

FRECUENCIA ESPONTÁNEA E INDUCIDA DE ANOMALÍAS EN LA MORFOLOGÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE EN RATAS SPRAGUE DAWLEY

SPONTANEOUS AND INDUCED FREQUENCY OF ANOMALIES IN THE SPERM HEAD MORPHOLOGY IN SPRAGUE DAWLEY RATS

DANIEL FRANCISCO ARENCIBIA ARREBOLA*¹, LUIS ALFREDO ROSARIO FERNÁNDEZ²

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.

²Centro de Química Biomolecular (CQB), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Calle 72 número 2521, apto 2 e/ 25 y 27, Municipio Playa, Ciudad de la Habana, Cuba. Teléfono: 2715013, email: darencibia@finlay.edu.cu

RESUMEN

Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas; dada su gran sensibilidad esta herramienta permite evaluar cambios en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales ya que es capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo. El objetivo de este trabajo es reportar la concentración de espermatozoides, la frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides, así como el % de espermatozoides con gota citoplasmática en ratas Sprague Dawley machos, a su vez se determinó la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, utilizada como control positivo. Se pudo concluir que la línea de ratas Sprague Dawley constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de cabezas anómalas y el número de espermatozoides con gota citoplasmática, además se observó gran sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada con 50 mg/kg por vía i.p durante 5 días consecutivos.

Palabras clave: Espermatozoides, ratas, Sprague Dawley, ciclofosfamida.

ABSTRACT

Among the systems that are used to evaluate the damages in germinal cells, there is the essay based on the Wyrobek and Bruce morphology approaches that allows the study and classification of the sperm head morphology when including among the classifications, normal, abnormal heads classified in banana form morphology, amorphous, without hook and two tails. Due to its great sensibility this tool allows to evaluate the spermat concentration changes, as well as the increase of the spontaneous frequency of sperm heads morphologically abnormal. Because it is able to detect the irreversible damage that stays for a relatively long time period. The aim of this work is to report the sperm concentration, basal frequency of anomalies in the sperm heads as well as the % of sperms with cytoplasmic drop in Sprague Dawley rats. Also the frequency produced by these events was determined after the cyclophosphamide administration by intraperitoneal route was used as a positive control. We could conclude that the Sprague Dawley rat constitutes a good

model to use in genotoxicology studies, given the low spontaneous frequency of anomalous heads and the number of sperms with cytoplasmic drop. It was also observed great sensibility to the cyclophosphamide action administered with 50 mg/kg, using an intraperitoneal route during 5 consecutive days

Keywords: Sperm head morphology, Sprague Dawley rats, cyclophosphamide.

Recibido: 13.10.09. Revisado: 30.10.09. Aceptado: 15.12.09.

INTRODUCCIÓN

Es conocido por la comunidad científica que la introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, otros están relacionados con determinados riesgos por su toxicidad. La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo / beneficio los declare indeseables para la sociedad (Mortelmans y Rupa, 2004) y (Stoneham *et al.*, 2000).

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se encuentra dentro de la batería de ensayos de genotoxicidad, el cual permite determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas y en ocasiones se recomienda incluir dentro de estudios toxicológicos de larga duración en los cuales la sustancia a investigar se administre por períodos superiores a un ciclo espermático completo.

Esta técnica a su vez es sensible, rápida y económica, lo cual justifica su uso. Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wýrobek y Bruce, estos criterios permiten el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas norma-

les, anormales y dentro de este último grupo los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas (Wýrobek, 1983). Esta herramienta a su vez permite evaluar cambios en la concentración espermática, siendo capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo (Arencibia *et al.*, 2009). Una ventaja importante de este sistema de ensayo es la posibilidad que brinda de poder comparar los resultados experimentales obtenidos en humanos y mamíferos expuestos a los mismos compuestos, lo cual resulta prácticamente imposible con otras metodologías, otorgándole un considerable valor predictivo (Fielder *et al.*, 1999).

En este artículo se reporta la concentración de espermatozoides, la frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides, así como el % de espermatozoides con gota citoplasmática en ratas Sprague Dawley machos, a su vez se determinó la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo (Arencibia *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratas machos Sprague Dawley adultos jóvenes (7-9 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 150-180 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa (55%

$\pm 10\%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo.

Administración y dosificación. En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 am, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (10 ratas/grupo) en cada una de las dos series realizadas para un total de 20 ratas/grupo.

En el grupo experimental 1 se utilizaron animales no tratados como control negativo, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 52 días (duración del ciclo espermático de la rata) (Shayne, 2007 y Juan *et al.*, 2005).

En el grupo experimental 2 se utilizó el tween 65 al 2%, el cual es un vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo (Carvajal *et al.*, 2005 y Arruzazabala *et al.*, 2006), administrado por vía oral en dosis de 2 mL/kg durante un periodo de 52 días, preparado 2 horas antes de su uso (Shayne, 2007 y Juan *et al.*, 2005).

En el grupo experimental 3 se utilizó el NaCl al 0,9%, está demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar (Shayne, 2007 e Hipler *et al.*, 2000), administrado por vía oral en dosis de 2 mL/kg durante un periodo de 52 días, preparado 2 horas antes de su uso (Shayne, 2007 y Juan *et al.*, 2005).

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF a una dosis de 50 mg/kg por vía i.p., la cual fue adquirida por la firma comercial mexicana Lemri SA

bajo la marca LEDOXINA, la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9% (Arencibia *et al.*, 2009a). La disolución fue administrada inmediatamente después de ser preparada, a razón de 10 mL/kg, durante 5 días consecutivos y luego se dejaron los animales en un tiempo de reposo de 52 días (Arencibia *et al.*, 2009 y Juan *et al.*, 2005).

Sacrificio. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en previa atmósfera de éter, en el caso del grupo experimental 1 pasada las 24 horas del último simulacro de administración, en tanto los grupos experimentales 2 y 3 fue 24 h después de los 52 días de entubación gástrica, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, el sacrificio se realizó 24 horas después de concluido los 52 días de reposo, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos en cada una de las series montadas.

Exámenes realizados

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. Se realizó la extracción de ambos epidídimos, los cuales se redujeron a pequeños fragmentos, siendo depositados en placas Petri que contenían 3 mL de solución isotónica de NaCl 0,9%. La muestra se homogeneizó con pipetas Pasteur (Arencibia *et al.*, 2009b).

Conteo de espermatozoides. El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadió 0,05 mL de tripsina al 0,25%, transcurridos cinco minutos de tripsinización se le añadió 2 mL más de NaCl 0,9%, luego se realizó una dilución del homogeneizado tripsinizado en NaCl - Formol al 1% (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, contándose ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2 (Wyrobek y Bruce, 1978 y Kempinas y Lamano-Carvalho, 1998).

Morfología del espermatozoide. Al tubo que contenía la dilución del homogeneizado ya diluido se le añadió cinco gotas de eosina al 1%, dejándolo reposar por cinco minutos. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto (Arencibia *et al.*, 2009b). Se prepararon dos láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides, las observaciones fueron realizadas “a ciegas” por dos observadores independientes para luego establecer un promedio entre ambos. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana, sin gancho y con dos colas, además se valoró el % de espermatozoides que contenían gota citoplasmática como indicador de inmadurez celular (Wyrobek y Bruce, 1978 y Schardein, 1999).

Análisis estadístico. Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por lo cual todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA) (Arencibia *et al.*, 2009b). El nivel de significación establecido fue a 0.05. Todos los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS

Tal como se puede observar en la (Tabla I), el tratamiento con Tween 65 2% y NaCl 0,9% no indujo diferencias significativas al ser comparados con el control negativo en cuanto a la concentración espermática, tales sustancias

se comportan similarmente a dicho control negativo en las dos series evaluadas obteniéndose una media entre la concentración de estos tres grupos de $2,08 \pm 0,3 \times 10^6$ células/mL. A diferencia de lo observado en los grupos tratados con las sustancias vehículo 1 y 2, la CF indujo una disminución de la concentración de espermatozoides obteniéndose una media entre las dos series experimentales de $0,81 \pm 0,3 \times 10^6$ células/mL, corroborando su efecto citotóxico ya conocido.

En cuanto a la morfología de la cabeza del espermatozoide observados en la Tabla II, en cada serie se analizaron 5 000 espermatozoides por grupo, para un total de 10 000 espermatozoides totales analizados en las dos series, dada la gran semejanza entre las medias y la no diferencia significativa existente entre el control negativo y las sustancias solventes 1 y 2 en cuanto al número de cabezas anómalas y sus clasificaciones, aparejado a la n analizada tan amplia podemos afirmar que el rango de cabezas anómalas en los espermatozoides de ratas Sprague Dawley bajo nuestras condiciones experimentales se encuentran entre 39,4- 44,7 en conteo de 500 espermatozoides totales con una desviación entre 8,3 -13,5. Igualmente en el indicador % de espermatozoides con gota citoplasmática tampoco hubo diferencias significativas entre los animales controles negativos y los tratados con las sustancias solventes 1 y 2, encontrándose en el rango de 6,4-8,9% de forma espontánea en esta especie de rata.

El tratamiento con CF, por su parte, indujo un incremento significativo de las formas anómalas de la morfología de la cabeza del espermatozoide y del % de espermatozoides con gota citoplasmática, tal y como está descrito para este mutágeno, estando en el rango de $92,0 \pm 7,0$ espermatozoides anormales y de un 43,2 % con gota citoplasmática como promedio en las dos series experimentales.

Tabla I. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratas Sprague Dawley.

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración $\times 10^6$ células/mL.
Control negativo	20	43,6 \pm 4,6	2,18 \pm 0,5
Sustancia vehículo 1	20	41,8 \pm 3,4	2,09 \pm 0,3
Sustancia vehículo 2	20	39,3 \pm 1,9	1,97 \pm 0,2
Control positivo (CF) ^a	20	16,1 \pm 3,2*	0,81 \pm 0,3*

CF (Ciclofosfamida). ^a Administración por vía i.p, durante 5 días.

* $p < 0.05$ (comparación con el control negativo, ANOVA), (X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

Tabla II. Morfología de la cabeza del espermatozoide y % de espermatozoides con gota citoplasmática de ratas Sprague Dawley.

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas	% EGC
CN	20	460,4 \pm 19,4	39,6 \pm 10,4	14,3 \pm 4,3	10,4 \pm 8,2	13,7 \pm 6,8	1,2 \pm 0,7	7,5 \pm 2,3
SV1	20	460,6 \pm 8,3	39,4 \pm 8,3	16,6 \pm 6,6	9,3 \pm 4,4	11,8 \pm 3,7	1,7 \pm 0,9	6,4 \pm 3,2
SV2	20	455,3 \pm 17,5	44,7 \pm 13,5	18,4 \pm 3,8	11,4 \pm 7,9	12,6 \pm 6,1	2,3 \pm 1,7	8,9 \pm 4,1
CF ^a	20	408,0 \pm 7,0*	92,0 \pm 7,0*	27,6 \pm 8,0*	30,0 \pm 2,9*	30,5 \pm 7,0*	3,9 \pm 0,5*	43,2 \pm 6,1*

(CN: Control negativo, SV1: Sustancia vehículo 1, SV2: Sustancia vehículo 2, CF: Ciclofosfamida). EGC: Espermatozoides con gota citoplasmática.

^a Administración por vía i.p, durante 5 días. Determinaciones en 500 células/animal.

* $p < 0.05$ (comparación con el control negativo, ANOVA), (X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

DISCUSIÓN

De acuerdo al esquema de tratamiento empleado en los animales administrados con las sustancias vehículos 1 y 2 fueron tratados por varios ciclos espermáticos completos, por lo tanto no sólo las espermatogonias, espermatocitos y espermátides, estuvieron bajo la acción de estas sustancias de ensayo durante todo su ciclo celular, sino también los órganos sexuales y el sistema endocrino

en su totalidad. Los resultados de la concentración espermática y de la frecuencia de espermatozoides anómalos evaluada como promedio en las dos series experimentales en los grupos control solvente y sustancias vehículos 1 y 2 concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones nuestras y de otros investigadores (Arencibia *et al.*, 2009 y Ichihara y Pelliniemi, 2007), para esta especie de ratas, por lo cual afirmamos que estos valores constituyen los rangos de fre-

cuencia espontánea en que se mueve la concentración espermática y número de cabezas anómalas en ratas SD, a su vez pudimos llegar a la conclusión de que estas sustancias utilizadas como solvente no afectaron la proliferación de células germinales, no observándose tendencia a modificar este indicador. Así mismo se comportó el % de espermatozoides con gota citoplasmática el cual fue similar en controles negativos y tratados con las sustancias vehículos 1 y 2, lo cual permitió afirmar que estas sustancias no provocan un aumento de la aparición de células espermáticas inmaduras.

Los resultados encontrados con el uso de la CF concuerdan con los obtenidos por nosotros en ensayos realizados con ratas SD y ratones NMRI, OF-1 y Balb-C (Arencibia *et al.*, 2009; Arencibia *et al.*, 2009c y Arencibia *et al.*, 2009d), con el uso de sustancias altamente mutagénicas como la CF, ya que sus metabolitos logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, disminuyendo la producción y maduración; estos resultados también fueron reportados por Juan y colaboradores en el año 2005 el cual utilizó en este ensayo como control positivo la CF (Juan *et al.*, 2005). La dosis de CF empleada en los ensayos para evaluar el daño genotóxico, no es letal y ha demostrado su poder clastogénico y citotóxico en diferentes estudios realizados tanto en células somáticas como germinales (Arencibia *et al.*, 2009; Arencibia *et al.*, 2009a; Arencibia *et al.*, 2009e; Betancourt *et al.*, 1998 y Aujoulat *et al.*, 1998). En cuanto a la frecuencia de cabezas anómalas los resultados obtenidos en los animales tratados con CF corroboraron su uso como compuesto citotóxico y genotóxico en este modelo (Aubele *et al.*, 2005 y Juan *et al.*, 2005), a la par que valida la conducción de este ensayo en nuestras condiciones experimentales. De igual forma la CF fue capaz de aumentar el % de espermatozoides con gota citoplasmática, lo cual reafirma conjunta-

mente con la baja concentración espermática encontrada en estos animales una vez más su potente efecto citotóxico.

Se pudo concluir que la línea de ratas Sprague Dawley constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de importantes indicadores genotóxicos como son los incluidos en este trabajo, tales como la concentración espermática en epidídimos, la evaluación de la morfología de la cabeza del espermatozoide y el % de espermatozoides con gota citoplasmática, así como se destacó una alta sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada en dosis de 50 mg/kg por vía i.p.

REFERENCIAS

- ARENCEBIA DE, GÁMEZ R, GUTIÉRREZ A, PARDO B, CURVECO D, GARCÍA H, GOICOCHEA E (2009), Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas Sprague Dawley. Revista de Toxicología 26(3): en prensa.
- ARENCEBIA DE, GUTIÉRREZ A, GÁMEZ R, PARDO B, CURVECO D, GARCÍA H (2009a), Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. Revista Cubana de Farmacia 43(2):8-9.
- ARENCEBIA DE, ROSARIO LA, MORFFI J, CURVECO D (2009b) Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. retel (revista de toxicología en línea) 25(3):22-38.
- ARENCEBIA DE, ROSARIO LA, CURVECO D (2009c), Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. retel (revista de toxicología en línea) 20(1):2-14.
- ARENCEBIA DE, ROSARIO LA, RODRÍGUEZ Y, MARTIN Y, DÍAZ D (2009d), Frecuencia espontánea e inducida de anoma-

- lías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1. *retel* (revista de toxicología en línea) 24(2):7-29.
- ARENCIBIA DF, GÁMEZ R, GUTIÉRREZ A, PARDO B, NOAM M, MAS R, CURVECO D, GARCÍA H, GOICOCHEA E (2009e), Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. *Rev. CENIC* 40(1):29-32.
- ARRUZAZABALA ML, MAS R, MOLINA V (2006), Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R&D* 7:233-241.
- AUBELE M, JÜTTING U, RODENACKER K, GAISP, BURGERG, HACKER-KLOM U (2005), Quantitative evaluation of radiation induced changes in sperm morphology and chromatin distribution. *Cytometry Part A* 11(5):586-594.
- AUJOULAT M, FORICHON A, DESCOTES J (1998), Is a positive control useful in the rat in vivo micronucleus test? A comparative study of different routes of administration of cyclophosphamide. *ICT VIII, Paris, France Bulletin* 8:34-36.
- BETANCOURT J, RAMOS A, BIZOSO A, DECALO M, MARTÍNEZ MJ, EDREIRA A (1998), Evaluación genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa Mill* (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides en ratón. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 3:58-61.
- CARVAJAL D, MOLINA V, MÁS R, ARRUZAZABALA ML (2005), Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exptl Clin Res* 31:193-198.
- FIELDER RJ, ALLEN JA, BOOBIS AR, BOTHAM PA, DOE J, ESDAILE DJ (1999), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in "In Vivo" Mutagenicity Assays. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagen* 4(3):313-319.
- HIPLER U, GORNING M, HIPLER B, ROMER, W (2000), Stimulation and androgenic-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat Sertoli cells. *Arch Androl* 44:147-154.
- ICHIHARA I, PELLINIEMI LJ (2007), Morphometric and ultrastructural analysis of stage-specific effects of Sertoli and spermatogenic cells seen after short-term testosterone treatment in young adult rat testes. *Annals of Anatomy* 189 (5):520-532.
- JUAN M, GONZÁLEZ E, MUNUERA T, BALLESTER J, JOAN E, RODRÍGUEZ JE, JOANA M, PLANAS JM (2005), *Trans-Resveratrol*, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats. *Journal of Nutrition* 135:757-760.
- KEMPINAS WG, LAMANO-CARVALHO TL (1998), A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat caudal epididymidis. *Laboratory Animals* 22:154-156.
- MORTELMANS K, RUPA D (2004), Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 56:379-397.
- SCHARDEIN JL (1999) Reproductive Hazards. (ed) *Product Safety Evaluation Handbook Second Edition*, New York: Marcel Dekker, Inc, edition, pp 299-233.
- SHAYNE CG (2007) *The Rat, Toxicology*. (ed) *Animal Models in Toxicology Second edition*, New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, pp 150-191.
- STONEHAM M, GOLDACRE M, SEAGROATT V, GILL L (2000), Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal Epidemiol* 134:756-760.
- WYROBEK AJ and BRUCE WR (1978) *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*. (ed) *Chemical Mutagens Second edition, Vol 2*, England: United Kingdom edition published, pp 135-136.
- WYROBEK AJ (1983), An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 115(3):73-148.