núcleos paquiténicos en microesparcidos, mostraron 22 Complejos Sinaptonémicos completamente formados que permitieron clasificarlos de acuerdo a la posición del centrómero; en los 22 grupos centroméricos, se determinaron las longitudes totales de los Complejos Sinaptonémicos, así como las correspondientes longitudes de los brazos de los bivalentes, para realizar un Idiograma. Los Complejos Sinaptonémicos (CS), aparecieron con restos de membrana nuclear en sus extremos y tres bivalentes presentaron residuos del nucleolo. El proceso de microesparcido fue seguido por

microscopía óptica y se observó, como la técnica desarrollada para obtener los microesparcidos llamada "de gota pendiente" aumentó la densidad de CSs por unidad de área. Las observaciones de los microesparcidos en grillas a través del microscopio electrónico fueron corroboradas por observaciones de microesparcidos en placa, teñidos con plata, para microscopía de luz.

### INTRODUCCION

La meiosis es el tipo especial de división celular, que se encuentra en los organismos con reproducción sexual, la cual se realiza por medio de gametas, cada una de ellas con una dotación haploide de material genético; el mecanismo para producir gametas haploides es dividir consecutivamente dos veces el material hereditario, en un proceso llamado gametogénesis. Durante la primera división meiótica, hacia la profase, los cromosomas homólogos se reúnen y aparean por medio de una estructura tripartita denominada Complejo Sinaptonémico.

\* Estudiante de Biología

\*\* Instructor del Depto. de Ciencias Fisiológicas

\*\*\* Profesor asistente del Depto. de Bioquímica

Laboratorio de Microscopia, Centro de Equipos Interfacultades, Universidad Nacional de Colombia.

En el estudio de la meiosis y el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase, se han utilizado varios métodos, tales como la

observación del Complejo Sinaptonémico (CS) por microscopía de luz y electrónica (3) y la reconstrucción tridimensional de núcleos paquíténicos por medio de cortes seriados (12); sin embargo estos métodos no son prácticos en el momento de contar con biopsias de material humano (10). El estudio del CS por medio de la técnica de microesparcidos, produce resultados rápidos y ha sido también utilizada para describir cariotipos meióticos de varias especies, entre ellos el del hombre (6). El uso de Complejos Sinaptonémicos de núcleos paquíténicos para elaborar cariotipos, tiene así un gran potencial en el análisis citogenético (7).

La técnica inicialmente desarrollada por Counce y Meyer (2), ha tenido múltiples variaciones (4,6,7,8,11); básicamente, una suspensión de células paquíténicas aisladas en un medio de sostentimiento mínimo es sometida a una tensión osmótica reducida en una interfase acuosa produciéndose la ruptura de los núcleos y esparciendo su contenido sobre una base apropiada para tal fin, en un área relativamente reducida (1). Recientemente, una modificación de la técnica de microesparcidos con dodecil sulfato de sodio (DSS), que implica la solubilización diferencial de las histonas de la cromatina y la membrana nuclear adherida a los CSs (11) ha permitido una observación más clara del complejo Sinaptonémico.

Para la observación del CS en preparaciones de microesparcidos para microscopía de luz, se han descrito técnicas basadas en la tinción con plata (4), pudiéndose identificar mediante ésta la vesícula sexual y los elementos laterales asociados a ella, junto con la orientación del par XY.

De igual forma la tinción con plata para la microscopía electrónica, además de lo anterior permite la clara observación de los diversos componentes estructurales del CS.

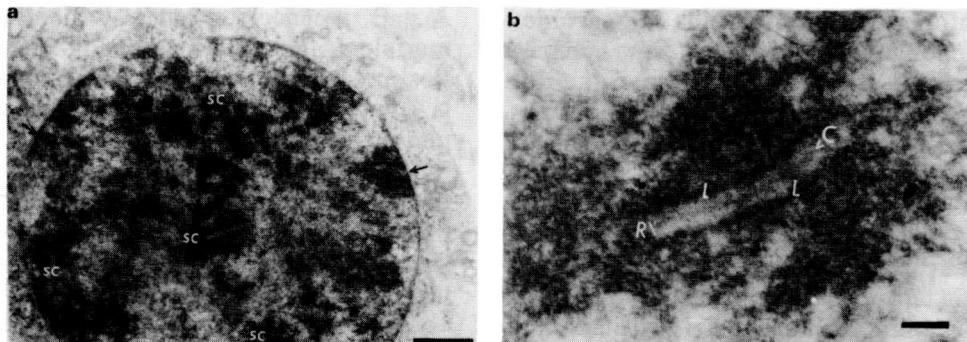
Ultraestructuralmente el Complejo Sinaptonémico en el conejo está constituido por 3 zonas así distinguibles: dos elementos laterales de 450 amstrongs de espesor, en contacto con los cromosomas homólogos: una región clara de 850 amstrongs de espesor, constituida por filamentos transversales, que parten de los elementos laterales y un elemento central electrodenso de 250 amstrongs de espesor (Fig. 1.). Los elementos laterales se encuentran asociados a la membrana nuclear (9).

El propósito de este artículo, es describir el cariotipo meiótico en microesparcidos de Complejos Sinaptonémicos de conejo, basados en una modificación de la técnica propuesta por nosotros llamada "De Gota Pendiente", que permite la obtención de esparcidos de núcleos estallados en una interfase aire-líquido, de una gota suspendida, que luego se recogen sobre una grilla para microscopía electrónica o sobre una lámina para microscopía de luz.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención de Células por el método de Moses (7).

Conejos de 6 a 8 meses de edad, fueron anestesiados con Ketamina y los testículos aislados en solución TIM (Testicular Isolation Medium) a 36 grados centígrados. Se removió el tejido conjuntivo y la túnica albugínea; el tejido se disoció sobre una pla-



**Figs. 1** a-b. En a núcleo paquiténico de conejo, visto en un corte transversal, mostrando los cromosomas homólogos apareados, con CSs unidos a la envoltura nuclear, indicados con las flechas. b. muestra un CS de conejo y su morfología característica: elementos laterales (L), región central (R) y elemento central (E), la barra en a representa 1 micra y en b 0.2 micras.

ca de parafina, se tomaron entre 0.2 a 0.3 gramos, se cortaron en tajadas pequeñas y se maceraron cuidadosamente los fragmentos con unas pinzas romas curvas en 2 gotas de TIM a 36 grados centígrados. La suspensión se colocó en una jeringa de vidrio de 1ml sin aguja y se completó el volumen a 1 ml con solución TIM. La solución que quedó en la jeringa se utilizó para expelerla y succionarla varias veces con la jeringa. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. El proceso se controló en un microscopio de investigación Amplival Pol-U (Carl Zeiss Jena).

#### Preparación de microesparcidos por el método de gota pendiente.

Con una pipeta Pasteur se colocaron unas pocas gotas de solución de esparcido (NaCl 0.5%), a 4 grados centígrados sobre una lámina hidrofílica. Invirtiendo la lámina suavemente, ésta se colocó en un microscopio invertido (puede utilizarse un microscopio convencional, elevando la lámina unos pocos mm de la base de la platina del microscopio). Con una

micropipeta se colocaron 10 micrilitros de suspensión celular, sobre la superficie invertida de la gota, se permitió que el esparcido se estabilizara por unos 5 minutos, controlando el proceso a través del microscopio. Utilizando unas pinzas finas para manipular las rejillas para microscopía electrónica, previamente tratadas con película soporte de formvar y carbonadas: sometidas a una descarga eléctrica de 1000 voltios, se tocó suavemente con dichas rejillas la superficie libre de la gota invertida, con el fin de recoger los microesparcidos, cuidando de conservar el derecho de la rejilla y evitando su contaminación por partículas extrañas. Finalmente, se permitió el secado al aire.

#### Fijación y contraste según el método de Counce y Meyer (2) con Modificación de Solari (10).

Una vez secas las rejillas, se colocaron en una solución de paraformaldehido al 4% más dodecil sulfato de sodio al 0.03%, pH 9 por 6 min, luego se pasaron a una solución de fotoflo al 0.4% pH 8 durante 20 seg; el exceso de

fotofo se retiró y la rejilla se secó bajo una lámpara infrarroja. Los preparados se contrastaron con ácido fosfatúngstico. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100B, a 80 Kv: las micrografías electrónicas de los microesparcidos se realizaron con película Kodalith (Kodak).

#### **Tinción de microesparcidos para microscopia de luz con nitrato de plata. De acuerdo con la técnica de Dresser y Moses (3).**

En láminas completamente limpias e hidrófobas, se colocó un ml de solución de esparcidos y con una micropipeta 10 microlitros de suspensión celular: se permitió el secado al aire y posteriormente se lavó la lámina con tampón borato pH 9 por 15 min y se cubrió con una solución de nitrato de plata al 50% más 3% de formalina por 6 h, a 65 grados centígrados en una cámara húmeda. Las observaciones se realizaron en un microscopio Amplival de la Carl Zeiss Jena y se tomaron fotografías con película Plus-X Pan (Kodak).

## **RESULTADOS**

### **I. Obtención de las Células.**

El proceso para la preparación de suspensiones celulares, produjo una adecuada separación del tejido en células individuales y núcleos aislados. La resistencia a los cambios osmóticos de los diferentes tipos celulares, fue observada a través del tiempo de elaboración de los microesparcidos. Después de 3 min, se presentó la ruptura de los núcleos pertenecientes a espermatocitos primarios y espermatogonias claras tipo

A y B, reconocidas por el tamaño y morfología del núcleo (ver fig. 4d.). Posteriormente entre los 5 y 10 min en la solución de esparcido, los núcleos pertenecientes a células de Sertoli, espermatogonias tipo oscuro y espermatocitos secundarios pudieron romperse. Un 30% de la población celular total resistió a la presión osmótica negativa. La mayor resistencia se observó en los espermatocitos secundarios y espermátides.

### **II. Descripción general del complejo sinaptonémico en microesparcidos de núcleos paquíténicos.**

Los microesparcidos de núcleos paquíténicos, mostraron un número de Complejos Sinaptonémicos correspondiente al número de pares de cromosomas de la especie "*Oryctolagus cuniculus*", 22 pares; cada par de homólogos formó un CS, que a excepción del par XY, se extendió a lo largo de los bivalentes (fig. 2.). En el par XY, solo se formó un CS en la región homóloga de ambos cromosomas, como fue demostrado por Solari anteriormente (11).

En el paquíteno, los CSs estaban completamente formados y sus extremos terminales se encontraron adheridos a la membrana nuclear; fragmentos de ésta aparecieron frecuentemente unidos a los CSs. De la misma forma, aquellos bivalentes relacionados con el nucleolo (fig. 2) presentaron relación con fragmentos grandes del mismo: tal relación desaparece en los CSs, en microesparcidos de núcleos zigoténicos, como fue previamente mencionado por Moses (5). Por otra parte la cromatina no fue observable, debido a la acción dispersora del detergente utilizado en la preparación de los microespar-

cidos. En la mayoría de los CSs, es posible observar el centrómero como una masa densa un poco mayor que el ancho del CS (fig. 3).

El conejo presenta 21 pares de cromosomas autosómicos y 1 par sexual (XY), que fueron clasificados de acuerdo con la longitud del Complejo Sinaptonémico de cada bivalente (ver tabla 1), al igual que por la posición del centrómero; esta clasificación estuvo de acuerdo con la hecha por Weisbroth (13) para cromosomas mitóticos de conejo. La relación de longitudes entre cromosomas mitóticos y meióticos fue de 1:10 +/- 0.6. La condición "estirada" de los cromosomas meióticos, depende principalmente de dos factores: 1. El tamaño de los homólogos correspondiente al estado de sinapsis y del mayor o menor grado de compactación de la cromatina, que permite la recombinación genética y determina la longitud total del CS y 2. El procesamiento y los reactivos utilizados en él, afectan en gran medida las dimensiones de los CSs, como se deduce de la tabla 2, en relación con los espesores de los elementos laterales y central. La

confirmación de este dato requerirá la confrontación de éstos con la reconstrucción tridimensional de un núcleo paquiténico, posteriormente.

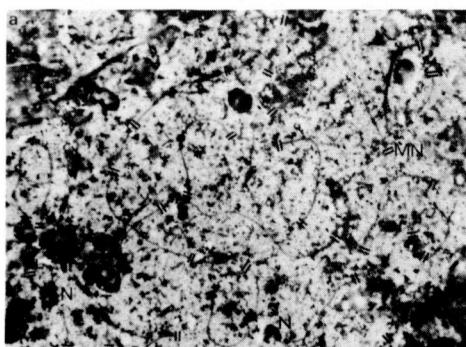
## II. El Cariotipo a partir de CSs.

Solo hasta 1970, M.J. Moses (7), utilizó los micròesparcidos por primera vez para elaborar un cariotipo en el ratón; los criterios utilizados para su elaboración fueron; la longitud relativa de los CSs y el índice centromérico (10). Utilizando estos parámetros se clasificaron los cromosomas del conejo en pares de tamaño decreciente a partir del estudio de 5 núcleos paquiténicos.

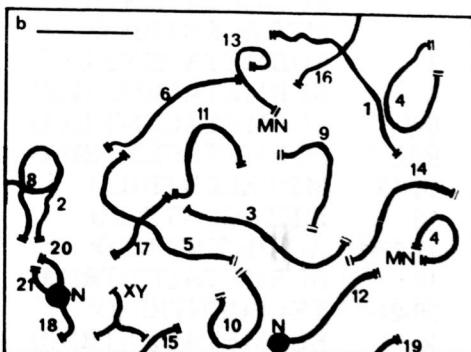
**PAR 1.** Un CS con un Indice Centrométrico (IC) de 1.33, que lo clasifica como submetacéntrico.

**PAR 2.** Un CS con un Indice Centrométrico (IC) de 1.25; su clasificación no es muy clara, pero lo hemos considerado como metacéntrico.

**PAR 3.** Un CS con un IC de 1.42, clasificado como submetacéntrico y con una longitud relativamente grande.



**Figs. 2 a-b.** Núcleo paquiténico de un espermatocto primario de conejo, contrastado con AFT. a. Muestra como los CS se dispersan en una región más o menos restringida, quedando algunos superpuestos. Restos del nucleolo (N), XY = par XY, MN = membrana nuclear. Magnificación 6000X. La barra es igual a 3 micras.



PAR 4. Un CS con un IC de 1.92, claramente submetacéntrico.

GRUPO 5-8. CSs con un IC promedio de 2.07; este valor fue utilizado para clasificar como submetacéntricos a todos los miembros de este grupo; en éstos la longitud se reduce significativamente en relación con los anteriores.

GRUPO 9-13. Este grupo es más numeroso que el anterior con CSs con un IC promedio de 1.72 (+/- 0.4), clasificados como submetacéntricos.

GRUPO 14-15. CSs con un IC de 1.08, clasificados como metacéntricos.

PAR 16. Un CS con un IC de 1.14 y una disminución apreciable de tamaño, clasificados como metacéntricos.

GRUPO 17-18. CSs con un IC promedio de mayor valor que los anteriores, 4.18 y que los clasifica como acrocéntricos de tamaño mediano.

PAR 19. Un CS, con IC de 2.34, clasificado como submetacéntrico.

GRUPO 20-21. CSs con un IC de 3.72, clasificados como telecéntricos.

**TABLA No. 1**

**CLASIFICACION DE LOS CROMOSOMAS EN MICROESPARCIDOS DE CSs DE CONEJO; (LONGITUDES EN MICRAS).**

GRUPO	CLASIFICACION CENTROMERICA	LONG DE LOS CSs (+/-)	INDICE CENTRO MERIC	LONG DE LOS CROMOSOMAS MITOTICOS*
1	SUBMETACENTRICO	5.44	0.2	1.33
2	METACENTRICO	4.7	0.2	1.25
3	SUBMETACENTRICO	4.26	0.07	1.42
4	SUBMETACENTRICO	4.06	0.2	1.94
5-8	SUBMETACENTRICO	3.44	0.3	2.07
9-13	SUBMETACENTRICO	2.66	0.3	1.72
14-15	METACENTRICO	2.29	0.3	1.08
16	METACENTRICO	2.27	0.07	1.14
17-18	ACROCENTRICO	1.65	0.04	4.18
19	SUBMETACENTRICO	1.37	0.2	2.34
20-21	TELOCENTRICO	1.18	0.1	3.72
X	SUBMETACENTRICO	2.16	0.3	-
Y	TELOCENTRICO	1.41	0.09	0.34
				0.13

\* Según Weisbroth et al. (13).

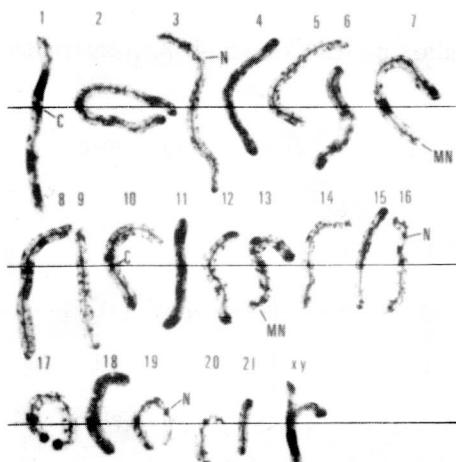


Fig. 3. Cariotipo de CSs de un espermatocito primario en paquiteno. Centrómero (C), membrana nuclear (MN), nódulo (N). La barra representa 4 micras. Magnificación 24.000X.

El par XY, no presenta centrómero durante el proceso de sinapsis, o es muy poco evidente. Su clasificación en el microesparcido, está dado por la forma singular de su apareamiento, observándose figuras en forma de Y,

que corresponden a procesos de formación de CS sólo en la región homóloga del bivalente.

La modificación utilizada de "Gota Pendiente" para la preparación de microesparcidos en este estudio, demostró su utilidad en la obtención de cariotipos de CSs, al igual que para estudiar la morfología del CS y la sinapsis de los homólogos, en contraposición a otros métodos previamente informados que utilizan técnicas más simples como la de colocar la suspensión celular en un pequeño recipiente formando una gota convexa, sobre la cual se recogen los microesparcidos (6); o como en la técnica de Navarro et al. (8), sobre películas de formvar en una laminilla de vidrio. Aunque para cada caso se pueden presentar objeciones o aceptaciones, el método de "Gota Pendiente" aumenta la cantidad de microesparcidos presentes por unidad de área haciendo más sencilla la búsqueda, tanto en el microscopio de luz como en microscopio electrónico.

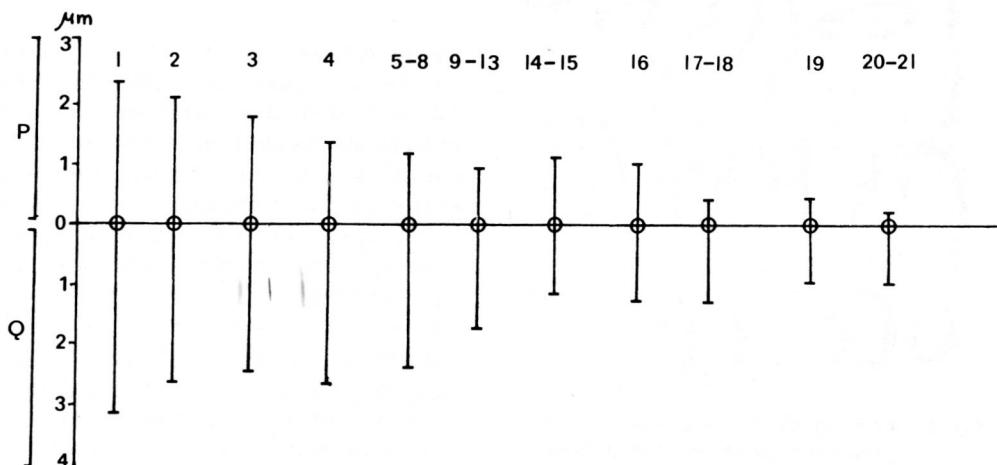
**TABLA No. 2**  
**COMPARACION DE LOS ESPESORES DE LOS CSs**

COMPONENTE	EN MICROESPARCIDOS	EN CORTES
ELEMENTO LATERAL	182 A	450 A
ELEMENTO CENTRAL	121 A	250 A
REGION CENTRAL	738 A	850 A

\* Para mayor información sobre datos del CS en cortes ultrafinos para microscopía electrónica. Ver Rev.Fac.Med.U.N. Vol. 40 No. 2, 143-150, Abril-Junio de 1986.

## DIAGRAMA:

Idiograma basado en la medida de los CSs en el microesparcido



p = Brazo Corto. q = Brazo Largo

Al microscopio óptico los CSs teñidos con nitrato de plata, aparecieron como filamentos compactos, con un grosor de 0.3 micras y extremos abultados, correspondientes a fragmentos de la membrana nuclear (ver fig. 4b), el centrómetro no fue visible, o podía fácilmente confundirse con pequeños artefactos que rodean los elementos laterales.

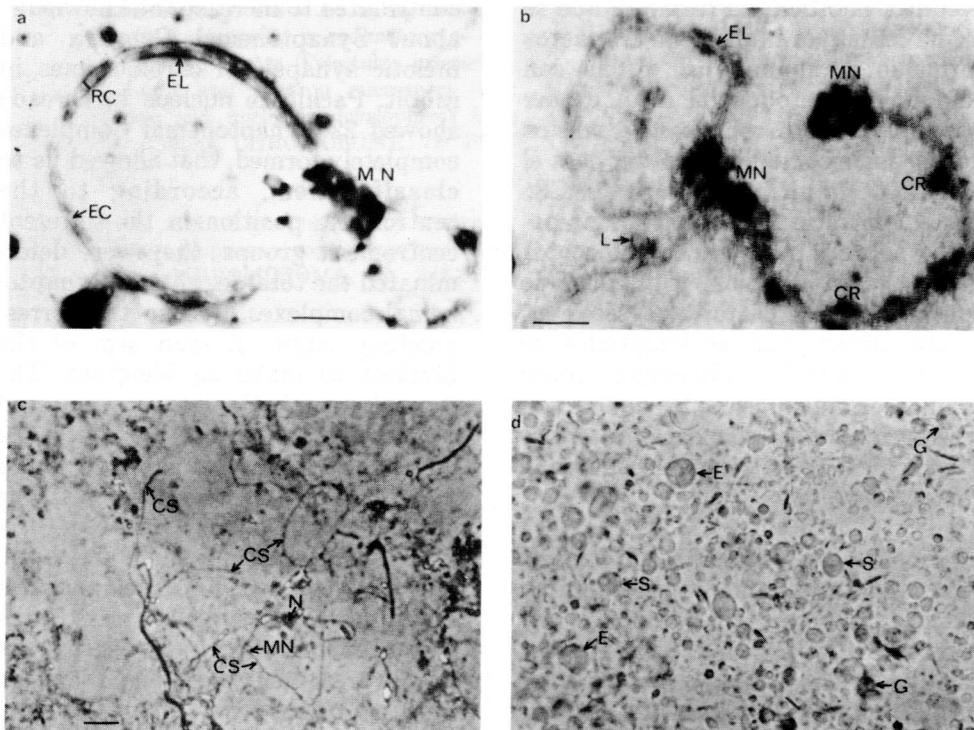
## DISCUSION

Como fue inicialmente establecido por Moses (6) y más tarde reafirmado por Solari (11), los microesparcidos de núcleos paquiténicos permiten establecer la morfología del Complejo Sinaptonémico y determinar sus longitudes totales.

El complejo sinaptonémico del conejo en microesparcidos presenta una distribución normal de los elementos que lo constituyen; se observan

algunos nódulos como los descritos en una publicación anterior para cortes ultrafinos (8) y otras estructuras propias de los esparcidos como: placas terminales (membrana nuclear) y centrómeros conspicuos, que facilitan la clasificación; y por último fragmentos de nucleolo, adheridos a los extremos terminales de algunos cromosomas. Este elemento podría ser utilizado para determinar la posición de las Regiones de Organizadores Nucleolares (NOR) en los diferentes cromosomas. Para nuestro caso los NOR se localizaron en los cromosomas 18, 20 y 21 (ver fig. 2). En la fig. 4b puede observarse un loop (figura en lazo) que se forma normalmente en el proceso de esparcido debido a torsiones naturales de los CSs.

Al realizar el cariotipo de CSs de espermatocitos de conejo, se observó que el número de CSs es igual al número de cromosomas haploides; las



**Figs. 4** a-b-c-d. a y b Muestran complejos sinaptonémicos en microesparcidos con: región central (RC), elemento lateral (EL), elemento central (EC), membrana nuclear (MN), loop (L) (figura en lazo), cromatina (CR). c. muestra un esparcido sobre placa teñido con nitrato de plata, fotografiado en un microscopio de luz; se observa CSs, membrana nuclear (MN), nucleolo (N). d. núcleos en la solución de esparcido, observados en microscopio de luz: espermatocitos primarios (E), espermatocitos secundarios (S), espermatogonias (G). Barras, en a 0.16 micras, en b 0.45 micras en c 10 micras y en d 6 micras.

longitudes de los CSs de los microesparcidos, no son comparables con las longitudes de los CSs encontradas en los cortes delgados (9), especialmente debido a las diferencias entre los dos métodos. Normalmente, la longitud de CS en cortes ultrafinos es mayor que la encontrada en los microesparcidos, debido a un "recogimiento" del CS, que algunos autores adjudican al proceso de fijación y deshidratación (11). En general, el microesparcido no da el mismo volumen de información que el corte fino de tejido completo;

pero la rapidez con que se obtiene permite resultados en poco tiempo. La eficiencia de la técnica permite su aplicación en la detección de anomalías cromosómicas y defectos en la meiosis, utilizando biopsias pequeñas.

El método de microesparcidos (2,11), es conveniente y puede ser utilizado para estudios citogenéticos. El esparcido por el método de "Gota Pendiente" permite obtener más núcleos esparcidos por unidad de área, que con el método convencional antes

descrito; la dificultad reside en que se forma un mayor número de artefactos si no se manipulan las grillas con cuidado, la metodología dista de ser sencilla y cuenta con muchos puntos de discusión como herramienta para el estudio de la ultraestructura del CS; por el contrario los espaciados preparados sobre lámina para microscopía de luz, son limpios y fáciles de contrastar con plata; en éstos es posible determinar las longitudes de los CSs que se observan como filamentos delgados; en los que no son diferenciables los elementos laterales y central y no se puede reconocer el centrómero.

El conejo a pesar de ser un animal de laboratorio ampliamente utilizado, no ha sido muy estudiado en lo que concierne a los aspectos citogenéticos relativos a la meiosis; por ser éstas las primeras aproximaciones a la ultraestructura citogenética de la meiosis en el conejo, creemos que es necesario profundizar posteriormente sobre las mismas y otros aspectos como la estructura molecular del CS y su relación con los bivalentes en el proceso de sinapsis durante la meiosis I; lo cual puede ser tomado como modelo de dichos procesos en los mamíferos.

### SUMMARY

Rabbit spermatocytes were treated by a modified microspread technic, that

contributed to increase the knowledge about Synaptonemal Complex and meiotic synapsis of chromosomes in rabbit. Pachitene nucleus in spreads showed 22 Synaptonemal Complexes completely formed, that allowed us to classify them, according to the centromeric position in the different centromeric groups, they were determinated the total lengths of Synaptonemal complexes, and so the corresponding length of each arm of the bivalent to make an idiogram. The Synaptonemal Complexes appeared attached to the nuclear envelope portions at their terminal ends, and 3 pairs of bivalents had centrioles. The spread treatment was followed through light microscopy and it was seen, how the new technic developed for obtaining microspreads raised the Synaptonemal Complex density by unit of area. Our observations through light microscopy were improved through transmission electron microscopy and by silver staining technic for light microscopy.

### AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer al Prof. Fabio Chaparro, antiguo director del Centro de Equipos Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia, seccional Bogotá, lugar en el cual se llevó a cabo este trabajo, por su amable colaboración; agradecemos también al Prof. Rafael Buriticá por la donación del material fotográfico.

### BIBLIOGRAFIA

1. Coming D.E., Okada T.A.: Whole mount electron microscopy of meiotic chromosomes and the Synaptonemal Complex. *CHROMOSOMA*. 30: 269-286, 1970.
2. Counce S.J., Meyer G.F.: Differentiation of the Synaptonemal Complex and the kinetochore in locusta spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. *CHROMOSOMA*. 44: 231-240, 1973.

3. Dresser M.E., Moses M.J.: Synaptonemal Complex karyotyping in spermatocytes of the chinese hamster (*Cricetulus griseus*). IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining. *CHROMOSOMA*. 79: 1-9, 1980.
4. Fletcher J.M.: Light microscopy analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining. *CHROMOSOMA*. 72: 241-247, 1979.
5. Moens P.D.: Quantitative electron microscopy of chromosome organization at meiotic prophase. *Col. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 38: 99-110, 1973.
6. Moses M.J., Counse S.J., Paulson D.F.: Synaptonemal Complex complement of man in spread of spermatocytes with detail of the sex chromosomes Pair. *SCIENCE*. 187: 363-373, 1975.
7. Moses M.J.: Synaptonemal Complex karyotyping in spermatocytes of the chinese hamster (*Cricetulus griseus*). *CHROMOSOMA*. 60: 99-114, 1977.
8. Navarro J., Vidal F., Guitar., Egoscue.: A method for the sequential study of Synaptonemal Complexes by light and electron microscopy. *Hum. Gen.* 59: 419-421, 1981.
9. Palomino F., Rodríguez F.A., Pérez G., Filgueira J.J., Trujillo L.C., Tinjaca C.P.: Ultraestructura del Complejo Sinaptonémico en espermatocitos de *Oryctolagus cuniculus* (conejo). *Rev. Fac. Med. Univ. Nal. Col.* 40: 2-10, 1986.
10. Pathak S., Lin C.C.: Synaptonemal Complex of the sex autosomal trivalent in a male Indian muntjac. *CHROMOSOMA*. 82: 367-376, 1981.
11. Solari A.L.: Synaptonemal Complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *CHROMOSOMA*. 81: 315-324, 1980.
12. Urena F., Solari A.J.: Three dimensional reconstruction of the XY pair during pachytene in the rat (*Rattus norvegicus*). *CHROMOSOMA*. 30: 258-268, 1970.
13. Weisbroth S.H., et al.: The biology of the laboratory rabbit. *Acad. Press. N.Y.* pp 6-17, 1974.