

Evaluación genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, mediante el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas *Sprague Dawley*.

Arencibia Arrebola DF*, Gámez Menéndez R, Gutiérrez Martínez A, Pardo Acosta B, Curveco Sánchez D, García Cambián H y Goicochea Carrero E.

Centro de Productos Naturales (CPN), perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 e/ 19 y 21 Atabey, Playa, C Habana, Cuba.

Recibido 29 de enero de 2009 / Aceptado 18 de junio de 2009

Resumen: El tratamiento oral con D-004, extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), ha mostrado prevenir la hiperplasia prostática (HP) inducida por testosterona y por fenilefrina en ratas, efectos relacionados con su capacidad de inhibir la actividad de la 5 -reductasa prostática y de antagonizar los adrenoreceptores 1. Este estudio, como parte de los estudios de genotoxicidad del D-004, tuvo como objetivo determinar si el mismo aumenta la frecuencia de aparición de formas anómalas de la cabeza del espermatozoide en ratas. Para ello se utilizaron ratas *Sprague Dawley* machos incluidas en un estudio de toxicidad crónica, distribuidas aleatoriamente en 5 grupos (8 ratas/grupo): 1 control negativo tratado con el vehículo, 3 grupos tratados con D-004 (800, 1500 y 2000 mg/kg, respectivamente), y 1 control positivo (Ciclofosfamida, 50mg/kg). Los tratamientos (vehículo o D-004) se administraron por vía oral durante 12 meses, la Ciclofosfamida se administró por vía intraperitoneal 5 días consecutivos. No ocurrieron muertes ni se detectaron signos de toxicidad. Las concentraciones de espermatozoides, y las frecuencias de espermatozoides normales en los grupos tratados con D-004 fueron similares a los del control negativo, mientras que el grupo control positivo mostró menor concentración de espermatozoides y mayor frecuencia de espermatozoides anómalos que los controles negativos. En conclusión, el D-004 administrado durante varios periodos de espermatogénesis no presenta potencial genotóxico sobre las células germinales masculinas de ratas.

Palabras clave: D-004, hiperplasia prostática, morfología del espermatozoide, genotoxicidad, ratas.

Abstract: Genotoxic evaluation of D-004 in the *Sprague Dawley* rats sperm morphology assay.

Oral treatment with D-004, a lipid extract from the royal palm (*Roystonea regia*) fruits, has been shown to prevent prostate hyperplasia (PH) induced by testosterone and phenylephrine in rats through the D-004-mediated inhibition of prostate 5 -reductase activity and antagonism of -1 adrenoreceptors. This study, as part of the studies of the genotoxic potential of D-004, was aimed to determine whether D-004 increases the frequency of abnormal forms of rat sperm-head morphology. For that, male *Sprague Dawley* rats included in a chronic toxicity study were used, which were randomly distributed into 5 groups (8 rats/group): 1 negative control treated with the vehicle, 3 D-004-treated groups (800, 1500 and 2000 mg/kg,

respectively), and 1 positive control (Ciclophosphamide, 50mg/kg). Treatments (vehicle or D-004) were orally administered for 12 months, while Ciclophosphamide was given by intraperitoneal route five days consecutive. There were no deaths and no toxicity signs were observed. Spermatozoid concentrations and the frequencies of normal spermatozoids in D-004 treated groups were similar to those of the negative controls, while the positive control had decreased spermatozoid concentrations and increased frequency of abnormal spermatozoids compared with the negative controls. In conclusion, D-004 orally administered during several periods of spermatogenesis in rats did not show genotoxic potential on the male germinal cells.

Key words: D-004, prostate hyperplasia, sperm-head morphology, genotoxicity, rats

Introducción

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un alargamiento de la fibra muscular y la estructura epitelial de la próstata que conlleva a la obstrucción del flujo urinario y a la aparición de un conjunto de síntomas del tracto urinario bajo (STUB) [1]. La etiopatología de la HPB es multifactorial y depende de cambios hormonales y no hormonales que ocurren en el hombre que envejece: el principal factor etiológico hormonal para el desarrollo de la HPB es el aumento de la conversión de la testosterona (T) en su metabolito más activo, la dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5-reductasa, ya que la DHT acumulada en la próstata propicia la liberación de factores de crecimiento que conllevan a la hiperplasia del tejido [2,3]. Por otra parte, el aumento del tono del músculo liso de la próstata mediado por un aumento de la contribución de los adrenoreceptores 1 es responsable de los STUB característicos de la HPB [4,5].

El tratamiento oral con D-004, extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), constituido por una mezcla de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico, ha mostrado prevenir la hiperplasia prostática (HP) inducida por testosterona [6] o por fenilefrina [7] en ratas, efectos relacionados con su capacidad de inhibir la actividad de la 5 -reductasa prostática [8] y de antagonizar los adrenoreceptores 1 [9]. Estudios toxicológicos previos han mostrado que dosis orales únicas de D-004 (2g/kg de peso corporal) no produjeron muertes ni signos de toxicidad en ratas y conejos, considerándose, por tanto, como sustancia no tóxica [10,11]. Resultados consistentes fueron obtenidos en estudios de toxicidad oral por dosis repetidas de hasta 2 000 mg/kg administradas durante

*email: cpn@cnic.edu.cu

90 días (estudio subcrónico) y 12 meses (estudio crónico) en ratas *SD*, no detectándose toxicidad atribuible al D-004, por lo cual la mayor dosis administrada se comportó como un nivel de dosis que no produjo efectos adversos detectables (*non observable adverse effect level*-NOAEL) [10].

Por otra parte, los resultados del test de Ames con y sin activación metabólica, ensayo que detecta la capacidad de inducción de mutaciones puntuales, demostraron que el D-004 no resultó citotóxico ni mutagénico en ninguna de las cepas de *Salmonella typhimurium* estudiadas [12], la evaluación del potencial citotóxico, clastogénico y genotóxico del D-004 *in vivo* empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores también mostró resultados negativos y el Ensayo Cometa demostró que el D-004 no indujo daño en el ADN de células eucariotas de ratones [13-15].

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide es una técnica sensible, rápida y económica para determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas que 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 [16].

Teniendo en cuenta estos antecedentes este estudio tuvo como objetivo determinar si el tratamiento oral a largo plazo (12 meses) con D-004 afecta la morfología de la cabeza del espermatozoide y/o modifica la concentración espermática en ratas *SD* machos.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron ratas machos *SD* adultos jóvenes (7-9 semanas, peso corporal entre 150 y 180 g), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Los animales fueron adaptados durante 7 días a las condiciones controladas que se mantuvieron durante todo el estudio: temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa ($60\% \pm 10\%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 horas. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie) fue *ad libitum*. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba y a los procedimientos establecidos en el Centro de Productos Naturales.

Administración y dosificación

El D-004 fue suministrado por el departamento de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales, y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad (composición y pureza) mediante un método validado de cromatografía gaseosa. Éste se basa en la determinación de los ácidos grasos como ésteres metílicos mediante una reacción de metilación con cloruro de acetilo en metanol (10:90, v/v). Los análisis se realizaron en un cromatógrafo gaseoso Fisons con detector de ionización de llama y una columna Solgelwax (30 m x 0,25 m de espesor de película, 0,25 m de diámetro interno). El horno se calentó desde 80 hasta 180°C a $20^\circ\text{C}/\text{min}$, y desde 180 hasta 280°C a $40^\circ\text{C}/\text{min}$. La temperatura del inyector y del detector fue de 270 y 275°C , respectivamente. Se empleó hidrógeno (1,3 mL/min) como gas portador. La identificación de cada pico se realizó mediante el empleo del correspondiente patrón de ácido graso (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Las concentraciones fueron calculadas a partir del área de los picos empleando ácido tridecanoico como patrón interno.

La composición de los ácidos grasos del lote de D-004 estudiado fue: caprílico 0,3%, cáprico 0,5%, láurico 19,4%, mirístico 9,7%, palmítico 10,6%, palmitoléico 0,3%, esteárico 2,6% y oleico 49,9% (incluye los ácidos linoléico (C18:2) y linolénico (C18:3) expresados como oleico).

La preparación de las emulsiones, usando como agente tenso-activo Tween 65 (2%), se realizó 2 horas antes de la administración y sus concentraciones se ajustaron semanalmente de acuerdo al aumento del peso corporal de los animales.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos experimentales, se utilizaron 8 animales/grupo a los que se les administró por vía oral durante 12 meses, a los grupos control, el vehículo (Tween 65 al 2%) y a los tratados, diferentes dosis de D-004 (800, 1500 y 2000 mg/kg), mientras que el grupo control positivo fue tratado por vía i.p. durante 5 días con Ciclofosfamida (CF) [17-19] y sacrificados 52 días después de la primera administración del mutágeno [20].

La dosis menor de D-004 empleada ha demostrado ser efectiva en los modelos HPB en ratas, mientras que la máxima es la más alta dosis recomendada para este tipo de ensayo [7,8].

Exámenes realizados:

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Al concluir el período experimental los animales fueron sacrificados en atmósfera de éter. A cada animal se le realizó la extracción del epidídimo derecho, el cual inmediatamente se colocó en una placa Petri con 2 ml de una solución isotónica de NaCl 0,9% y se redujo a pequeños fragmentos mediante tijeras, se transfirieron a tubos de ensayo y se homogeneizaron con pipetas Pasteur para obtener una suspensión homogénea a la cual se le añadió 0,05 ml de tripsina al 0,25% para lograr la ruptura del tejido conectivo y lograr así la separación de los espermatozoides.

Contaje de espermatozoides

Una vez transcurridos 5 minutos de tripsinización, la suspensión fue diluida 1:10 en NaCl al 0,9% y posteriormente 10 μl de dicha dilución se colocó en una cámara de Newbauer para el conteo de espermatozoides [21].

Morfología de la cabeza del espermatozoide

Se añadió a cada tubo, con el homogeneizado tripsinizado y diluido, 5 gotas de eosina al 1% y después de 5 minutos se procedió a depositar una gota sobre una lámina seca a la que se le colocó el cubreobjeto para su extensión. Se prepararon 2 láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides totales por dos observadores independientes, las observaciones fueron realizadas "a ciegas". El criterio de clasificación a seguir es el planteado por Wyrobek y Bruce [21,22].

Análisis estadístico

Los datos relativos al conteo de espermatozoides y su morfología, se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación establecido fue $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados

Tal como se puede observar en la Tabla 1, el tratamiento con dosis de hasta 2000 mg/kg no afectó la proliferación de células germinales en ratas dado que la concentración de espermatozoides fue similar en

tratados y controles negativos, no observándose tendencia a modificar este indicador con el incremento de la dosis de D-004. A diferencia de lo observado en los grupos tratados con D-004 la CF indujo una disminución de la concentración de espermatozoides. Similar comportamiento se observó en el análisis de la morfología de la cabeza del espermatozoide (Tabla 2), el tratamiento con D-004 con dosis de hasta 2000 mg/kg no incrementó la frecuencia de formas anómalas con relación al control negativo, ni mostró tendencia con la dosis a inducirlo, por lo que el D-004 no manifestó potencial genotóxico en las células germinales de ratas machos. El tratamiento con CF, por su parte, indujo un incremento significativo de las formas anómalas de la morfología de la cabeza del espermatozoide, tal y como esta descrito para este mutágeno.

Tabla 1. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer del D-004 en ratas SD machos, vía gástrica.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control	-	40,8 ± 4,3	2,04 ± 0,2
D-004	800	40,8 ± 3,7	2,04 ± 0,2
D-004	1 500	40,5 ± 1,9	2,02 ± 0,1
D-004	2 000	39,8 ± 2,6	1,99 ± 0,1
CF	50 ^a	19,3 ± 3,0*	0,96 ± 0,2*

CF (Ciclofosfamida).

^a Administración por vía i.p., durante 5 días.

*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA, X media; DE desviación estándar).

Tabla 2. Morfología de la cabeza del espermatozoide del D-004 en ratas SD machos, vía gástrica.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control	-	459,1 ± 22,4	40,9 ± 22,4	13,3 ± 7,2	12,4 ± 9,3	13,5 ± 7,4	1,8 ± 0,9
D-004	800	460,8 ± 10,0	39,3 ± 10,0	12,6 ± 5,6	12,3 ± 3,4	12,9 ± 4,0	1,5 ± 0,8
D-004	1 500	455,4 ± 19,3	44,6 ± 19,3	14,4 ± 7,7	13,4 ± 8,2	14,6 ± 6,6	2,2 ± 0,9
D-004	2 000	459,3 ± 14,1	40,7 ± 14,1	12,3 ± 3,8	14,3 ± 7,1	12,8 ± 5,7	1,3 ± 1,0
CF	50 ^a	408,8 ± 6,21*	91,2 ± 6,21*	25,6 ± 7,5*	34,0 ± 3,1*	28,5 ± 7,3*	3,1 ± 0,6*

CF (Ciclofosfamida).

^a Administración por vía i.p., durante 5 días.

Determinaciones en 500 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA, X media; DE desviación estándar).

Discusión

De acuerdo al esquema de tratamiento empleado los animales fueron tratados con D-004 por varios ciclos espermáticos completos, por lo tanto no sólo los espermatozoides analizados estuvieron bajo la acción de la sustancia ensayo durante todo su ciclo celular, sino que los órganos sexuales y el sistema endocrino en su totalidad estuvieron sometidos a la acción de altas dosis de D-004 durante un período de tiempo lo suficientemente prolongado como para que cualquier acción tóxica, que pudiera tener repercusión sobre la producción de espermatozoides, como serían cambios en los niveles de FSH, LH y andrógenos, pudieran manifestarse.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre grupos tratados y controles negativos en cuanto al conteo de espermatozoides. La concentración observada en estos grupos concuerda con valores fisiológicos reportados para esta especie [16,23].

La ausencia de citotoxicidad del D-004 en células germinales vista en este ensayo reproduce lo observado en ratones tratados con dosis de

hasta 1500 mg/kg [24] y se suman a la ausencia de toxicidad demostrada en células somáticas, ya que dosis de hasta 2000 mg/kg no fueron citotóxicas en médula ósea de ratones [13].

De igual modo, el tratamiento con D-004 no indujo una disminución de la frecuencia de espermatozoides normales, resultados estos que corroboran lo observado en ratones OF-1 tratados por un ciclo espermático completo con dosis de D-004 de hasta 1500 mg/kg [24]. En ambas especies roedoras la distribución de las diferentes formas anómalas de la morfología de la cabeza del espermatozoides en los animales tratados con D-004 se comportó similar a lo observado en sus respectivos controles negativos, subrayando así la inocuidad genotóxica del D-004, tal como ocurrió en la evaluación en microorganismos [12] y en células somáticas de roedores [13,14].

Tanto una caída en el conteo espermático, como el incremento de formas anómalas de la morfología de los espermatozoides están directamente correlacionadas con una disminución de la fertilidad, por lo que los resultados obtenidos en este ensayo justifican que ratas machos tratadas durante 13 semanas con dosis de hasta 1000 mg/kg no manifestaran problemas de fertilidad.

La administración de 50 mg/kg de Ciclofosfamida, empleada como control positivo, indujo una disminución en la concentración de espermatozoide y un incremento en la frecuencia de aparición de espermatozoides morfológicamente anormales, ya que sus metabolitos logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, disminuyendo la producción y maduración de éstas, tal como se reporta para este reconocido mutágeno [18,25,26], resultado que corrobora su uso como compuesto citotóxico y genotóxico en este modelo, [20,27] a la par que valida la conducción de este ensayo en nuestras condiciones experimentales.

Se ha demostrado que el D-004 administrado a roedores en dosis de 400 mg/kg es efectivo en prevenir el desarrollo de la HP inducida con testosterona en roedores castrados y no castrados, no así la inducida por Dihidrotestosterona [6]. Sus efectos se han manifestado tanto sobre el tamaño de la próstata como sobre los hallazgos histológicos típicos de la HP [28]. Además, el D-004 también resultó efectivo cuando se administró después de haberse inducido la HP con T, por lo cual su acción terapéutica también fue eficaz [6,7]. Por tanto, la ausencia de efecto citotóxico y genotóxico del D-004 en células germinales observadas en el presente ensayo, en el que se empleó la dosis máxima recomendada para este tipo de estudios, dosis muy superior a la dosis efectiva de D-004 en ratas, no se debe a problemas biodisponibilidad y/o con un insuficiente esquema de tratamiento.

En conclusión, el D-004 (800, 1500 y 2000 mg/kg), administrado por vía gástrica durante 12 meses no mostró evidencia de acción citotóxica ó mutagénica en células germinales de ratas SD.

Bibliografía

1. Madsen B (1995) Benign protatic hyperplasia pathophysiology and pharmacological treatment. *Curr Opin Neprol Hypert* 5:455-459.
2. Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H (2000) Dihydrotestosterone and the concept of 5 alpha reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 37:367-380.
3. Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H (2002)

- Dihydrotestosterone and the role of 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 41:412-420.
4. Chapple CR (1996) Selective -adrenergic antagonists in benign prostatic hyperplasia: rationale and clinical experience. *Eur Urol* 29:129- 144.
5. Debruyne F, Koch G, Boyle P (2002) Comparison of a phytotherapeutic agent (Permixon) with an alpha-blocker (Tamsulosin) in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a 1-year randomized international study. *Eur Urol* 41:497-507.
6. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V (2004) Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res* 30:227-234.
7. 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 RD* 7:233-241.
8. Carbajal D, Molina V, Mas R, Arruzazabala ML (2005) Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res* 31:193-198.
9. Arruzazabala ML, Mas R, Carbajal D (2005) Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on *in vitro* and *in vivo* effects mediated by alpha-adrenoceptors in rats. *Drugs RD* 6:281-289.
10. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y (2005) Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Exp Clin Res* 31:101-108.
11. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Goicochea E (2007) Toxicología aguda del D-004 en conejos. *Revista CENIC* 38:99-100.
12. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H (2005) Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Revista CENIC* 36: Especial.
13. Gutiérrez A, Fernández I, Gámez R, García H (2005) Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. *Revista CENIC* 36: Especial.
14. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H (2009) 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).
15. Marrero G, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D (2007) Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (ensayo cometa). *Revista CENIC* 38:200-203.
16. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer, W (2000) Stimulation and scabestrogdn-inducen inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. *Arch Androl* 44:147-154.
17. Serres A, Hollaender D (1978) The induction of sperm shape abnormalities in mice and humans. *Chemical mutagens principles and methods for their detection*. New York: Plenum 5:257-285.
18. 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 rata y ratón. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 3:58-61.
19. Wyrobek AJ, Bruce, WR (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci* 72:4425-4429.
20. Wyrobek, AJ (1983) An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 115:73-148.
21. Wyrobek AJ, Bruce WR (1978) Chemical Mutagens: principles and methods for their detection. *Proc Natl Acad Sci* 150:6250-6253.
22. Kempinas WG, Lamano-Carvalho, TL (1988) A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. *Lab Animals* 22:154-156.
23. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles TH, Rodríguez E (2006) Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). *Universidad de Barcelona, España* 1:2-3.
24. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E (2009) Evaluación genotóxica del D-004 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones OF-1. *Revista CENIC* 40:29-32.
25. 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. *Gen Toxicol Environ Mutagen* 4:313-319.
26. Feron VJ, Groten JP, Jonker D, Cassee FR, Van Bladeren PJ (1998) Chapter 14: Toxicology of Chemical Mixtures In: *General and Applied Toxicology. Toxicology and Air Pollution: Risk Assessment*. Univer of Bourgogne, Dijon. pp.42.
27. Johnson J (1998) Administration backs chemical testing, genetic toxicology in germinal cells. *Chem Eng News* 76:7-8.
28. Noa M, Mas R (2005) Effect of D004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Int J Tissue React* 27:203-211.