

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de tesis realizado como requisito  
para optar al título de  
DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO DE LA MOLIBDENOSIS Y LA DEFICIENCIA DE MOLIBDENO  
SOBRE LA CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL DEL COLON EN RATAS.

**Autora:** Montenégro, María de las Angustias  
**Director:** Profesor Dr. Gimeno, Eduardo Juan  
**Co-Director:** Profesor Dr. Sánchez Negrette, Marcial

**Lugar de trabajo:** Cátedra: Patología General y Sistemática.  
Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad  
Nacional del Nordeste, UNNE.

**Miembros del Jurado:**

Dr. Laguens, Rubén Pedro  
Dra. Ruksan, Bruna  
Dr. Portiansky, Enrique Leo

*Para Ito, Marcela y Gaby*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial:

Al Profesor Dr. Eduardo J. Gimeno, por la confianza y el permanente incentivo brindados durante todos estos años de trabajo.

Al amigo y colega Dr. Juan Toribio Borda, por el incentivo permanente y la desinteresada colaboración en la realización del trabajo experimental.

Al personal de la cátedra Patología General y Sistemática de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.N.E., en especial a quienes han colaborado durante un año en la fase experimental en cada una de sus etapas:

Médico Veterinario: Magíster: Walter Javier Lertora.

Médica Veterinaria, Magíster: Mónica R. Pérez Gianceselli.

Médico Veterinario: Alexis Norberto Burna.

A la Licenciada Susana Cseh, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Estación Experimental Balcarce, por su colaboración en la determinación de los valores de molibdeno y cobre en tejido hepático.

Al Profesor, Magister Daniel Osvaldo Pochón, por la colaboración brindada en la realización de los análisis estadísticos.

Al Profesor Dr. Miguel A. Quiroga, del Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Minerales, Departamento de

Fisiopatología FCV, UNCPBA, por su colaboración en la determinación de cobre en suero.

A la Dra. en Biología Graciela Inés Lavia, Jefa del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la UNNE, por la colaboración prestada.

Al Sr. Luis Alberto Rossi, por la colaboración técnica con los preparados y coloraciones histoquímicas.

A todos aquellos amigos colegas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, que con su permanente incentivo a lo largo de estos años me alentaron para que este trabajo siguiera adelante.

A mi co-director a quien debo mis primeros pasos en el área de Patología y mi incursión en el área de la investigación y de quien intento imitar la responsabilidad y abnegación en la labor diaria. Compañero inseparable de largas jornadas de trabajo y experiencias de vida compartidas.

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la U.N.N.E., por la ayuda económica brindada durante estos años de estudio y por el subsidio del trabajo experimental.

## INDICE DE CONTENIDOS

Título.....	1
Palabras Claves.....	1
Resumen.....	1
Title.....	3
Key Words.....	3
Summary.....	3
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
Objetivos.....	17
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>19</b>
1-Animales y ambiente experimental.....	19
2-Plan experimental.....	19
3-Preparación de la solución de 1,2-DMH.....	22
4-Preparación de la solución control.....	22
5-Preparación de la solución de Molibdeno.....	22
6-Preparación de la solución de Tungsteno.....	22
7-Evaluaciones durante la experiencia.....	23
7.1-General.....	23
7.2-Peso corporal.....	23
7.3-Determinación de las concentraciones de Mo y Cu en tejido hepático y en suero.....	23
8-Sacrificio y toma de muestras.....	24
9-Procesamiento del material y examen macroscópico.....	25
10-Estudio histológico e histoquímico.....	26
11- Procesamiento para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	27
12-Estudio ultraestructural mediante MEB.....	28
13-Protocolo de seguridad para el uso de la DMH.....	28
<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
1.Observaciones generales.....	31
2.Peso corporal.....	32
3.Cu y Mo en tejido hepático.....	33
4.Cu en suero.....	35

5.Examen macroscópico del intestino grueso (IG).....	36
5.1.Número de tumores.....	36
5.2.Tamaño.....	38
5.3.Forma.....	39
6.Examen microscópico del intestino grueso(IG).....	45
6.1.Tipo histológico.....	47
6.2.Frecuencia y localización de los diferentes tipos histológicos.....	53
6.3.Grado de infiltración y metástasis.....	56
6.4.Lesiones Neoplásicas Tempranas (LNT).....	60
6.5.Análisis histoquímico de tumores.....	63
6.6.Análisis histoquímico de LNT.....	70
6.7.Análisis ultraestructural de los tumores mediante MEB.....	72
6.8.Análisis ultraestructural de las LNT mediante MEB.....	75
<b>Discusión</b> .....	78
1.Efectos de la administración de Mo y W previo al tratamiento con DMH.....	78
2.Efectos de la dieta con alto y bajo contenido de Mo sobre la carcinogénesis experimental del IG.....	79
<b>Conclusiones</b> .....	89
<b>Bibliografía</b> .....	92
<b>Anexos</b> .....	109

**ABREVIATURAS**

- (ACT) Adenocarcinoma Tubular
- (ACTV) Adenocarcinoma Tubuloveloso
- (ACV) Adenocarcinoma Velloso
- (AT) Adenoma Tubular
- (ATV) Adenoma Tubuloveloso
- (Ccas) Carcinoma de células en anillo de sello
- (Cmu) Carcinoma mucinoso
- (DFMO) Difluormetilornitina
- (DMH) Dimetilhidrazina
- (ID) Intestino delgado
- (IG) Intestino grueso
- (LNT) Lesiones Neoplásicas Tempranas
- (MEB) Microscopía Electrónica de Barrido
- (MNNG) N-metil-N-nitroso-N-nitrosoguanidina
- (Mo) Molibdeno
- (PAS) Acido periódico de Schiff
- (W) Tungsteno

EFEECTO DE LA MOLIBDENOSIS Y LA DEFICIENCIA DE MOLIBDENO  
SOBRE LA CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL DEL COLON EN RATAS

Palabras clave: Cáncer intestinal - Molibdeno - Ratas

RESUMEN

En los seres humanos, los tumores del intestino grueso constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en gran parte del mundo. Factores dietéticos y del medio ambiente son considerados como responsables del 85-90% de todos los casos. En humanos y en animales de laboratorio fue evaluada la relación entre el cáncer de colon y componentes de la dieta tales como grasas, fibras, vegetales, vitaminas y diversos elementos como, calcio, magnesio, hierro, potasio, sodio, manganeso, zinc, cobre, fósforo, y selenio. Con referencia al molibdeno (Mo), varios estudios han demostrado el efecto protector sobre la carcinogénesis experimental en diferentes modelos biológicos. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la molibdenosis y la deficiencia del Mo sobre la carcinogénesis experimental del colon en ratas.

Fueron utilizadas ratas Wistar machos, de 3 meses de edad a las cuales se les suministró agua y dieta ad-libitum. El Mo y el Tungsteno (W) fueron administrados en el agua de bebida a la concentración de 200 ppm. Los tumores intestinales fueron inducidos mediante una inyección subcutánea semanal del carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) durante 16 semanas, a la dosis de 20 mg/kg de peso corporal. El Mo, en la forma de molibdato de amonio  $[(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  y el W, en la forma de tungstenato de sodio  $(\text{Na}_2\text{WO}_4)$  fueron administrados en el agua



de bebida dos meses antes del primer tratamiento con DMH y continuado durante 4 meses más hasta la última dosis de la DMH. Todos los animales fueron sacrificados tres meses posteriores a la última dosis de la DMH. El examen macroscópico consistió en la determinación de las características, tamaño y localización de los tumores. Los cambios del epitelio intestinal y del contenido de mucinas fueron estudiados histológica e histoquímicamente en preparados cortados en  $5\mu\text{m}$  y coloreados con Hematoxilina y Eosina, PAS y Alcian-blue a pH 2,5. Los tumores y las lesiones neoplásicas tempranas (LNT) fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido. En los lotes tratados con Mo y en los lotes tratados con W se observó un incremento y una disminución del contenido hepático de Mo, respectivamente. Al final del primer mes del tratamiento, en el lote tratado con Mo, el contenido hepático de Mo fue de 4,65 ppm y al segundo mes fue 5,61 ppm, comparado con el lote sin tratamiento 2,61 ppm y 2,18 ppm, mientras que en el lote tratado con W fue de 0,70 ppm y 0,96 ppm respectivamente. Se observó una incidencia significativamente menor de tumores en el lote tratado con Mo (47 tumores), comparado con el lote tratado con DMH (105) y el lote tratado con W (113). Por otra parte el lote tratado con molibdeno mostró una disminución significativa en el número de tumores múltiples por rata.

EFFECT OF MOLYBDENOSIS AND MOLYBDENUM DEFICIENCY  
ON EXPERIMENTAL COLON CARCINOGENESIS IN RATS

**Key Words:** Intestinal cancer - Molybdenum - Rats

**SUMMARY**

In human beings, large intestine tumors constitute an important cause of morbidity and mortality in most of the countries of the world. Environmental and dietary factors are considered to be responsible for 85-90% of all the cases. In humans and laboratory animals it was evaluated the relationship between colon cancer and dietary components such as fat, fibers, vegetables, vitamins and some elements such as magnesium, iron, potassium, sodium, manganese, zinc, copper, phosphorous and selenium. Referring to molybdenum (Mo), several studies have demonstrated its protective effect in different experimental carcinogenesis models. The main objective of the present study was to investigate the effect of molybdenosis and molybdenum deficiency on experimental colon carcinogenesis in rats.

Three months old male Wistar rats, were given ad-libitum a nutritionally adequate diet and demineralized drinking water. The Mo and Tungsten (W) were provided in the drinking water at 200 ppm concentration. Intestinal tumors were induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) given subcutaneously at 20 mg/kg body weight and continued once a week for 16 weeks. Mo in the form of ammonium molybdate  $[(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4H_2O]$  and W in the form of sodium tungstate  $(Na_2WO_4)$  were provided in the drinking water

two months before the first DMH treatment and it was continued during 4 months more until the last DMH treatment. Three months after the last carcinogen injection, all surviving animals were sacrificed and examined for intestinal tumors. The features, size and location of the tumors were recorded and they were examined and clasificated histologically. Histological and histochemical changes of intestinal epithelium and mucins were assessed at the end of the experience in specimens sectioned at 5  $\mu$ m, stained with Hematoxylin and Eosin, PAS and Alcian blue pH 2,5. Scanning electron microscopy of tumors and early neoplasm lesions (LNT) were examined. High Mo intake did not cause any general DMH toxicity as assessed by body weight gain. The groups treated with Mo and the groups treated with W showed an increase and decrease of hepatic Mo content respectively. At the end of the first month, the hepatic content of Mo was 4,65 ppm in the group treated with Mo and at the second month was 5,61 ppm, compared with the control group 2,61 ppm and 2,18 ppm and the group treated with W 0,70 ppm and 0,96 ppm respectively. A significantly lower incidence of tumors was observed in the Mo group (47), compared with the control group given DMH alone (105) and the group treated with W (113). On the other hand, the group treated with Mo showed a significant decrease in the number of multiple tumors per rat.

## INTRODUCCION

En los seres humanos, los tumores epiteliales del intestino constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en gran parte del mundo. El intestino grueso (IG), incluyendo el recto es la víscera en la que se origina el mayor número de neoplasias primarias de todo el organismo. Los tumores colorectales malignos, constituyen la segunda causa de muerte por cáncer, sólo superados por los de pulmón y próstata <sup>(15)</sup>.

Prácticamente el 98% de todos los cánceres del intestino grueso son adenocarcinomas, con una incidencia estimada de 134.000 nuevos casos por año y 55.000 fallecimientos, siendo esta enfermedad la responsable del 10% de todas las muertes relacionadas con el cáncer en los EEUU <sup>(15)</sup>.

Existen diferencias en la incidencia del cáncer de colon en diferentes países y aún en regiones dentro de un mismo país <sup>(21)</sup>. En términos generales los valores más altos de incidencia se observan en los EEUU, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Dinamarca, Suiza, Inglaterra, Uruguay y Argentina, mientras que los valores más bajos corresponden a los países de Asia, África y el resto de América del Sur <sup>(13)</sup>. Estos llamativos contrastes geográficos dependen de factores ambientales y especialmente de los hábitos dietéticos <sup>(15)</sup>.

La asociación entre cáncer de colon y dieta fue tema de muchas investigaciones; Burkitt <sup>(7)</sup> observó que en comparación con el occidente, donde el cáncer de colon es el segundo en incidencia seguido del cáncer broncogénico, en Africa el cáncer de intestino grueso es raro.

Las dietas en aquellas sociedades son ricas en vegetales, frutas, carbohidratos y fibras, contrastando con aquellas de occidente, caracterizadas por la ingestión de una gran cantidad de grasa de origen animal y pocas fibras <sup>(33)</sup>.

La dieta sugerida como factor de riesgo para el carcinoma de colon, incluye excesos de grasa en la alimentación y baja

ingesta de frutas, vegetales, fibra dietaria, calcio y otros micronutrientes <sup>(1)</sup>.

Aunque no puede descartarse una predisposición racial, se cree que una gran parte de estas diferencias geográficas son consecuencias de influencias ambientales.

El mayor respaldo de esta idea procede de la comparación de las tasas de mortalidad de los inmigrantes japoneses en EEUU y de los japoneses nacidos en EEUU de padres inmigrantes, con la de las personas que residen habitualmente en ambos países <sup>(96)</sup>.

Las tasas de mortalidad por cáncer de los inmigrantes japoneses de la primera generación son intermedias entre las de los nativos japoneses y las de los nativos de California. Este hecho apoya fuertemente la influencia de los factores ambientales y culturales y principalmente una influencia de tipo dietética.

En los últimos años, la proporción de mortalidad por carcinoma colorectal en Japón fue creciendo rápidamente y hay indicaciones de que su número podría superar al de los carcinomas gástricos <sup>(111)</sup>.

En la Argentina, datos de estudios realizados en la ciudad de La Plata y diversos partidos de la provincia de Buenos Aires <sup>(40,41)</sup>, indican un elevado índice de carcinoma de colon, principalmente en mujeres, con valores que superan a los máximos registrados a escala mundial, tales como los del estado de Connecticut en los EEUU.

Estudios epidemiológicos destacan que las sociedades que consumen dietas con alto contenido de carne roja y grasa de origen animal <sup>(34,125,126,129)</sup>, tienen mayor incidencia de cáncer de colon, explicando, en parte, el elevado porcentaje de esta afección en la Argentina y Uruguay, históricamente grandes consumidores de carnes rojas. Por otra parte, como fue mencionado anteriormente, la ausencia de fibras en la dieta está asociada con un alto riesgo de cáncer de colon.

El impacto de la fibra en la dieta en relación con el cáncer de colon en humanos está bien estudiado; se ha sugerido

que la fibra actúa como preventivo del cáncer de colon a través de uno o más mecanismos posibles: 1-aumentando la deposición fecal y por ello, disminuyendo la concentración de posibles carcinógenos en las heces, 2-produciendo cambios en la composición bacteriana del colon mediante la desactivación de metabolitos carcinogénicos por unión con el carcinógeno, cocarcinógenos y promotores en el intestino, 3-induciendo cambios estructurales y funcionales en la mucosa intestinal, incluyendo alteraciones de la proliferación celular o aceleración del tiempo de tránsito de la materia fecal a través del tracto intestinal, para asegurar que los carcinógenos del alimento o de otras fuentes, hagan menor contacto con la mucosa del colon (23, 86-88) y 4-aumentando la concentración de ácido butírico, que actuaría como protector anticancerígeno (18).

Por otra parte no sólo es importante el aumento del contenido de vegetales y de fibra asociada a una disminución del contenido de grasas sino también el tipo de fibras o de grasas, como fue probado en estudios experimentales con voluntarios humanos y en animales de laboratorio (10, 14, 52, 55, 61, 106, 108, 112, 113).

Con respecto al tipo de fibra son cada vez más numerosas las investigaciones que se realizan. En la Argentina estudios realizados sobre pacientes con diagnóstico de cáncer de colon demuestran la estrecha relación existente entre componentes de la dieta, tales como fibras y proteínas de origen animal y el riesgo de cáncer de colon (42, 43).

De Cosse (18) observó en pacientes con poliposis adenomatosa familiar una inhibición del desarrollo de neoplasias, así como disminución del número y tamaño de los pólipos en pacientes tratados con una dieta suplementada con fibra de trigo.

En un estudio realizado en 72 personas que recibieron una alta ingesta de grasa y moderadamente baja ingesta de fibra se comprobó que 21 excretaron altos niveles de mutágenos fecales.

Se interpretó que dichas sustancias eran importantes para la patogénesis del cáncer de colon. Aquellos con elevado nivel de mutágenos, luego recibieron dietas suplementadas con 10g de harina de trigo, avena o celulosa. Los resultados mostraron que los tratamientos con harina de trigo o celulosa, pero no la fibra de avena, redujeron significativamente la actividad de los mutágenos fecales y secundariamente de los ácidos biliares en el tratamiento grupal <sup>(91)</sup>.

Estudios experimentales con animales de laboratorio permitieron observar que ratas alimentadas con una dieta conteniendo 3,8% y 28,7% de fibra cruda, compuesta por celulosa o lignina, tenían el mismo efecto sobre el volumen de heces eliminadas. No obstante, la dieta con celulosa se asoció con una reducción en la incidencia de neoplasias colónicas inducidas con 1,2-Dimetilhidrazina (DMH). Además, la dieta con celulosa estuvo asociada con cambios del perfil bacteriano intestinal y la disminución del colesterol sérico <sup>(106)</sup>.

El elevado contenido en colesterol de las carnes rojas, potencia la síntesis de ácidos biliares en el hígado, los cuales a su vez pueden convertirse en carcinógenos potenciales por acción de las bacterias intestinales <sup>(91)</sup>.

Reddy y Winder <sup>(96)</sup> encuentran que las poblaciones que consumen dietas con un elevado porcentaje de grasa tienen una alta frecuencia de cáncer de colon y excretan mayor cantidad de ácidos biliares y metabolitos del colesterol que poblaciones con una baja incidencia de este tipo de cáncer.

Individuos sujetos a una dieta con alto contenido de grasa y carne vacuna presentaron una disminución de la excreción fecal de ácidos biliares, metabolitos del colesterol y de la microflora anaeróbica, cuando fueron cambiados a una dieta sin carne y con bajo contenido en grasa <sup>(6, 94, 95, 127)</sup>.

De esta manera, los estudios epidemiológicos, en diferentes poblaciones y experimentales, en animales de laboratorio, mantienen la hipótesis de que la composición de

ácidos grasos de la dieta es uno de los factores determinantes en la carcinogénesis del colon.

La incidencia de tumores del colon es reducida en animales de laboratorio alimentados con una dieta con alto contenido de dos tipos de ácidos grasos: omega-3 y omega-6 <sup>(90)</sup>. Esto refuerza los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones del Mediterráneo así como en esquimales, que presentan un bajo índice de cáncer de colon y cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva (ácido graso monosaturado) y el aceite de pescado, que contiene omega-3 <sup>(48)</sup>.

En un intento por comprender la etiología del cáncer de colon humano y de los factores que puedan actuar como promotores o iniciadores del mismo, se realizan cada vez con mayor frecuencia estudios experimentales y epidemiológicos con animales de laboratorio y con voluntarios humanos.

Algunos estudios epidemiológicos <sup>(92, 93)</sup> encuentran que las concentraciones de ácidos biliares secundarios, como el deoxicólico y el litocólico, así como la cantidad de mutágenos fecales, son más bajos en poblaciones consideradas como de bajo riesgo de cáncer de colon y que consumen dietas ricas en grasa y fibras, contra un grupo similar que consume una dieta rica en grasa y escasa en fibras.

Schneider <sup>(101)</sup>, elaboró la siguiente hipótesis en un intento por explicar la correlación entre una dieta rica en grasa y la producción de mutágenos fecales: una dieta rica en grasa eleva el nivel de ácido litocólico, el cual inhibe a la enzima glutatión S-transferasa, la cual detoxifica mutágenos fecales. La inhibición de esta enzima permite a dichos mutágenos persistir en las células epiteliales, mientras la proliferación es estimulada por ácidos biliares secundarios con una concomitante mayor frecuencia de neoplasias asociadas a mutaciones o mutágenos.

Elementos que apoyan esta hipótesis incluyen: 1-la capacidad de que concentraciones bajas del ácido litocólico inhiban a las isoformas de glutatión S-transferasa, halladas



en las células epiteliales del colon; 2-la correlación de neoplasias asociadas al colon, con altos niveles de ácido litocólico en la materia fecal. Por otra parte, valores de pH altos en la mucosa del colon, son identificados como exacerbantes de los efectos del ácido litocólico al incrementar su solubilidad. Además, dicho ácido en comparación con otros ácidos biliares secundarios, demuestra ser el mayor inhibidor de la glutatión S-transferasa.

Narisawa *et al* <sup>(72)</sup>, probaron el efecto promotor de los ácidos biliares taurodeoxicólico y litocólico en ratas. Para este fin fue utilizada como agente cancerígeno la N-metil-N-nitroso-N-nitrosoguanidina (MNNG), seguida de la aplicación repetida de ambos ácidos biliares sobre la mucosa colónica. Los resultados de esta experiencia mostraron un aumento del número de tumores en aquellas ratas iniciadas con MNNG y que recibieron los ácidos biliares, cuando se los comparó con el grupo en los que solo se administró el cancerígeno. No obstante, los ácidos biliares por si mismos no fueron suficientes para provocar neoplasias <sup>(72)</sup>, de lo que se deduciría que algunos ácidos biliares pueden actuar como promotores o aceleradores de la carcinogénesis del colon. Si bien los ácidos biliares fecales y ácidos grasos, son promotores del cáncer experimental del colon en ratas, en los seres humanos la influencia de los lípidos y de ácidos fecales sobre la proliferación epitelial rectal es desconocida <sup>(107)</sup>.

Por otra parte, estudios con animales de laboratorio, han demostrado que no solo la cantidad de grasa sino el tipo de grasa diferente en su composición de ácidos grasos, son importantes factores en la carcinogénesis experimental. Así, experiencias con ratas demostraron la importancia de diferentes tipos de aceites en la dieta sobre la incidencia del cáncer del colon. Dietas con diferentes tipos de aceites vegetales como de girasol, maíz, soja, así como los de origen animal: aceite de pescado y de bovino, mostraron variación en el desarrollo e incidencia del cáncer de colon  
(37, 53, 56, 74, 85, 97)

La incidencia de tumores fue incrementada en ratas, alimentadas con dietas conteniendo 23% de aceite de maíz, aceite de girasol, grasa de cerdo y/o vacuna, cuando fuera comparada con sus respectivos controles, con bajo contenido de lípidos (5%). Por otra parte, dietas conteniendo 23% de aceite de coco, aceite de oliva y pescado, no aumentaron la incidencia de tumores con respecto a sus respectivos controles. La falta de promoción de tumores colónicos por una dieta rica en aceite de pescado, parecería deberse a sus efectos sobre la actividad de la ornitina decarboxilasa de la mucosa y/o síntesis de prostaglandinas <sup>(89)</sup>.

Estudios epidemiológicos han relacionado la ingestión de calcio con una baja incidencia de cáncer. Una significativa disminución en el riesgo de cáncer, ha sido demostrada mediante el consumo de leche, dieta cálcica y productos lácteos en general. Así, la suplementación con calcio en la dieta o en el agua de bebida, ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio sobre la carcinogénesis experimental del colon <sup>(81)</sup>. Experimentos con dietas con alto contenido de calcio y vitamina D disminuyeron la incidencia del cáncer de colon en ratas <sup>(4,77)</sup>.

El Calcio participa en la progresión del ciclo proliferativo de las células epiteliales en todas sus fases, y dentro de estos estados también en la diferenciación celular, siendo su requerimiento intracelular, concentraciones muy bajas. Estos efectos del Calcio son modulados por su interacción con 1,25-dihidroxitamina D3, fosfatos y ácidos grasos, los cuales dependen parcialmente de su incorporación en la dieta.

Incrementos de  $Ca^{2+}$  en la dieta de roedores, inhibieron la hiperproliferación de células epiteliales del colon inducidos por niveles incrementados de ácidos grasos o de ácidos biliares presentes en el colon. Por otra parte, la hiperproliferación de células epiteliales del colon, fue disminuida por la adición de calcio en la dieta <sup>(77)</sup>.

En una experiencia con ratas que recibieron en la dieta altos niveles de calcio, en la forma de gluconato de Ca y de vitamina D3, se observó un 45% menos de incidencia de tumores, comparados con otros ocho grupos, en los cuales hubo variaciones en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y de vitamina D3 (4).

Con el propósito de determinar si altos niveles de calcio en la dieta pueden inhibir la inducción de tumores en ratas inyectadas con una dosis de DMH (200mg/kg), se las alimentó 2 semanas antes con una dieta conteniendo 5% de grasa y 4 niveles de gluconato de Ca: 0,2%; 0,5%; 1% y 2%. El nivel de Calcio recomendado por la Academia Nacional de Ciencias, Consejo Nacional de Investigaciones, es de 0,5% de  $\text{Ca}^{2+}$ . En esta experiencia se observó que ratas alimentadas con niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  por encima o por debajo del nivel recomendado de 0,5%, tenían menos tumores del colon (47).

Aunque existe acuerdo general de que el calcio en la dieta es protector de la carcinogénesis colónica, hay una considerable controversia sobre la eficacia relativa del contenido iónico de calcio en los suplementos. En otra experiencia, en la cual se trabajó con cuatro compuestos diferentes de Calcio, (fosfato de Ca, caseína, lactato y una combinación de carbonato / fosfato 50:50); se observó que el fosfato cálcico y la caseína cálcica dieron como resultado una menor concentración fecal de ácido litocólico y menor cantidad de ácidos biliares fecales, que aquellas dietas suplementadas con lactato de Ca, o en la formula combinada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otra parte, en el colon proximal, se observó un menor número de células por cripta en animales tratados con fosfato de Ca en comparación con aquellos que recibieron lactato de Ca en la dieta. Estos resultados sugieren que el fosfato de calcio, puede inhibir la incidencia de tumores del colon, más efectivamente que el lactato de Ca, esto es así, porque el grupo de ratas con fosfato de Ca, tenía un menor índice proliferativo que el grupo con lactato de Ca (60).

Por otra parte en otro estudio se comprobó que ratas suplementadas con  $\text{Ca}^{2+}$  redujeron la proliferación celular, pero no redujeron la carcinogénesis <sup>(3)</sup>.

La inhibición de la fase de promoción en la carcinogénesis experimental inducida con azoximetano en ratas Fisher-344 fue provocada con una dieta con 0,32% de Ca en la forma de lactato de Ca. Dicha dieta inhibió también, el desarrollo de adenocarcinomas del colon <sup>(120)</sup>.

En otra experiencia en la cual se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley, alimentados desde el destete con una dieta rica o pobre en vitamina E y con suplementación de calcio, se observó que tanto la deficiencia de vitamina E como la suplementación con  $\text{Ca}^{2+}$  redujeron la incidencia de tumores inducidos con DMH <sup>(64)</sup>.

Se observó que la incidencia de mutaciones K-ras fue disminuida por un régimen con suplementación de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual también disminuyó la frecuencia de tumores múltiples en ratas, tanto como el tamaño de los mismos <sup>(44)</sup>.

La suplementación con calcio, antes y durante las inoculaciones semanales de DMH (total 26 semanas) no modificó la incidencia de cáncer de colon en ratas <sup>(105)</sup>.

Se investigó la relación entre el desarrollo de cáncer de colon y recto en pacientes humanos y diez elementos inorgánicos, incluyendo potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre, fósforo y selenio. Dicha investigación mostró que a excepción del sodio y del selenio, los otros elementos reducen el riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal <sup>(130)</sup>.

En un intento por determinar la asociación de distintos elementos que pudieran influir en la carcinogénesis del intestino grueso, se han realizado investigaciones con animales de laboratorio. En ese sentido se obtuvo disminución de la incidencia de tumores del colon mediante diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio <sup>(69)</sup>. Utilizando el hidróxido de magnesio durante el tratamiento con dos tipos diferentes de carcinógenos intestinales, (DMH y acetato de

metilazoxi metanol (MAM)), se observó que el magnesio actuaba disminuyendo la incidencia de cáncer colónico, indicando que dicho elemento probablemente suprimiría la proliferación de células epiteliales del intestino grueso, en las ratas tratadas con los carcinógenos <sup>(69)</sup>.

Dietas suplementadas con selenio disminuyeron la formación de tumores del colon en ratas <sup>(24, 63)</sup>, demostrando que la deficiencia de dicho elemento perjudicaría la capacidad de detoxificación del hígado y esto podría explicar la toxicidad del carcinógeno DMH en ratas. La suplementación con selenio, produjo una disminución en la incidencia del cáncer experimental del colon en ratas. Sin embargo, no se han realizado estudios referentes a la participación del selenio en las diferentes etapas y secuencias de la carcinogénesis del colon. Se demostró que el almacenamiento de selenio no participa como un factor importante en la formación "de novo" de pólipos. Sin embargo, los niveles disminuyeron en pacientes con cáncer colónico, este dato debería ser tenido en cuenta ya que, pacientes con pólipos y bajos niveles de selenio, pueden ser de alto riesgo para la transformación maligna <sup>(24)</sup>.

Se observó que la deficiencia de selenio, perjudica la capacidad de respuesta de detoxificación, tanto del hígado como del colon ante el estrés agudo generado por la DMH, esto en parte explicaría la toxicidad que puede tener la DMH en ratas con deficiencia de selenio <sup>(80)</sup>.

En otro estudio, fue investigado el efecto de difluormetilornitina (DFMO), inhibidor de la ornitina decarboxilasa (ODC) y la suplementación con selenio sobre la formación de tumores inducidos con DMH. Los resultados demostraron una significativa disminución de tumores cuando la dieta fue suplementada con selenio en combinación con DFMO <sup>(63)</sup>.

Trabajos experimentales realizados en ratas en los que las dietas fueron suplementadas con hierro, no demostraron una asociación con la carcinogénesis del colon <sup>(28, 29)</sup>; sin embargo dependiendo de la forma de administración del hierro utilizado

en la dieta, existiría una cierta relación con la producción de tumores. Así en una experiencia donde se suplementó la dieta con citrato de amonio férrico (0,46% Fe), sulfato ferroso (0,11% Fe) y sulfato de amonio férrico (0,12% Fe), se observó que el grupo alimentado con sulfato de amonio férrico mostró un significativo aumento de tumores en la porción del colon distal <sup>(29)</sup>.

En otro estudio, donde se midió la asociación entre niveles de ferritina sérica y la presencia de adenomas de colon en pacientes humanos, se pudo observar que existe una aparente dosis-respuesta, para niveles de ferritina sérica y riesgo de adenoma, sugiriendo que la exposición al hierro, puede estar relacionada a la formación de adenomas <sup>(75)</sup>.

Ratas alimentadas con diferentes especies de germanio desarrollaron menos tumores y este efecto fue mayor con germanio orgánico natural en comparación con germanio orgánico e inorgánico <sup>(45)</sup>.

Otras experiencias con ratas alimentadas con deficiencia de cobre, mostraron alta incidencia del cáncer de colon inducido por DMH, así como también una alta incidencia en el número de tumores por rata y en el tamaño de los tumores <sup>(22,32)</sup>.

La alta incidencia de cáncer de esófago en Bantú, Sudáfrica <sup>(8)</sup>, China <sup>(58)</sup> y Rusia <sup>(76)</sup>, fue atribuida al consumo de agua y dietas provenientes de suelos pobres en molibdeno.

Estudios referentes a los efectos de suplementación con vitaminas y minerales, incluido el molibdeno (Mo), sobre poblaciones de alto riesgo de cáncer de esófago y estómago en China, demostraron la importancia del Mo en la disminución de la incidencia de este tipo de cáncer <sup>(17,118)</sup>.

La alta incidencia del cáncer de esófago en Bantú, Sudáfrica <sup>(8)</sup>, en China <sup>(58)</sup> y en Rusia <sup>(76)</sup>, fue atribuida al consumo de agua y alimentos provenientes de suelos pobres en Mo.

Niveles de Mo en suero, cabello y orina de habitantes de áreas de alto riesgo de cáncer de esófago (CE), han mostrado ser más bajos, que aquellos de áreas de bajo riesgo de CE (19).

También se observó que el agua de bebida de una zona de alto riesgo de CE en Rusia tenía bajo contenido de Mo, en comparación a otra zona con baja incidencia de CE (76).

El molibdato de sodio ( $\text{Na}_2 \text{Mo O}_4$ ) administrado en el agua de bebida a una concentración de 2 mg/l redujo la incidencia de cáncer de esófago y estómago, inducidos con N-nitrososarcosina etil ester (NSEE) en ratas machos Sprague-Dawley (59).

El Mo en la dieta a 2 ppm inhibió significativamente el carcinoma de células escamosas del esófago inducidos por N-metil-N-benzilnitrosamina en ratas F344 (51).

La incidencia de tumores de la glándula mamaria inducidos por N-nitroso-N-metilurea (NMU) fue más baja en ratas Sprague-Dawley recibiendo 10mg/l de molibdato de sodio en el agua de bebida comparado con los controles (102,121).

El dicloruro de Molibdeno inhibió el desarrollo de tumores ascíticos de Ehrlich en ratones (50).

Por otra parte, ha sido reportado que la alta ingestión de Mo en ratas no interfiere con el metabolismo del cobre. Luo et al (59), suplementando el agua de bebida con Mo no observaron diferencias en el contenido de Cu hepático ni en la excreción urinaria del mismo, en ratas.

Igarza et al (39) observaron que en ratas suplementadas con Mo a la dosis de 500 ppm, la molibdenosis no afectó la actividad de la enzima dependiente de Cu como la ceruloplasmina, llevando sí, a un aumento de la concentración hepática de Mo.

Se ha observado que el tungsteno (W) interviene en la absorción de molibdeno (Mo) (20). Así, Luo et al (59) a fin de provocar deficiencia de Mo, suplementaron con 100 y 200 ppm de tungsteno en el agua de bebida, provocando deficiencia del molibdeno hepático.

Topham *et al* <sup>(114)</sup> afirmaron que el efecto del tungsteno (W) en ratas es extremadamente específico y que no produce síntomas y/o signos de toxicidad.

Del análisis de la bibliografía consignada se desprende que el Mo, juega un papel importante en varios modelos de carcinogenesis experimental en ratas y ratones.

No se han encontrado trabajos referentes a la deficiencia y/o suplementación de Mo relacionados al cáncer experimental de colon en ratas, por lo que es válido pensar que diferentes concentraciones de Mo podrían influir sobre el desarrollo del cáncer de colon en ratas.

## HIPOTESIS

La molibdenosis y la deficiencia de molibdeno se relacionan con el desarrollo y la frecuencia de neoplasias del colon inducidas experimentalmente mediante la administración de 1,2-dimetilhidrazina.

## OBJETIVOS

El presente proyecto tuvo como objetivo principal estudiar la influencia de la molibdenosis y la deficiencia de molibdeno sobre la carcinogénesis experimental del colon en ratas. Para este fin los objetivos intermedios fueron los siguientes:



Caracterizar macroscópicamente las lesiones inducidas determinando la frecuencia, el tamaño y el tipo de neoplasia, en los diferentes segmentos del colon y en cada uno de los grupos experimentales.

Caracterizar microscópicamente las neoplasias en los diferentes segmentos del colon, considerando el tipo de neoplasia, grado de infiltración y metástasis, así como su localización en los diferentes segmentos del colon.

Caracterizar microscópicamente las lesiones neoplásicas tempranas (LNT) considerando su frecuencia y localización en los diferentes segmentos del colon.

Caracterizar mediante estudios histoquímicos, los cambios de las mucosustancias del epitelio superficial, en las LNT y en los tumores formalmente establecidos.

Caracterizar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) las LNT y los tumores, así como los cambios de la mucosa superficial en el intestino de ratas tratadas con DMH.

Analizar bioquímicamente los valores de molibdeno y de cobre en tejido hepático en todos los grupos experimentales.

Analizar en suero los niveles de cobre en todos los grupos experimentales.

## MATERIALES Y METODOS

### 1-Animales y ambiente experimental

Fueron utilizadas ratas Wistar "cepa Instituto de Biología", de 3 meses de edad y un peso promedio de 172,62 g, obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste.

Las ratas fueron alojadas en jaulas metálicas durante 10 meses en ambiente con temperatura controlada entre 23°C a 25°C, con agua y dieta "ad-libitum". A fin de evitar contaminaciones químicas del medio ambiente y de los animales no tratados con DMH, los mismos fueron alojados en salas separadas.

### 2- Plan experimental

En total fueron utilizadas 156 ratas, las que fueron divididas al azar en 2 grupos con diferentes lotes de la siguiente manera:

#### GRUPO CONTROL (sin DMH)

Lote 1 (sin tratamiento).....n=26  
 Lote 3 (tratado con Mo).....n=26  
 Lote 4 (tratado con W).....n=26

#### GRUPO EXPERIMENTAL (con DMH)

Lote 2 (tratado con DMH).....n=26  
 Lote 5 (tratado con Mo+DMH).....n=26  
 Lote 6 (tratado con W+DMH).....n=26

Luego de un período de adaptación de 15 días a las nuevas condiciones ambientales de la sala de experimentación, se dio inicio al tratamiento.

En una primera etapa se indujo a los Lotes 3 y 5 a una molibdenosis mediante la administración de molibdeno (Mo). Al mismo tiempo se indujo a los Lotes 4 y 6 a una deficiencia secundaria de Mo mediante la administración de tungsteno (W). Ambos tratamientos fueron continuados durante 6 meses.

El Molibdeno fue administrado en la forma de molibdato de amonio  $[(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  (peso molecular: 1.235,85) en el agua de bebida a una concentración de 200 ppm.

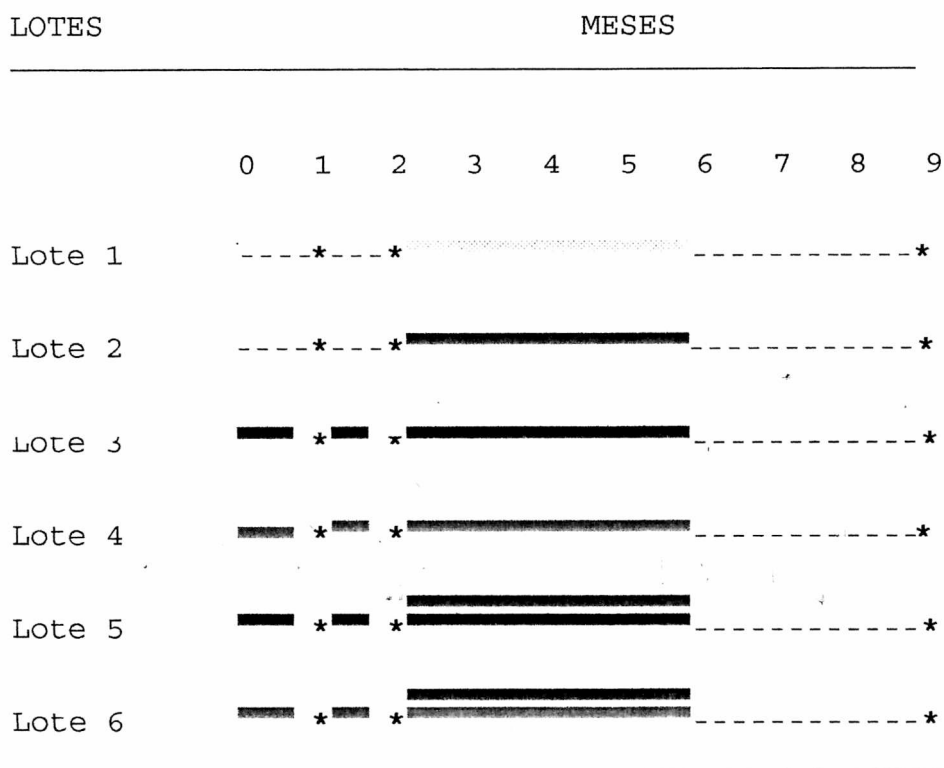
El Tungsteno fue administrado en el agua de bebida a una concentración de 200 ppm, en la forma de tungstenato de sodio  $(\text{Na}_2 \text{WO}_4)$  (peso molecular: 329,86).

Al final del primer y segundo mes del tratamiento con Mo y W fueron sacrificadas 3 ratas de cada uno de los 6 lotes a fin de evaluar en tejido hepático las concentraciones de Mo y Cu; en suero fueron evaluadas únicamente las concentraciones de Cu.

Posteriormente (inicio del 3° mes) se administró a los Lotes 2, 5 y 6, la droga cancerígena DMH por vía subcutánea a razón de 20 mg/kg de peso corporal semanalmente y durante 16 semanas. La inoculación de la droga DMH fue realizada en las primeras horas de la mañana. Todos los animales fueron sacrificados 3 meses posteriores a la última inoculación de la DMH.

Todos los animales fueron pesados desde el inicio de la experiencia y hasta el final de la misma semanalmente.

En el siguiente esquema se presenta el protocolo experimental.

Protocolo experimental

..... Inoculación de la Solución control (sin DMH)

■ Inoculación de la DMH

■ Administración de Molibdato de Amonio (Mo)

■ Administración de Tungsteno (W)

\*\*\* Sacrificio de animales

### 3- Preparación de la solución de 1,2-dimetilhidrazina (DMH)

Fue utilizada "Symmetrical Dimethylhidrazina Dihydrochloride" (Sigma Chem. Co.) disuelta en una concentración de 400mg/100ml de solución de agua bidestilada estéril conteniendo 37 mg/100ml de EDTA como agente estabilizador.

Esta solución fue llevada a pH 6,5 mediante la adición de 8 a 10 gotas de NaOH 10N. La solución de DMH fue preparada cada semana inmediatamente antes de la inoculación.

### 4- Preparación de la solución control

Fue utilizada la misma solución control anteriormente descripta pero sin el agregado de DMH, llevando a pH 6,5 mediante el agregado de NaOH 10N.

### 5- Preparación de la solución de molibdeno

La solución de la sal de molibdeno fue preparada en el agua de bebida a una concentración de 200 ppm de amolibdato de amonio. Para este fin primero se calculó en base a la fórmula y al peso molecular, la cantidad de Mo a agregar por litro de agua a fin de alcanzar la concentración de 200 ppm (368mg/l). Cada semana se prepararon 10 litros de la solución.

### 6- Preparación de la solución de tungsteno

La solución de la sal de tungsteno fue preparada en el agua de bebida a una concentración de 200 ppm de tungstenato de sodio, que correspondían a 413mg/l. Cada semana se prepararon 10 litros de la solución.

## 7- Evaluaciones durante la experiencia

### 7.1-General

Todos los animales de cada uno de los lotes fueron examinados diariamente aprovechando el momento de la limpieza, consignándose las modificaciones físicas y de comportamiento.

### 7.2- Peso corporal

Todos los animales fueron pesados en el inicio del experimento y cada semana durante los cuatro meses de inoculación con la droga cancerígena; posteriormente fueron pesados cada 30 días hasta el momento del sacrificio. Para el análisis estadístico del peso corporal se utilizó un diseño en medidas repetidas. Previo al análisis de la variancia se testearon los supuestos de Normalidad y Homogeneidad.

### 7.3- Determinación de las concentraciones de Mo y Cu en tejido hepático y en suero

La determinación de las concentraciones de Mo y Cu fueron realizadas en dos momentos, durante la suplementación con Mo y W: a los 30 días (primer mes del experimento) y a los 60 días (segundo mes del experimento). Para este fin fueron seleccionadas al azar 3 ratas de cada lote para cada momento (1<sup>er</sup> mes y 2<sup>o</sup> mes). Las mismas fueron sacrificadas mediante una sobredosis inhalatoria de éter etílico, aprovechándose el momento de sedación para extraer sangre y seguidamente extraer el hígado, el cual fue colocado en estufa para ser desecado y luego triturado y molido. Estas muestras de tejido hepático fueron enviadas al

Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Especializado del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de la Estación Experimental Balcarce, donde se determinaron las concentraciones de Mo y Cu mediante un espectrofotómetro de absorción atómica.

De la misma manera, las muestras de suero para las determinaciones de Cu fueron enviadas al Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Minerales, perteneciente al Departamento de Fisiopatología de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, donde fueron determinadas mediante un espectrofotómetro de absorción atómica, (marca GBC, modelo 906) con una lámpara catódica, específica para cobre.

#### **8- Sacrificio y toma de muestras**

Todas las ratas fueron sacrificadas al final del experimento. El sacrificio fue realizado durante la mañana y no más de 10 animales por día. Para tal fin los mismos permanecieron con ayuno previo de 24 horas. Como método de eutanasia fue utilizado una sobredosis de éter etílico, aprovechándose el momento de la sedación para extraer sangre en momentos previos a la muerte.

Luego de esto se efectuó una incisión mentopubiana, abordándose la cavidad torácica y abdominal con el objeto de observar posibles alteraciones de los órganos y extraer el tracto gastrointestinal.

## 9- Procesamiento del material y examen macroscópico

Se realizó la separación del estómago, intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG). Seguidamente el IG fue abierto longitudinalmente, realizándose un corte sobre el lado opuesto a la inserción mesentérica, a fin de observar la mucosa y la presencia de lesiones.

Luego se procedió a lavar la mucosa a fin de eliminar restos de materia fecal. El IG, fue extendido sobre una plancha de cartón, y adherido mediante alfileres para inmediatamente ser fijado en formol bufferado al 10% durante 24hs.

Con el IG extendido, lavado y fijado se procedió a realizar mediante lupa el examen macroscópico. Se evaluó el número, el tamaño, la forma y la localización de los tumores en las distintas porciones del intestino grueso. Para tal fin el IG fue dividido anatómicamente en 4 partes: recto (porción que va desde el ano hasta los 3 a 3,5 cm, incluye la placa de nódulos linfoides asociados a la mucosa), colon distal (se extiende desde los 3 a 3,5cm hasta los 12,5 cm del ano, midiendo aproximadamente 9 cm), colon proximal (mide de 5,5 a 6,5 cm, se extiende desde el final del colon distal hasta su unión con el ciego) y por último el ciego <sup>(57)</sup>.

Los tumores macroscópicamente fueron clasificados en 2 categorías: tumores polipoides: con sus variantes, pediculado y de base sésil y tumores no polipoides: con sus variantes, plano y ulceroinfiltrante <sup>(103)</sup>.

Todos los tumores fueron extraídos con parte de la mucosa comprometida y procesados para su posterior estudio microscópico.

El resto del intestino grueso fue cortado en segmentos y enrollados sobre sí mismos siguiendo la técnica de "Swiss-roll" <sup>(99)</sup>, los extremos de cada cilindro fueron atados con hilo a fin de que los mismos no se desarmaran durante el proceso previo a su



inclusión en parafina. De esta manera se pudo obtener una gran cantidad de intestino en cada preparado histológico.

Posteriormente, los tumores y cada uno de los cilindros fueron procesados según la técnica histológica clásica para bloques parafinados.

Todo el material fue cortado en micrótomos tipo Minot, en 5 $\mu$ m de espesor, coloreados con la técnica de Hematoxilina y Eosina y las técnicas histoquímicas del PAS y Alcian blue a pH 2,5.

Para el análisis del número de tumores por rata y por lote, se aplicó un diseño no paramétrico mediante el estadístico de Kruskal-Wallis, apoyado por un análisis de la variancia de los datos ranqueados.

#### 10- Estudio histológico e histoquímico

Fueron analizados cada uno de los segmentos del IG, a fin de detectar lesiones neoplásicas y displásicas agrupadas estas últimas, como lesiones neoplásicas tempranas (LNT).

Microscópicamente los tumores fueron clasificados en: Adenomas, Adenocarcinomas y Carcinomas. Los Adenomas fueron clasificados en: Adenoma Tubular (AT), Adenoma Velloso (AV) y Adenoma Tubulovelloso (ATV); en esta nomenclatura se consideró que para clasificarlos como AT, la arquitectura tubular debía ocupar más del 75% de la superficie del pólipo; AV, aquellos en los que la arquitectura vellosa debía superar más del 50% del pólipo y ATV, aquellos donde la arquitectura vellosa debía suponer entre el 25% y el 50% del total tumoral.

Los Adenocarcinomas fueron clasificados en <sup>(83)</sup>: Adenocarcinoma Tubular (ACT), Adenocarcinoma Velloso (ACV) y Adenocarcinoma con ambos patrones tubular y velloso (ACTV); mientras que los Carcinomas fueron clasificados en: Carcinoma de

células en anillo de sello (Ccas), Carcinoma mucinoso (Cmu) y Mixto.

Una vez realizado este estudio microscópico de los tumores, fue confeccionada una tabla para ver la localización de los mismos en las cuatro porciones anatómicas en que fue dividido el intestino grueso.

Para el análisis estadístico se aplicó un diseño no paramétrico en bloques, mediante el estadístico Friedman a dos vías.

Fue evaluado también el grado de infiltración del tumor, siguiendo los métodos propuestos por Muto *et al* <sup>(70)</sup> y Madara *et al* <sup>(62)</sup> en los cuales se considera la infiltración de células neoplásicas en la muscular de la mucosa, con compromiso de la submucosa, muscular, serosa y/o tejido pericolónico y las metástasis.

Los cambios de las mucosustancias del epitelio superficial, de las LNT y de los diferentes tipos de tumores fueron estudiados por histoquímica mediante las técnicas del PAS y Alcian blue a pH 2,5.

#### **11-Procesamiento para el estudio mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Para el estudio con MEB, se procedió a lavar el intestino con glutaraldehído al 3%, en 0,1M de buffer cacodilato de sodio; luego se extrajo la porción de intestino a estudiar (no mayor a 1cm x 1cm) al cual se lo adhirió sobre una plancha de cartón mediante alfileres, para ser fijado durante 2 hs en glutaraldehído al 3%.

Dicho material fue posteriormente deshidratado con alcoholes de graduación creciente (55°, 75°, 96°, 96°, 100°) con pasajes de una hora en cada uno. Posteriormente dicho material fue inmerso

en acetona, para luego ser secado a punto crítico, montado sobre un cabo de aluminio y cubierto con oro-paladium.

El estudio fue realizado mediante el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 5800LV.

## 12- Estudio ultraestructural mediante (MEB)

Fueron estudiados los cambios morfológicos de la superficie mucosa, la morfología de las criptas sobre los tumores y la zona vecina a los mismos. También se estudió la presencia y características de las LNT, así como los cambios morfológicos de la superficie apical de las células en las LNT.

## 13- Protocolo de seguridad para el uso de la DMH.

### Manipulación de la droga:

a- Material necesario: guantes, máscara, gorro, frasco de 2 litros de solución neutralizante (Solución de Permanganato de Potasio).

Bolsas de residuos marcadas con cinta roja y llenas de aserrín. Jeringas y agujas descartables.

b- Para la manipulación de la droga se cubrió la mesa con papel de diario.

Luego de la manipulación de la droga, se eliminó todo el material utilizado dentro de la bolsa de residuos, previo tratamiento con solución neutralizante.

### Higiene de la sala de inoculación:

- \* La puerta de entrada fue marcada.
- \* El horario de entradas y salidas fue prefijado.
- \* El acceso fue limitado a las personas involucradas con el trabajo experimental.
- \* Las personas debieron entrar con guardapolvo, máscara, gorro y guantes. Al salir fue eliminado todo el material utilizado en bolsas de residuos, para su posterior incineración.

### Almacenamiento de la droga:

La DMH, fue almacenada en una heladera, la que estuvo dentro de la sala de inoculación.

La manipulación de pequeñas cantidades de la droga fue realizada una vez por semana durante el período de inoculación.

### Sacrificio:

- Las personas encargadas del sacrificio usaron guardapolvo, guantes, gorro y máscara.
- El sacrificio fue realizado en la misma sala donde se alojaron los animales durante el experimento.
- La mesa de trabajo fue cubierta con papel de diario.

- El instrumental utilizado luego del sacrificio fue sometido a la sustancia neutralizante durante 24 horas.
- Guardapolvo, gorro, máscara, restos de cadáveres, papel de diario, etc. fueron sometidos a la sustancia neutralizante y luego incinerados.

## RESULTADOS

### 1-Observaciones generales

Todos los animales de los 6 lotes, se adaptaron a las condiciones del bioterio y a los diferentes tratamientos durante los 9 meses que duró la experiencia. Al final del noveno mes se observó en algunos animales aumento del volumen abdominal, eliminación de materia fecal con sangre y exteriorización de tumores a través del ano (Figura 1).

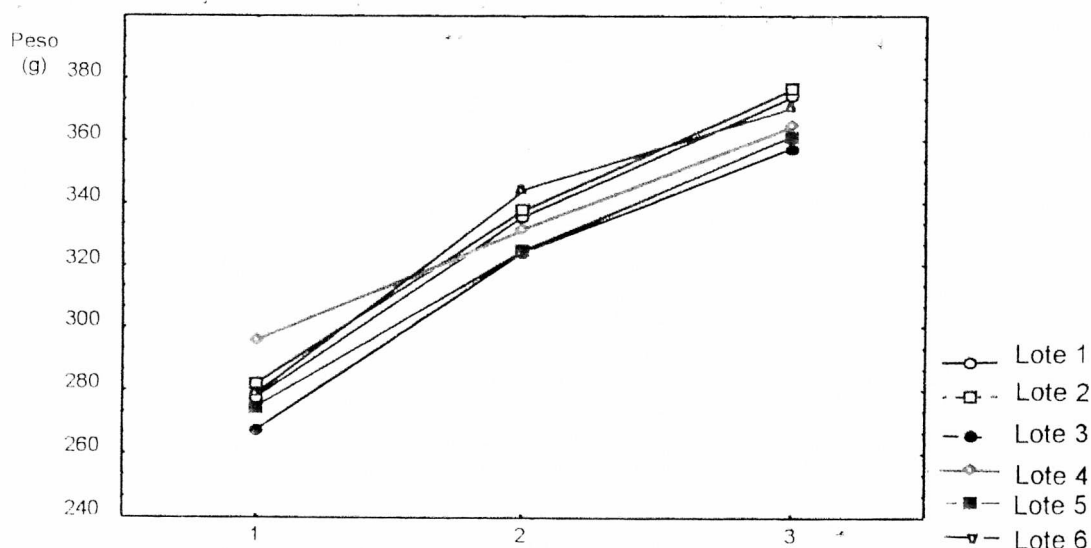


Figura 1: Rata con prolapso rectal y exteriorización de tumores a través del ano.

## 2-Peso corporal

La totalidad de los animales ganaron peso durante los 9 meses que duró la experiencia (Efecto tiempo  $p < 0,001$ ). En tanto que no hubo efecto tratamiento entre lotes sobre la variable peso corporal (Figura 2). Tampoco se observaron diferencias de peso durante los 4 meses de inoculación de la droga cancerígena en los diferentes lotes tratados.

En el Anexo 1, se registran los valores individuales de peso corporal en los 3 momentos estudiados, así como los valores promedios de cada uno de los lotes.



**Figura 2:** Evolución del peso corporal expresado en gramos, en los seis lotes analizados en tres momentos. 1: final del 2do mes de tratamiento con Mo y W; 2: final del tratamiento con DMH, correspondiente al 6to mes de la experiencia y 3: final de la experiencia al 9º mes. Lote 1 (sin tratamiento), Lote 2 (DMH), Lote 3 (Mo), Lote 4 (W), Lote 5 (Mo+DMH), Lote 6 (W+DMH).

### 3- Cu y Mo en tejido hepático

La determinación de Mo en tejido hepático demostró que al final del 1° y 2° mes del tratamiento con Mo y W, se produjo un aumento significativo de la concentración hepática de Mo en las ratas tratadas con este elemento ( $p < 0,001$ ) y disminución, aunque no significativa del mismo elemento, en las ratas de los lotes tratados con W (Figura 3).

No se observaron modificaciones de los niveles de Cu hepático en ninguno de los lotes experimentales, (Tabla 1).

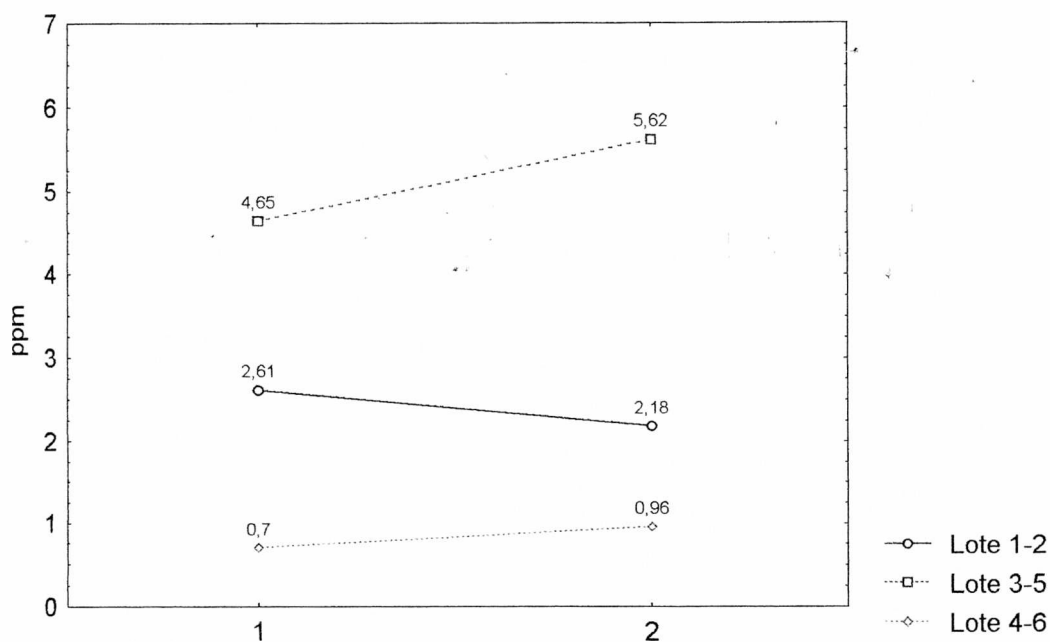


Figura 3: Concentraciones promedio de Mo hepático en todos los lotes, realizados en dos momentos: 1=(final del 1° mes del tratamiento con Mo y W) y 2=(final del 2° mes del tratamiento con Mo y W), ( $p < 0,001$ ).

Lote 1(sin tratamiento), Lote 2(DMH), Lote 3(Mo), Lote 4(W), Lote 5(Mo+DMH), Lote 6(W+DMH).



Tabla 1: Valores de cobre y molibdeno (expresado en ppm) en tejido hepático, realizados en 3 ratas seleccionadas al azar de cada lote, al final del 1º y 2º mes de la suplementación con Mo y W, antes de la inoculación con DMH.

LOTES	1º mes		2º mes	
	Cu	Mo	Cu	Mo
LOTE 1	12,0	2,6	12,2	2,1
	12,5	2,5	11,5	2,1
	12,2	2,8	11,7	2,0
X	12.23	2.63	11.8	2.06
DS	.205480	.124721	.294392	.047140
LOTE 2	12,5	2,7	11,5	2,8
	11,5	2,6	11,0	2,1
	12,0	2,5	12,0	2,0
X	12	2.6	11.5	2.3
DS	.166666	8.16496	.408248	.355902
LOTE 3	12,2	4,1	12,0	4,8
	13,0	4,3	12,0	6,1
	12,0	3,3	12,5	5,8
X	12.4	3.9	12.16	5.56
DS	.432049	.432049	.235702	.555777
LOTE 4	12,5	0,7	12,7	0,8
	13,0	0,4	12,5	0,8
	11,5	0,7	11,5	0,9
X	12.33	.6	12.23	.83
DS	.623609	.141421	.524933	.047140
LOTE 5	12,5	4,7	11,5	6,8
	13,0	6,6	11,7	5,8
	11,0	4,9	12,5	4,4
X	12.16	5.4	11.9	5.6
DS	.849836	.852447	.432049	.984321
LOTE 6	11,5	0,8	10,5	1,2
	11,5	0,7	11,5	1,1
	10,5	0,9	11,5	1,0
X	11.16	.8	11.16	1.1
DS	.471404	8.164965	.471404	8.164965

Lote 1: sin tratamiento, Lote 2: tratado con DMH, Lote 3: tratado con Mo, Lote 4: tratado con W, Lote 5: tratado con Mo+DMH, Lote 6: tratado con W+ DMH.

X: media, DS: desvío estándar.

## 4- Cu en suero

El análisis estadístico del analito Cu en suero, no mostró diferencias significativas en los 6 lotes estudiados. En la Tabla 2 se expresan los valores de Cu en suero expresados en  $\mu\text{g/l}$ , en todos los lotes, previo a la inoculación con DMH.

Tabla 2: Niveles de cobre en suero, expresado en  $\mu\text{g/l}$  realizados en 3 ratas seleccionadas al azar de cada lote, al final del 1° y 2° mes de la suplementación con Mo y W, previo a la inoculación con DMH.

LOTES	1 <sup>er</sup> mes	2° mes
LOTE 1	1,23492	1,58788
	1,39536	1,83904
	1,21960	1,10688
LOTE 2	1,26577	1,36854
	1,35635	1,28466
	1,22480	1,21660
LOTE 3	1,28088	1,21912
	1,35452	1,07272
	1,26676	1,61012
LOTE 4	1,80612	1,55432
	1,29380	1,36828
	2,05812	1,86464
LOTE 5	1,27592	1,21276
	1,54680	1,14164
	1,23722	1,17896
LOTE 6	1,38652	1,14564
	1,02696	1,41624
	1,46756	1,22244

Lote 1: sin tratamiento, Lote 2: tratado con DMH, Lote 3: tratado con Mo,  
Lote 4: tratado con W, Lote 5: tratado con Mo+DMH y Lote 6: tratado con W+ DMH.

## 5- Examen macroscópico del Intestino Grueso (IG)

En el estudio macroscópico del IG se consideró en cada uno de los animales de los diferentes lotes: el número, el tamaño, y la forma de los tumores.

### 5.1- Número de Tumores

Macroscópicamente el Lote 2 (DMH) presentó en total 86 tumores; el Lote 5 (Mo+DMH) 42 tumores y el Lote 6 (W+DMH) 109 tumores. Estos números cambiaron cuando se realizó el estudio microscópico encontrándose mayor número de tumores por rata. Correspondiendo un total de 105 tumores en el Lote 2 (DMH), 47 tumores en el Lote 5 (Mo+DMH) y 113 tumores en el Lote 6 (W+DMH).

No se observaron tumores en los lotes 1, lote 3 y lote 4.

La frecuencia de tumores por rata y por lote es presentada en la Tabla 3.

En el Lote 2 (DMH) el máximo número de tumores por rata fue de 14 en una rata, seguido de 10 tumores en otra, en el Lote 6 (W+DMH) dos ratas presentaron 10 tumores cada una, mientras que en el Lote 5 (Mo+DMH) el máximo número de tumores fue de 6 en dos ratas.

El promedio de tumores por rata (t/r) en el Lote 2 (DMH) fue de 5,25; en el Lote 5 (Mo+DMH) fue de 2,35 (t/r) y en el Lote 6 (W+DMH) fue de 5,65 (t/r).

El análisis cuantitativo demostró que las ratas tratadas con Mo redujeron significativamente el número de tumores en el Lote 5 (Mo+DMH), al ser comparado con los otros dos lotes. De la misma manera el promedio de tumores por rata (t/r) fue significativamente menor en este lote. Para detectar diferencias se utilizó el estadístico Kruskal-Wallis= 17,51; usando la aproximación  $X^2$  arrojó un  $p=0,001$ . El análisis de la variancia de los Rank de la cantidad de tumores por rata por tratamiento fue de  $F=12,03$  ( $p<0,001$ ).

Tabla 3: Número de tumores por rata (Nº de t/r) en cada uno de los lotes tratados con DMH.

Lotes	Lote 2 (DMH)	Lote 5 (Mo+DMH)	Lote 6 (W+DMH)
Ratas	Nº de t/r	Nº de t/r	Nº de t/r
1	2	2	6
2	5	1	3
3	5	3	7
4	6	1	3
5	5	1	7
6	5	3	2
7	3	0	6
8	8	5	6
9	3	2	10
10	14	4	2
11	4	1	6
12	6	1	4
13	8	1	2
14	2	4	7
15	10	6	8
16	5	3	2
17	3	0	6
18	4	6	10
19	2	3	8
20	5	0	8
Total tumores	105	47	113
x Aritmética	5,25	2,35	5,65
x de los Rank	35,1	17,4	39,0

Nº de t/r : número de tumores por rata

No se observaron diferencias significativas entre los Lotes 2 (DMH) y 6 (W+DMH), (Figura 4).

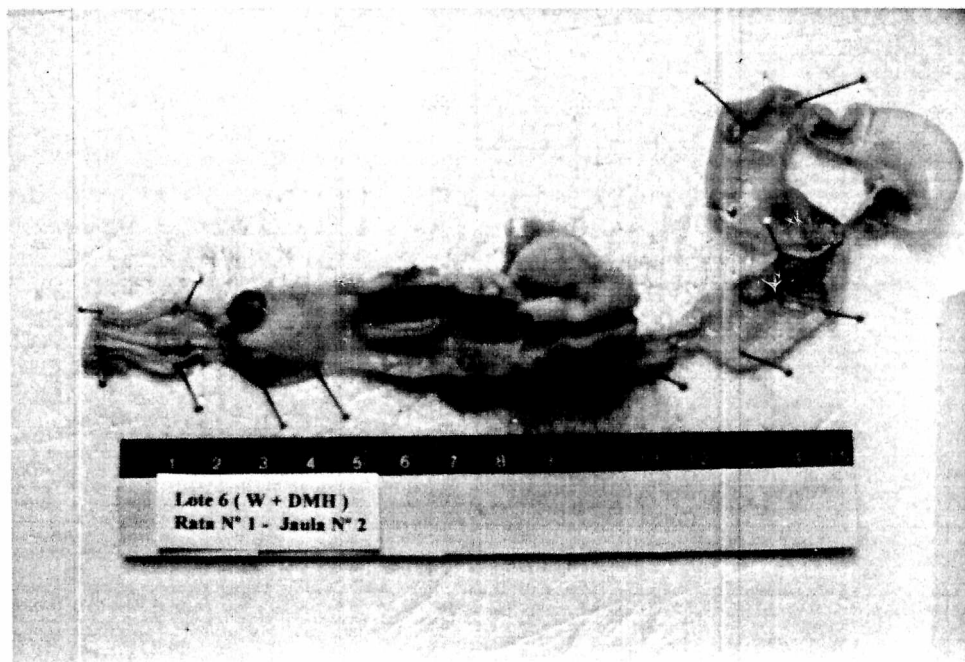


Figura 4: Intestino grueso de rata con deficiencia de molibdeno, se observan múltiples tumores localizados en recto, colon distal, colon proximal y ciego.

## 5.2 - Tamaño

El tamaño de los tumores osciló desde 1 milímetro hasta más de 30 mm. Los mismos fueron agrupados según los siguientes rangos: entre 1-5 mm, 6-10 mm, 11-15 mm, 16-20 mm y más de 20 mm, (Tabla 4).

**Tabla 4:** Tamaño de tumores agrupados en diferentes rangos en los tres lotes tratados con DMH.

Tamaño	1-5mm	6-10mm	11-15mm	16-20mm	+ 20mm	Total
Lote 2 (DMH)	33 (38,37)	42 (48,84)	8 (9,30)	1 (1,16)	2 (2,32)	86
Lote 5 (Mo+DMH)	14 (33,33)	18 (42,86)	6 (14,29)	2 (4,76)	2 (4,76)	42
Lote 6 (W+DMH)	40 (36,70)	54 (49,54)	10 (9,17)	2 (1,83)	3 (2,75)	109
Total	87 (36,70)*	114(48,10)*	24 (10,13)*	5 (2,11)*	7 (2,95)*	237

\* Corresponde al porcentaje de tumores de cada rango, sobre el total de 237.

( ) Corresponde al porcentaje de tumores en cada rango, sobre el total de tumores de cada lote.

El mayor porcentaje de los tumores en los tres lotes se ubicó en los rangos que van entre 1 a 5 mm y entre 6 a 10 mm.

Analizando los tres lotes en los rangos que van de 11 mm a más de 20 mm, se puede observar que a pesar de que el Lote 5 (Mo+DMH) presentó menor número de tumores, el porcentaje de tumores en esos tres rangos fue de 23,81%, al compararlo con el Lote 2 (DMH) con 12,78% y el Lote 6 (W+DMH) con 13,75%.

En la Figura 5 se pueden observar pequeños tumores en el ciego y en la Figura 6 un tumor mayor de 20 mm.

### 5.3- Forma

Los tumores fueron clasificados en dos grandes grupos: polipoides y no polipoides o planos. A su vez estos dos grandes grupos se subdividieron: los polipoides en pediculado y sésil y los no polipoides en plano y ulceroinfiltrante.

El Lote 2 (DMH) presentó en total 86 tumores, correspondiendo 56 a la forma polipoide (65,11%) y 30 a la forma no polipoide (34,88%).



Figura 5: Ciego y parte del colon proximal. En ciego se observan tumores ulcerados, planos y polipoides menores a 1cm de eje mayor (flechas), correspondientes a una rata del Lote 2 (DMH).



Figura 6: Tumor de gran tamaño, de tipo ulceroinfiltrante localizado en la porción media del colon distal, con crecimiento expansivo en tejido pericolónico (flecha) correspondiente a una rata del Lote 2 (DMH).

De los 56 tumores polipoides, 36 fueron sésiles (41,86 %) (Figura 7) y 20 fueron pediculados (23,25 %); dentro de los 30 tumores no polipoides, 25 fueron planos (29,06 %) y 5 fueron ulceroinfiltrantes (5,81 %) (Tabla 5).

El Lote 5 (Mo+DMH) presentó en total 42 tumores, correspondiendo 20 tumores a la forma polipoide (47,61%) y 22 tumores no polipoides (52,38%).

Del total de 20 tumores polipoides, 12 fueron pediculados (28,47%) y 8 fueron sésiles (19,04%); dentro de los 22 no polipoides, 21 fueron planos (50 %) y solo 1 ulceroinfiltrante (2,38 %).

El lote 6 (W+DMH) presentó en total 109 tumores, correspondiendo 48 tumores a la forma polipoide (42,47%) y 61 no polipoides (53,98%).

Del total de 48 tumores polipoides 43 fueron sésiles (39,44%) y 5 pediculados (4,58%), (Figura 8); dentro de los no polipoides, 56 fueron planos (51,37%), (Figura 9) y 5 fueron ulceroinfiltrantes (4,58 %), (Figuras 10 y 11).

Tabla 5: Frecuencia de los diferentes tipos de tumores en los tres lotes tratados con DMH.

Tipo de tumor	P.Pedic.	P.Sesil	Plano	Ulceroinf.	Total
Lote 2 (DMH)	20 (23,25)	36 (41,86)	25 (29,07)	5 (5,81)	86
Lote 5 (Mo+DMH)	12 (28,57)	8 (19,05)	21 (50,00)	1 (2,38)	42
Lote 6 (W+ DMH)	5 (4,58)	43 (39,45)	56 (51,38)	5 (4,59)	109
Total	37 (15,61)*	87 (36,70)*	102 (43,04)*	11 (4,64)*	237

\* Corresponde al porcentaje de cada tipo de tumor, sobre el total de 237 tumores

() Corresponde al porcentaje del número de tumores en cada lote

P.Ped: Polipoide Pediculado; P.Sesil: Polipoide sesil; Ulceroinf: Ulceroinfiltrante



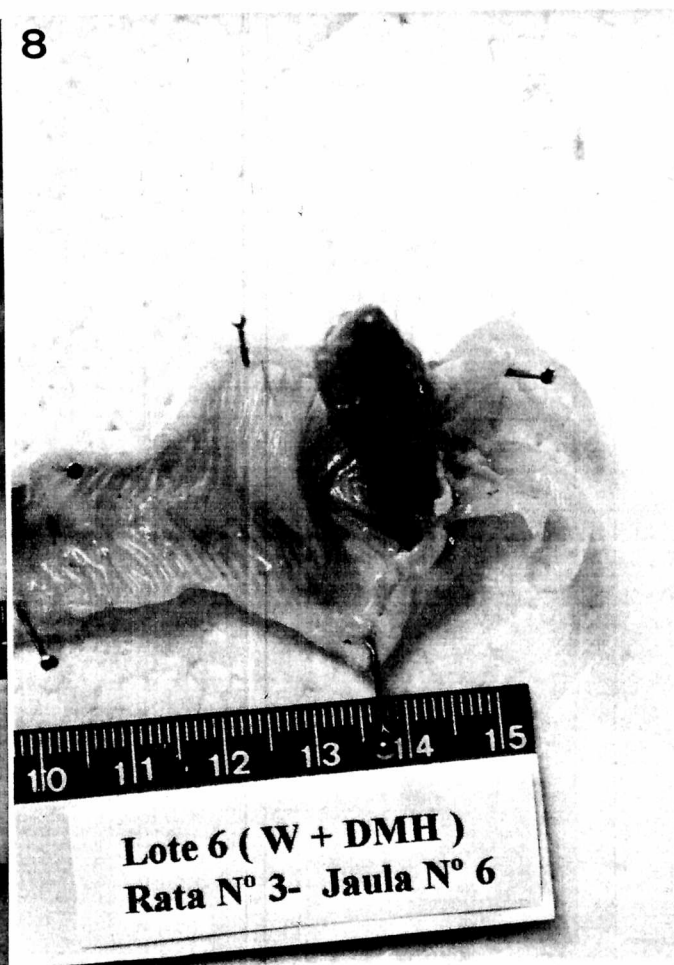
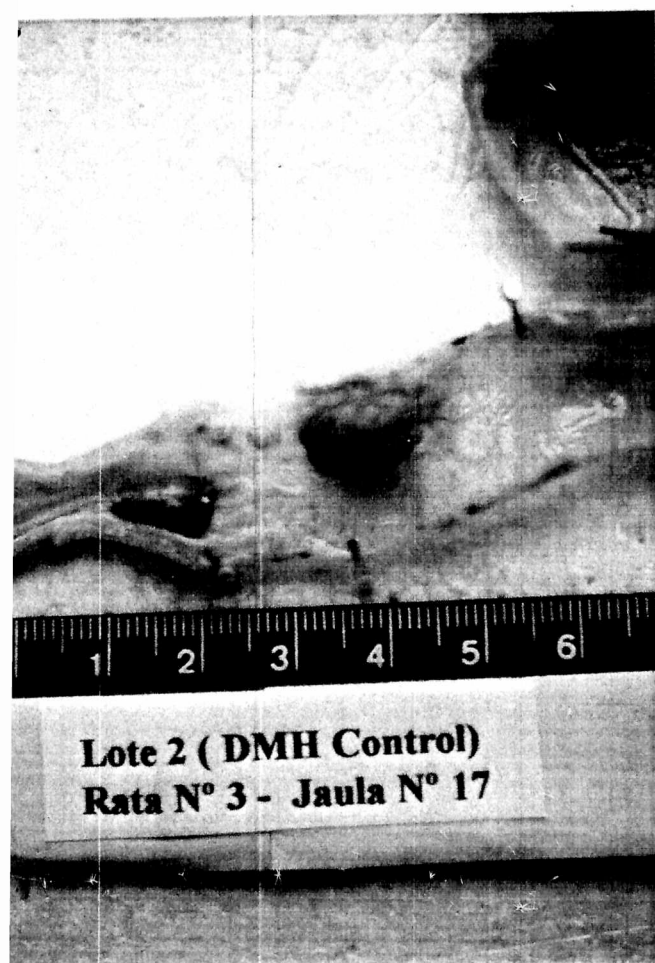


Figura 7: Dos tumores de gran tamaño de tipo polipoide sésil en el colon distal correspondiente a una rata del Lote 2 (DMH).

Figura 8: Tumor polipoide pediculado, mayor a 20 mm de eje mayor ubicado en la porción final del colon proximal, correspondiente a una rata del Lote 6 (W+DMH).

Figura 9: Dos tumores planos localizados en el colon proximal, la flecha indica un pequeño tumor plano con superficie ulcerada en el ciego, correspondiente a una rata del Lote 6 (W+DMH).

Figura 10: Tumor plano ulceroinfiltrante en el colon distal, las flechas indican el grueso pedículo de un tumor polipoide seccionado al medio, correspondiente a una rata del Lote 6 (W+DMH).

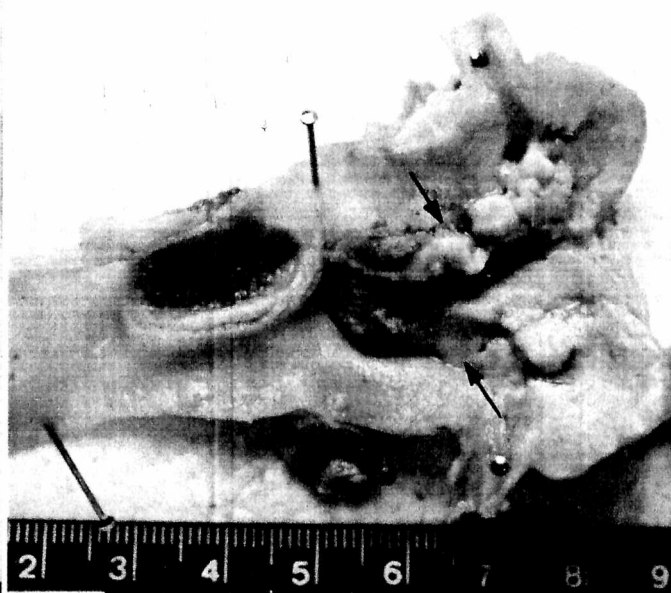
Figura 11: Tumor plano ulceroinfiltrante en el colon distal, con excesivo crecimiento en la serosa, correspondiente a una rata del Lote 6 (W+DMH).

9

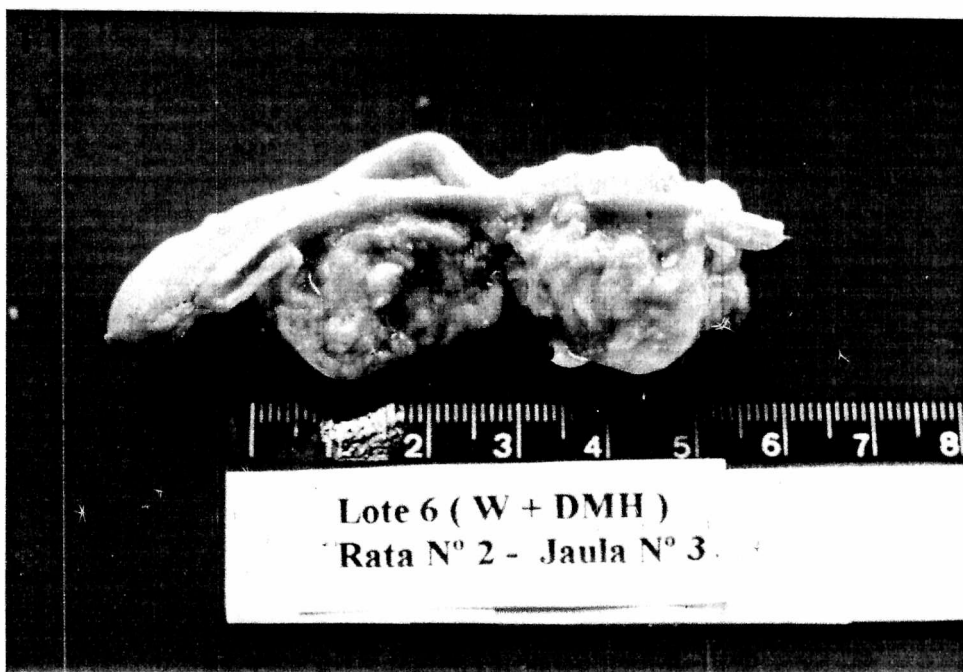


**Lote 6 ( W + DMH )  
Rata N° 1 - Jaula N° 2**

10



**Lote 6 ( W + DMH )  
Rata N° 1 - Jaula N° 2**



**Lote 6 ( W + DMH )  
Rata N° 2 - Jaula N° 3**

Analizando los tres lotes tratados con DMH, se puede observar que los grupos suplementados con Mo y W no mostraron grandes diferencias entre sí, en lo referente a los porcentajes de tumores polipoides y no polipoides, no obstante el Lote 2 (DMH), muestra mayor número de estos últimos tumores (polipoides).

Por otra parte, analizando los cuatro tipos macroscópicos de tumores (Figura 12), se observa que en el Lote 2 (DMH) la forma polipoide sésil fue la más numerosa, representando el 41,86% del total de tumores de ese lote; mientras que en los Lotes 5 (Mo+DMH) y 6 (W+DMH), los tipos de tumores mas numerosos fueron los planos, representando en el Lote 5, el 50% del total y en el Lote 6 el 51,37% del total de tumores para ese grupo.

Con referencia al tipo ulceroinfiltrante, el porcentaje fue similar entre el Lote 2 (DMH) con 5,81% y el Lote 6 (W+DMH) con 4,59%, no obstante el porcentaje fue significativamente menor en el Lote 5 (Mo+DMH), ( $X^2 = 27,5$ ;  $p < 0,001$ ).

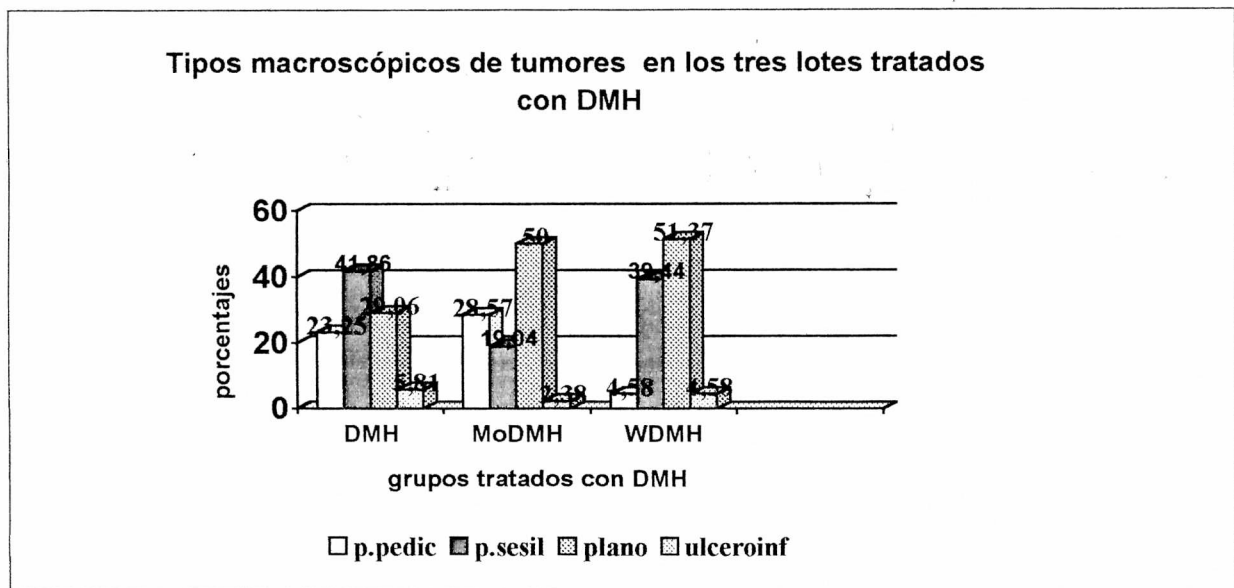


Figura 12: Porcentaje de los cuatro tipos macroscópicos de tumores en los tres lotes tratados con DMH.

p.pedic: polipoide pediculado; p.sesil: polipoide sésil; ulceroinf: ulceroinfiltrante.

## 6- Examen microscópico del Intestino Grueso(IG)

El examen microscópico del IG consistió en determinar la presencia de tumores y de Lesiones Neoplásicas Tempranas (LNT) así como las características histológicas, histoquímicas y ultraestructurales de las mismas. En dicho estudio se pudo detectar tumores microscópicos que no habían sido identificados durante el estudio macroscópico (Figura 13 y Figura 14-a,b)

Se realizó el estudio histológico de cada tumor, considerando el tipo histológico, la frecuencia de cada tipo, la localización, el grado de invasión y metástasis. Con respecto a las LNT se consideró su localización en los diferentes segmentos del IG.



Figura 13: Pequeño adenocarcinoma tubular plano que se extiende a lo largo y en todo el espesor de la mucosa (H y E 40x).

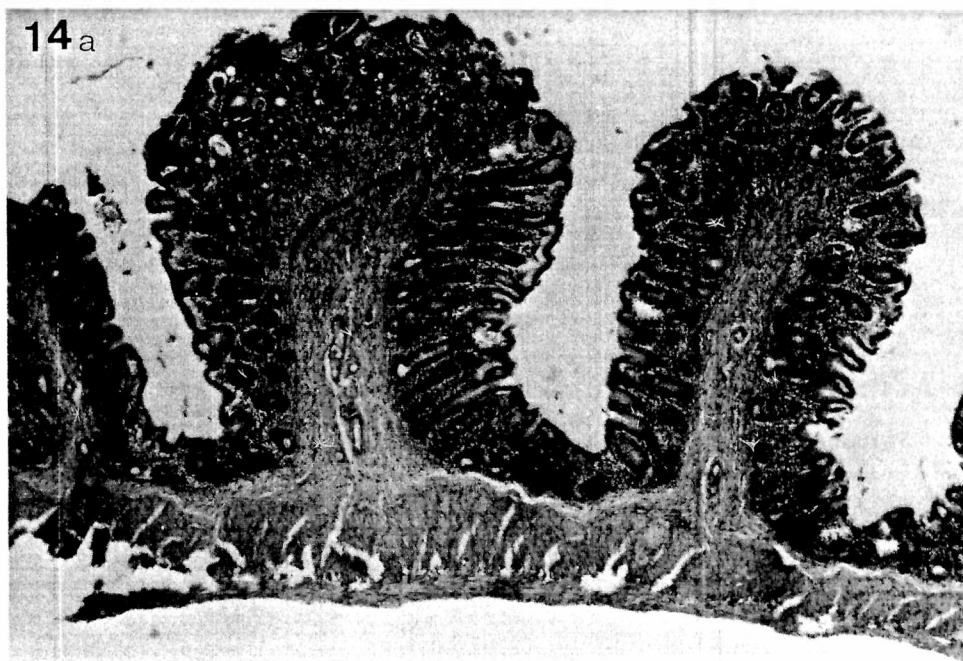


Figura 14: (a) Pequeño carcinoma en la mucosa del colon distal (H y E 40x); (b) se destaca a mayor aumento el compromiso de la mucosa e infiltración de las células neoplásicas a través de la muscular de la mucosa (H y E 100x).

## 6.1- Tipo histológico

Microscópicamente los tumores fueron clasificados en: Adenomas, Adenocarcinomas y Carcinomas. Los Adenomas se dividieron en: Adenoma tubular (AT) y Adenoma tubulovelloso (ATV); los Adenocarcinomas en: Adenocarcinoma tubular (ACT), Adenocarcinoma velloso (ACV), Adenocarcinoma con ambos patrones tubular y velloso (ACTV) y los Carcinomas en: Carcinoma de células en anillo de sello (Ccas), Carcinoma mucinoso (Cmu) y Mixto.

En la Tabla 6 se especifican los tipos histológicos de tumores estudiados, distribuidos en cada uno de los lotes tratados con DMH.

Tabla 6: Frecuencia de los diferentes tipos histológicos de tumores en los tres lotes tratados con DMH.

Tipo histol.	AT	ATV	ACT	ACV	ACTV	Ccas	Cmu	Mixtos	Total
Lote 2 (DMH)	10 (9,52)	-	39 (37,14)	-	10 (9,52)	33 (31,43)	1 (0,95)	12 (11,43)	105
Lote 5 (Mo+DMH)	6 (12,76)	-	13 (27,66)	1 (2,13)	-	15 (31,91)	10 (21,28)	2 (4,25)	47
Lote 6 (W+DMH)	20 (17,70)	9 (7,96)	38 (33,63)	-	8 (7,08)	28 (24,78)	2 (1,77)	8 (7,08)	113

( ) corresponde al porcentaje de cada tipo histológico sobre el total de tumores de cada lote.

Los AT, se caracterizaron por ser principalmente microscópicos, con un crecimiento exofítico, cuyas glándulas presentaron diversos grados de displasia. Las glándulas en estos AT microscópicos estaban revestidas con epitelio neoplásico, con células altas, hipercromáticas, con escasa diferenciación mucosa

y arquitectura desordenada (Figura 15). En los AT de mayor tamaño se observó un tallo o pedículo formado por tejido fibromuscular y vasos sanguíneos provenientes de la submucosa.

Los ATV, se caracterizaron por presentar entre un 25% y 50% de su estructura con características vellosas, estando el resto ocupado por estructuras tubulares.

Los ACT, se caracterizaron por presentar un intenso crecimiento exofítico y por la infiltración de sus células en la submucosa, capas musculares y serosa, formando masas de células indiferenciadas (Figura 16 a). Estos tumores presentaron abundante desarrollo de un estroma fibroso (Figura 16 b).

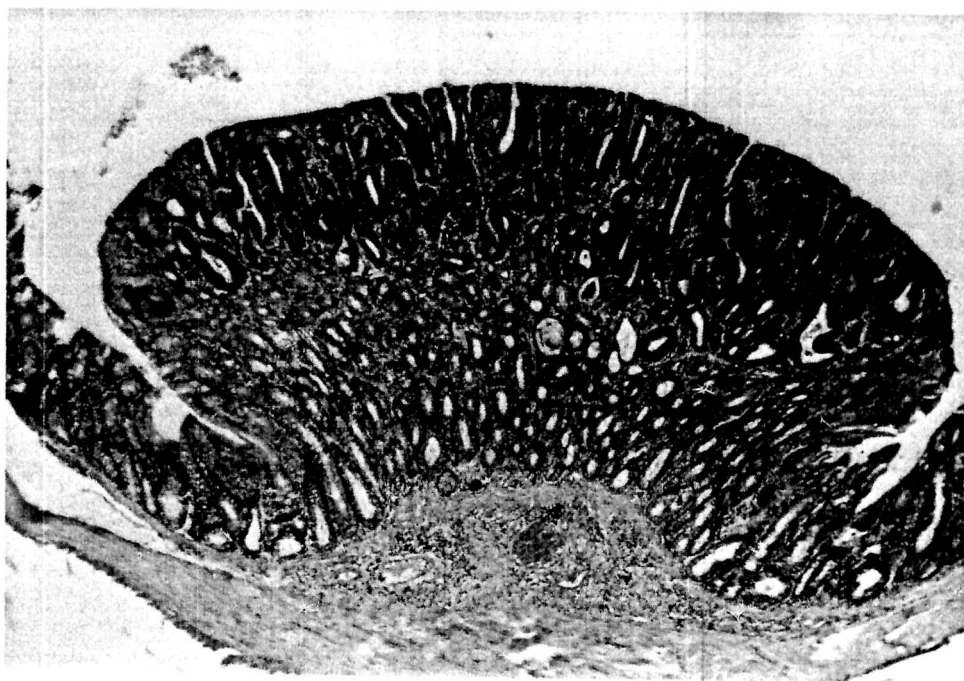


Figura 15: Adenoma tubular con crecimiento exofítico, glándulas con células hiper cromáticas en superficie, se observa engrosamiento fibroso y dilatación vascular en la submucosa (H y E, 40x).

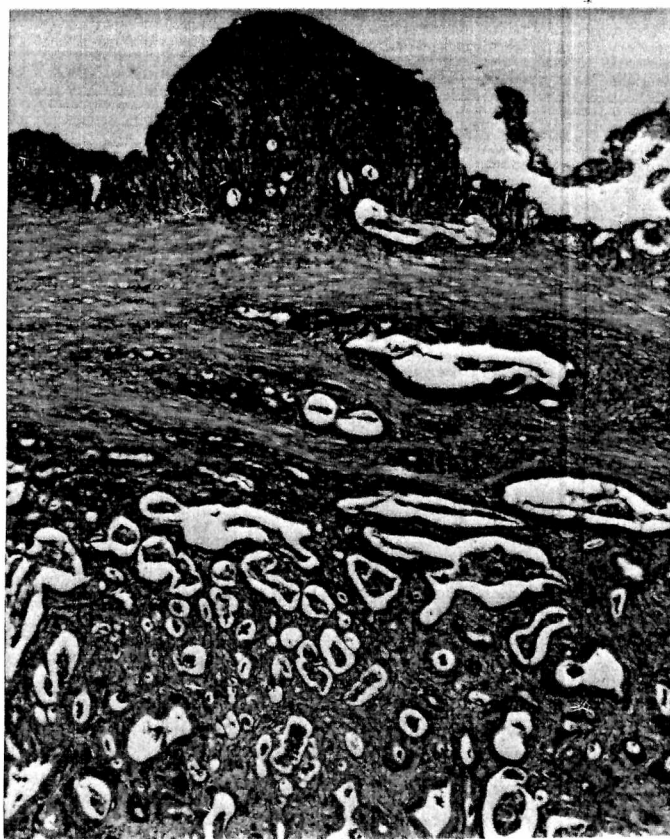


Figura 16(a): Adenocarcinoma tubular con crecimiento exofítico e infiltrativo comprometiendo las musculares y la serosa (H y E, 100x).

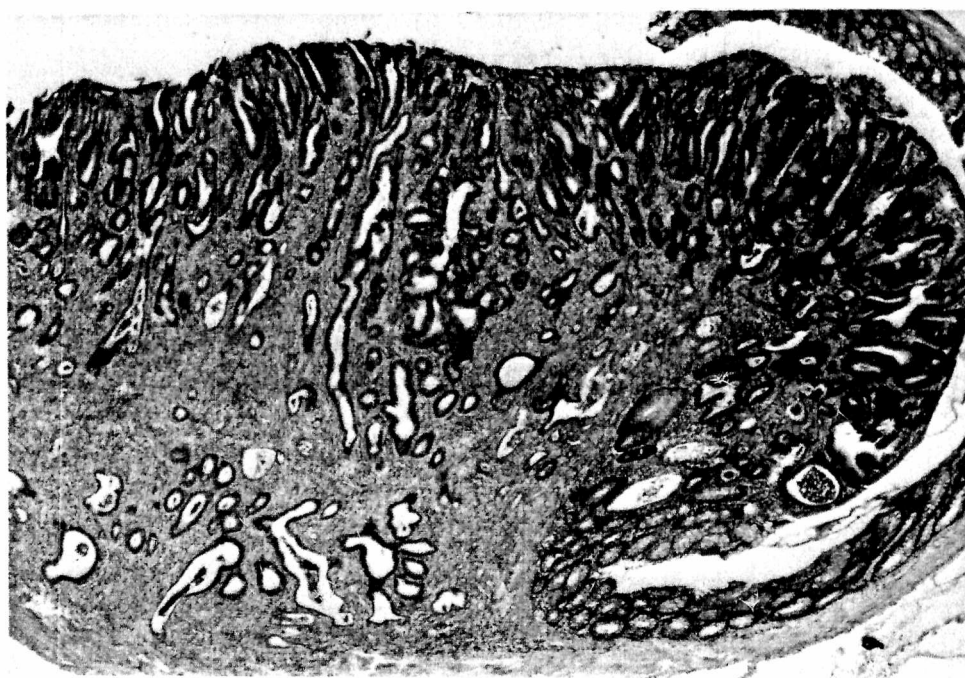
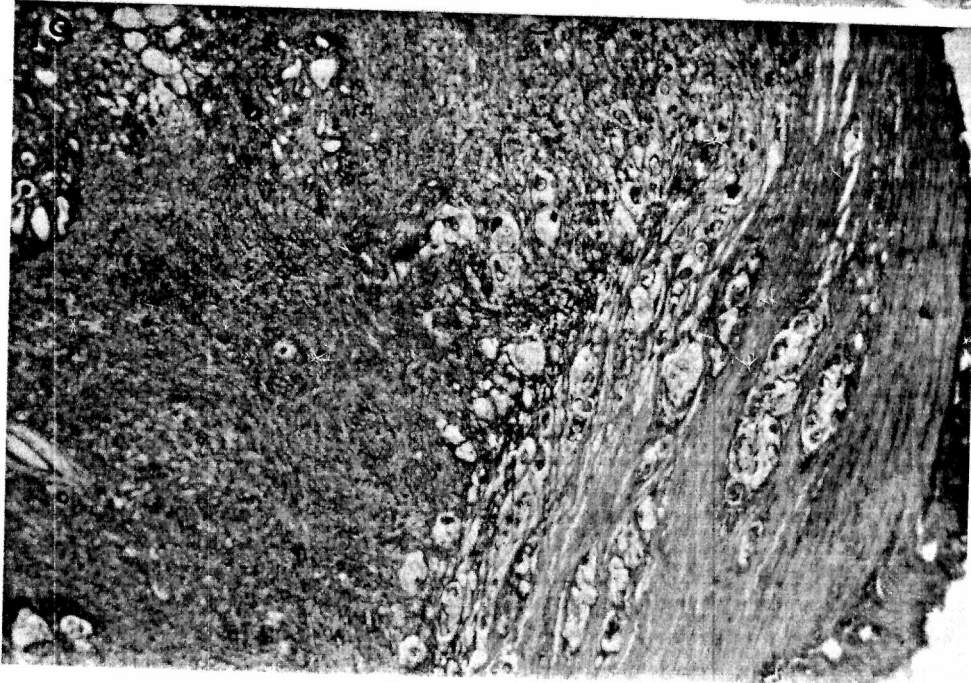
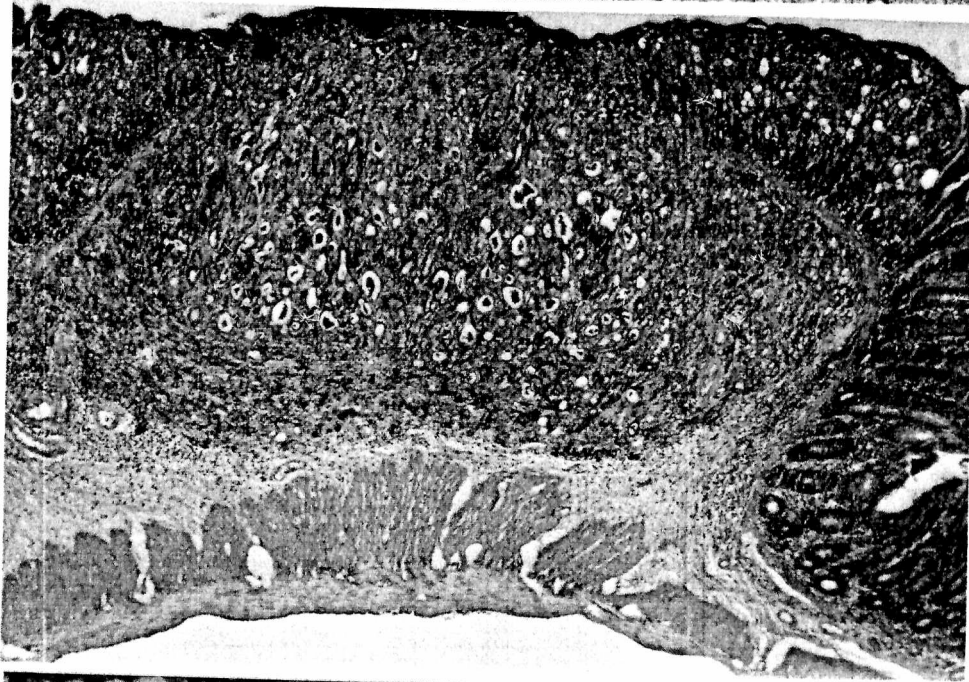


Figura 16(b): Sección de un adenocarcinoma tubular con crecimiento exofítico y abundante estroma fibroso, se observan glándulas dilatadas y tortuosas, con marcado patrón tubular (H y E, 40x).





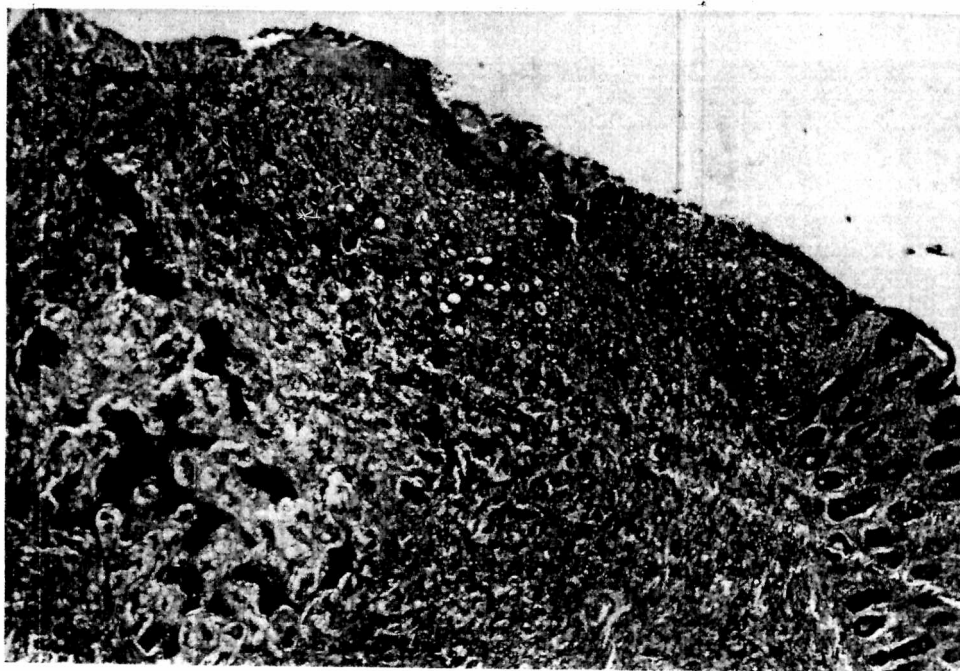


Figura 20: Sección de un Ccas con superficie ulcerada y crecimiento infiltrativo por debajo de la muscular de la mucosa, presenta tejido con metaplasia cartilaginosa y ósea (H y E, 40x).

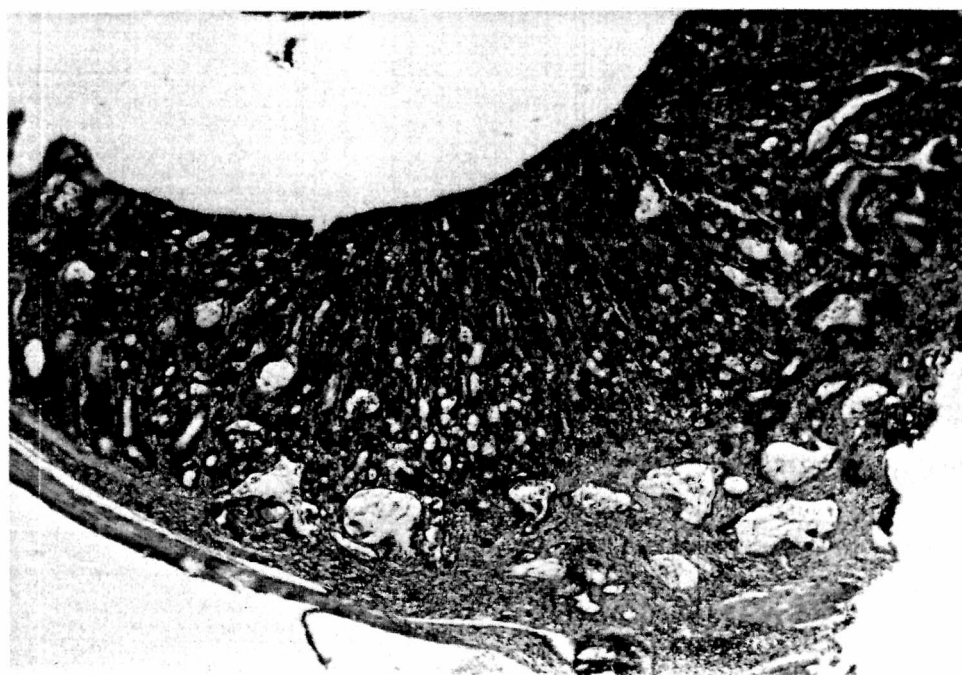


Figura 21: Tumor mixto que compromete todas las capas del intestino, se observa tejido neoplásico con patrón tubular, de células en anillo de sello y carcinoma mucinoso (H y E, 40x).

## 6.2- Frecuencia y localización de los diferentes tipos histológicos.

El Lote 2 (DMH) presentó 105 tumores, 86 hallados macroscópicamente y 19 en el estudio microscópico; siendo 10 Adenomas, 49 Adenocarcinomas y 46 Carcinomas. Los Adenomas fueron todos AT, los Adenocarcinomas fueron: 39 ACT y 10 ACTV y los Carcinomas fueron: 33 Ccas, 12 Mixtos y 1 Cmu.

Los Adenomas se localizaron en recto y colon distal. Los Adenocarcinomas y Carcinomas variaron en su localización dependiendo del tipo histológico. Los mismos representaron el 90,47% sobre el total, predominando los ACT con un 37,14% los cuales se localizaron preferentemente en el colon distal. En segundo orden de frecuencia se encontraron los Ccas 31,42%, los que se localizaron preferentemente en ciego (Tabla 7).

Tabla 7: Frecuencia y localización de los diferentes tipos histológicos de tumores estudiados en los cuatro segmentos del intestino, correspondiente al Lote 2 (DMH).

Localización	Recto	C.distal	C.prox.	Ciego	Total
<b>Tipo</b>					
AT	6 (24,00)	4 (8,88)			10 (9,52)*
ACT	15 (60,00)	22 (48,88)	2 (50)		39 (37,14)*
ACTV	4 (16,00)	6 (13,33)			10 (9,52)*
Ccas		4 (8,88)	1 (25)	28 (90,32)	33 (31,43)*
Cmu		1 (2,22)			1 (0,95)*
Mixtos		8 (17,77)	1 (25)	3 (9,68)	12 (11,43)*
<b>Total</b>	25 (23,81)*	45 (42,86)*	4 (3,81)*	31 (29,52)*	105 (100)*

\* Corresponde al porcentaje de tumores de cada tipo y en cada segmento del intestino, sobre el total de 105 tumores.

() Porcentaje correspondiente al tipo histológico de tumores, en cada segmento del intestino.

C.dist: colon distal; C.prox: colon proximal

El Lote 5 (Mo+DMH) presentó 47 tumores, 42 hallados macroscópicamente y 5 en el estudio microscópico. Del total de tumores, 6 fueron Adenomas, 14 Adenocarcinomas y 27 Carcinomas. Todos los Adenomas fueron AT; los Adenocarcinomas fueron: 13 ACT y 1 ACV y los Carcinomas fueron: 15 Ccas, 10 Cmu, 2 Mixtos.

Los Adenomas se localizaron en colon distal y recto; los Adenocarcinomas y Carcinomas variaron en su localización dependiendo del tipo histológico. Los mismos representaron el 87,23% sobre el total, predominando los Ccas con un 31,91% los cuales se localizaron con mayor frecuencia en ciego. En segundo orden de frecuencia se encontraron los ACT con 27,65 % los que se localizaron preferentemente en colon distal (Tabla 8).

Tabla 8: Frecuencia y localización de los diferentes tipos histológicos de tumores estudiados en los cuatro segmentos del intestino, correspondiente al Lote 5 (Mo+DMH).

Localización	Recto	C.distal	C.prox.	Ciego	Total
<b>Tipo</b>					
AT	2 (33,33)	4 (16)			6 (12,76)*
ACT	4 (66,66)	9 (36)			13 (27,65)*
ACV			1 (20)		1 (2,13)*
Ccas		5 (20)	2 (40)	8 (72,72)	15 (31,91)*
Cmu		6 (24)	1 (20)	3 (27,27)	10 (21,28)*
Mixtos		1 (4)	1 (20)		2 (4,25)*
<b>Total</b>	6 (12,76)*	25 (53,19)*	5 (10,64)*	11 (23,40)*	47 (100)*

\* Corresponde al porcentaje de tumores de cada tipo y en cada segmento del intestino, sobre el total de 47 tumores.

( ) Porcentaje correspondiente al tipo histológico de tumores en cada segmento del intestino.

C.dist: colon distal; C.prox: colon proximal

El Lote 6 (W+DMH) presentó 113 tumores, 109 hallados macroscópicamente y 4 en el estudio microscópico. Sobre este total de tumores, 29 fueron Adenomas, 46 Adenocarcinomas y 38 Carcinomas. Los Adenomas fueron: 20 AT y 9 ATV; los Adenocarcinomas fueron: 38 ACT y 8 ACTV y los Carcinomas fueron: 28 Ccas, 8 Mixtos y 2 Cmu.

Los Adenomas se localizaron en recto, colon distal y ciego; los Adenocarcinomas y Carcinomas variaron en su localización dependiendo del tipo histológico. Los mismos representaron el 74,33% sobre el total, predominando los ACT con un 33,62%, los cuales se localizaron con mayor frecuencia en colon distal, luego en recto, ciego y colon proximal respectivamente. En segundo orden de frecuencia se encontraron los Ccas, con 24,77%, los que se localizaron preferentemente en ciego (Tabla 9).

**Tabla 9:** Frecuencia y localización de los diferentes tipos histológicos de tumores estudiados en los cuatro segmentos del intestino, correspondiente al Lote 6 (W+DMH).

Localización	Recto	C.dist	C.prox	Ciego	Total
<b>Tipo</b>					
AT	10 (32,26)	9 (16,98)		1 (4,17)	20 (17,70)*
ATV	5 (16,13)	4 (7,55)			9 (7,96)*
ACT	10 (32,26)	25 (47,17)	1 (20)	2 (8,33)	38 (33,63)*
ACTV	5 (16,13)	3 (5,66)			8 (7,08)*
Ccas	1 (3,22)	7 (13,20)	2 (40)	18 (75)	28 (24,78)*
Cmu		1 (1,89)	1 (20)		2 (1,77)*
Mixtos		4 (7,55)	1 (20)	3 (12,5)	8 (7,08)*
<b>Total</b>	31 (27,43)*	53 (46,90)*	5 (4,42)*	24 (21,24)*	113 (100)*

\* Corresponde al porcentaje de tumores de cada tipo y en cada segmento del intestino, sobre el total de 113 tumores

() Porcentaje correspondiente al tipo histológico de tumores en cada segmento del intestino.

C.dist: colon distal; C.prox: colon proximal

En los tres lotes, los tumores se localizaron preferentemente en el colon distal (Tabla 10) y en menor porcentaje en el colon proximal. En segundo orden de frecuencia existieron diferencias en la localización de los tumores entre los tres lotes. De esta manera en los Lotes 2 (DMH) y 5 (Mo+DMH) la frecuencia mayor fue en el ciego, mientras que en el Lote 6 (W+DMH) fue en el recto.

Tabla 10: Localización y porcentaje de tumores en los tres lotes tratados con DMH.

Grupo tratado	Lote 2 (DMH)	Lote 5 (Mo+DMH)	Lote 6 (W+DMH)
Localizacion			
Recto	25 (23.81)	6 (12.76)	31 (27.43)
Colon distal	45 (42.85)	25 (53.19)	53 (46.90)
Colon proximal	4 (3.81)	5 (10.64)	5 (4.42)
Ciego	31 (29.52)	11 (23.40)	24 (21.24)
Total	105	47	113

( ) Corresponde al porcentaje de tumores de cada lote tratado con DMH en cada segmento del intestino

Se realizó un Análisis de la variancia con un Diseño en Bloque completo al azar; previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las variancias. El efecto Tratamiento (Lotes 2, 5 y 6) fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y la comparación de Medias por Tukey arrojó diferencias entre el Lote 2 vs 6. El efecto bloque (intestino grueso) también fue significativamente diferente ( $p < 0,02$ ) y la comparación de medias por Tukey detectó diferencias entre el Colon distal vs. Colon proximal.

### 6.3- Grado de infiltración y metástasis

El grado de infiltración fue variable según el tipo histológico del tumor. En general se observó que las neoplasias que más invadieron todas las capas del intestino fueron los carcinomas mixtos, seguidos por los Ccas y .Cmu, mientras que los

ACT, ACTV y ACV comprometieron principalmente la submucosa (Tabla 11).

En cuanto a las metástasis, se consideró la invasión a ganglios linfáticos mesentéricos ubicados en el tejido adiposo que rodea la unión del ciego al colon proximal y metástasis en pulmones y siembra en cavidad abdominal (Figura 22 y 23). Los tumores que comprometieron los ganglios mesentéricos presentaron características histológicas de carcinoma de células en anillo de sello y de carcinoma mucinoso (Figura 24).

En 2 casos se observó siembra en cavidad abdominal y metástasis en pulmones correspondiendo a tumores ulceroinfiltrantes con características histológicas de Mixtos (Figuras 25 y 26), en ratas del Lote 2 (DMH) y del Lote 6 (W+DMH).

Tabla 11: Infiltración de los diferentes tipos histológicos de tumores en las capas intestinales en los tres lotes tratados con DMH: Lote 2 (DMH), Lote 5 (Mo+DMH) y Lote 6 (W+DMH).

TipoHistol	ACT			ACV			ACTV			Ccas			Cmu			Mixto			Total		
	D.	M.	W.	D.	M.	W.	D.	M.	W.	D.	M.	W.	D.	M.	W.	D.	M.	W.	D.	M.	W.
Submucosa	36	11	24	0	1	0	5	0	6	13	4	6	0	0	0	1	1	1	55	17	37
Muscular	1	1	8	0	0	0	1	0	1	14	6	6	1	0	1	2	3	1	19	10	17
Serosa	1	1	3	0	0	0	3	0	0	2	2	10	0	0	1	1	1	4	7	4	18
Tej. Pericol.	1	0	3	0	1	0	1	0	1	4	3	6	0	2	0	8	5	2	14	10	12
Total	39	13	38	0	1	0	10	0	8	33	15	28	1	2	2	12	10	8	95	41	84

D: corresponde al Lote 2 (DMH)- M: corresponde al Lote 5 (Mo+DMH)- W: corresponde al Lote 6 (W+DMH)

El número entero corresponde a la cantidad de tumores de cada lote que ha infiltrado las diferentes capas del intestino.

Tej.Pericol: tejido pericolónico

Analizando el grado de infiltración de los tres lotes en conjunto se observó que los tumores Ccas y Mixtos fueron los que más infiltraron los tejidos pericolónicos, inclusive los mismos realizaron metástasis a otros órganos. Por otra parte, los ACT y ACTV, presentaron escaso grado de infiltración comprometiendo principalmente la submucosa.

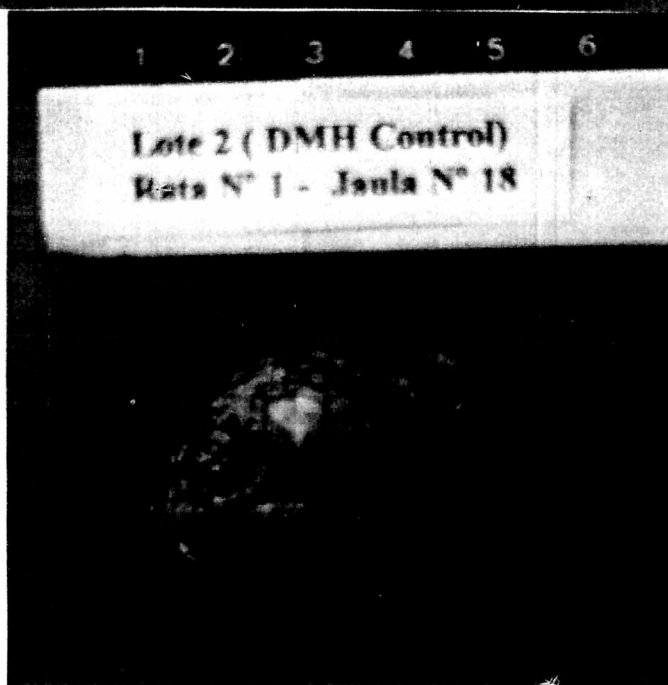


Figura 22: Rata con deficiencia de molibdeno con siembra tumoral en cavidad abdominal.

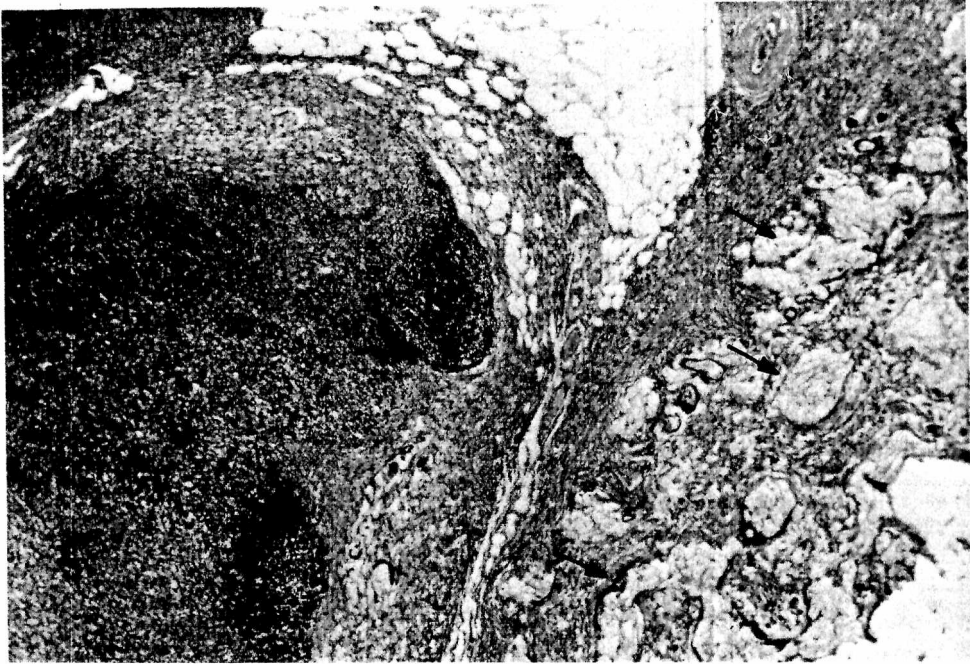
Figura 23: Pulmones con múltiples metástasis en una rata del Lote 2 (DMH).

Figura 24: Ganglio linfático mesentérico con metástasis. Se observan estructuras glandulares con características células en anillo de sello y lagos de mucina (flechas), (H y E, 40x).

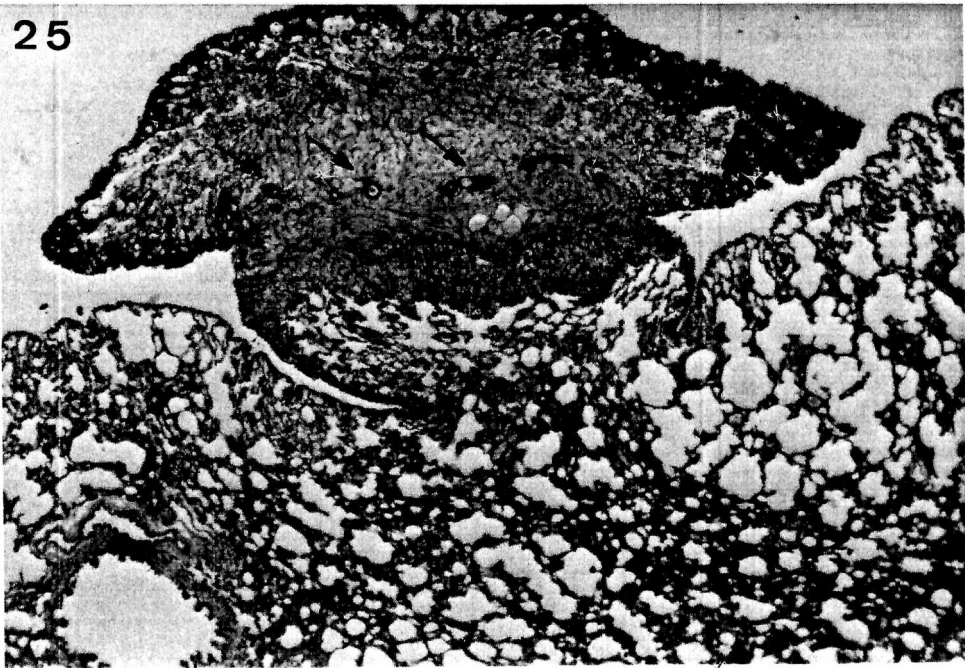
Figura 25: Metástasis de tumor mixto en la superficie pulmonar, se observa tejido neoplásico con patrón tubular (flechas) y de carcinoma de células en anillo de sello con abundante tejido desmoplásico (H y E, 40x).

Figura 26: Múltiples nódulos tumorales mesentéricos que forman parte de la siembra en cavidad abdominal del mismo animal de la figura 22 (H y E, 40x).





25



26



#### 6.4- Lesiones Neoplásicas Tempranas (LNT)

Las LNT fueron observadas en la mayoría de los animales tratados con DMH en ciego, colon proximal, colon distal y en recto (Tabla 12). En los tres lotes, las LNT, se localizaron con mayor frecuencia en el colon distal, Lote 2 (DMH) 68%, Lote 5 (Mo+DMH) 62,5% y Lote 6 (W+DMH) 50%.

Tabla 12: Frecuencia y localización anatómica en las diferentes porciones del intestino grueso de LNT en los tres lotes tratados con DMH.

Localización	Recto	C.distal	C.prox	Ciego	Total
Lote 2 (DMH)	4 (8)	34 (68)	4 (8)	8 (16)	50
Lote 5 (Mo+DMH)	2 (8,33)	15 (62,5)	6 (25)	1 (4,16)	24
Lote 6 (W+DMH)	7 (23,33)	15 (50)	6 (20)	2 (6,66)	30
Total (%)	13 (12,5)*	64 (61,54)*	16 (15,38)*	11 (10,58)*	104

El número entero, corresponde al número de LNT

( ) corresponde al porcentaje de LNT en cada segmento del intestino, sobre el total de cada lote.

\* corresponde al porcentaje de LNT en cada segmento del intestino, sobre el total de 104 LNT.

Estas LNT comprometieron grupos de 2 a 3 criptas (Figura 27), hasta grupos con numerosas criptas (Figura 28). Las mismas se caracterizaron por presentar células con marcada basofilia citoplasmática, núcleos prominentes con cromocentros gruesos y evidente nucléolo, en ocasiones con estratificación celular y pérdida de la polaridad (Figura 29) frecuentes mitosis y disminución y/o ausencia de células caliciformes.

Las LNT se localizaron, en ocasiones, en criptas muy cercanas a los nódulos linfoides asociados a la mucosa, ya sea alrededor o sobre los mismos (Figura 30).

No se observaron diferencias en cuanto a la localización de las LNT en las diferentes porciones del intestino grueso entre los diferentes lotes, no obstante las ratas suplementadas con Mo mostraron menor número de LNT.



Figura 27(a): LNT que compromete algunas criptas en la superficie mucosa, en (b) el compromiso de varias glándulas abarca todo el espesor de la mucosa (H y E, 100x).

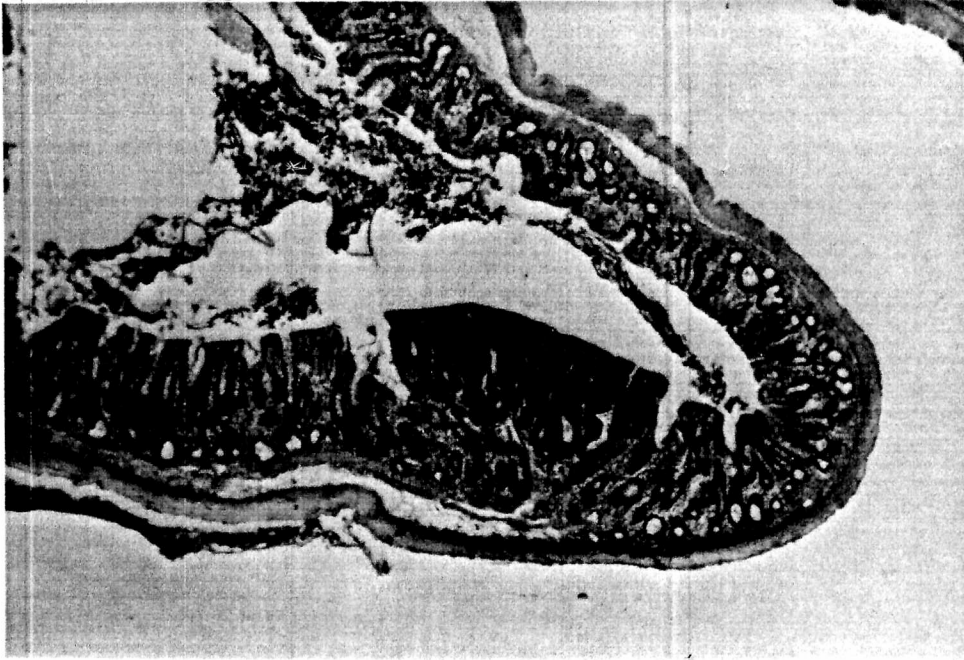


Figura 28: LNT que abarca numerosas criptas en la superficie de la mucosa (H y E, 40x).

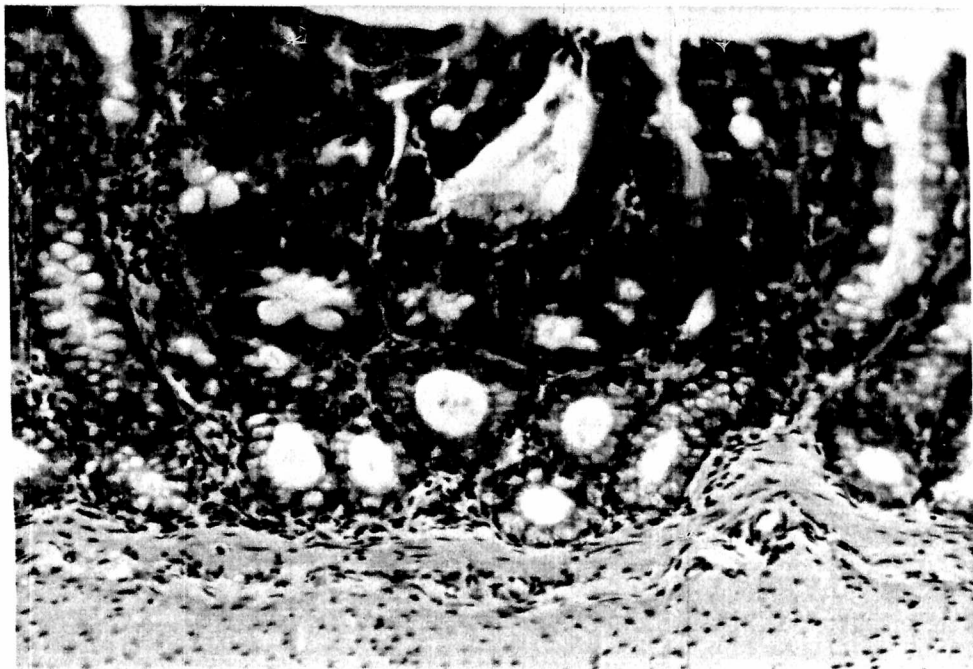


Figura 29: LNT, se observan criptas dilatadas con células dispuestas en forma estratificada, con pérdida de la polaridad, basofilia citoplasmática y ausencia de células caliciformes (H y E, 100x).

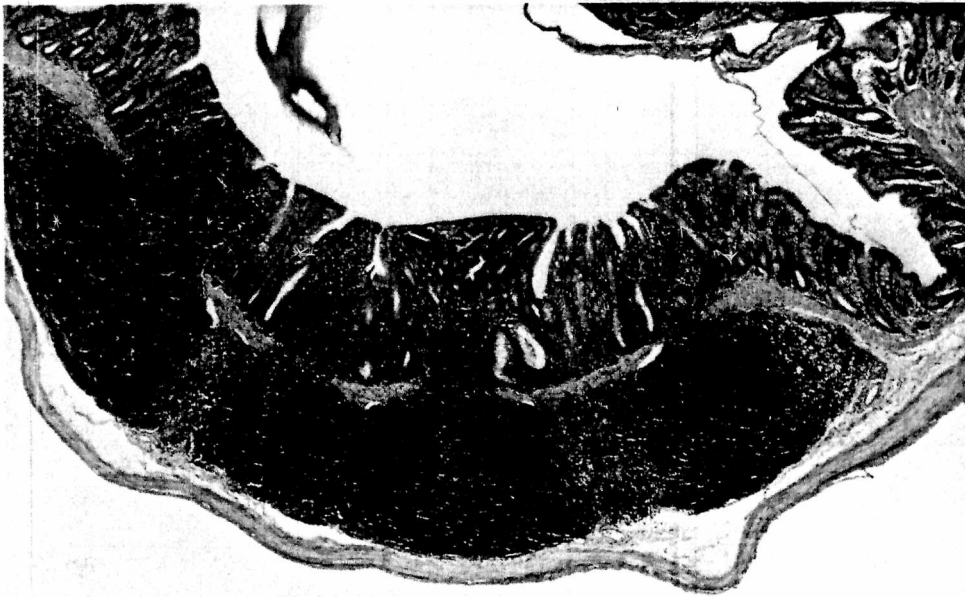


Figura 30: LNT ubicada sobre un agregado de nódulos linfoides asociados a la mucosa (H y E, 40x).

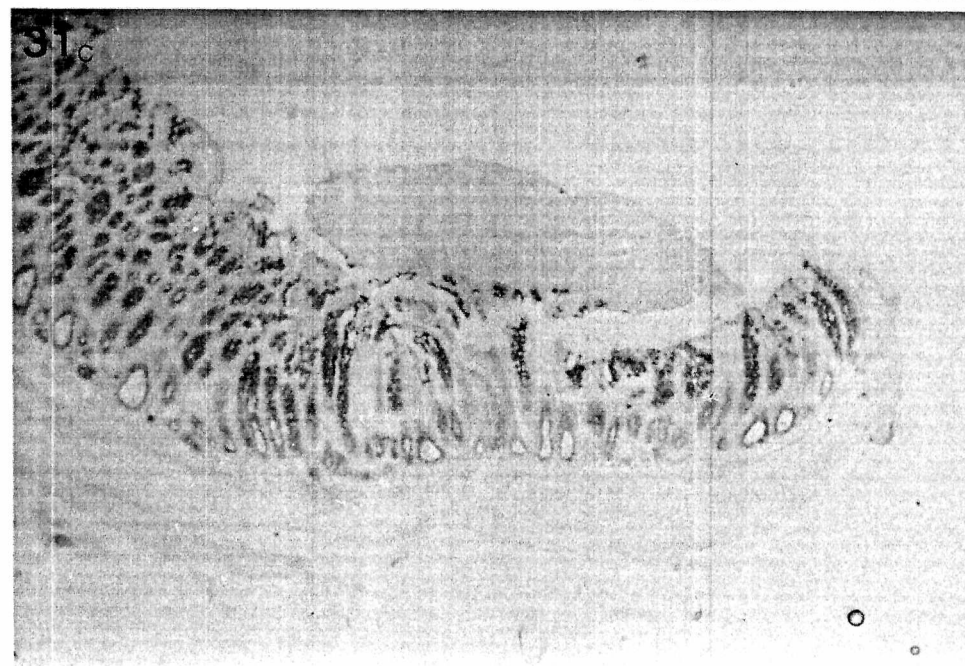
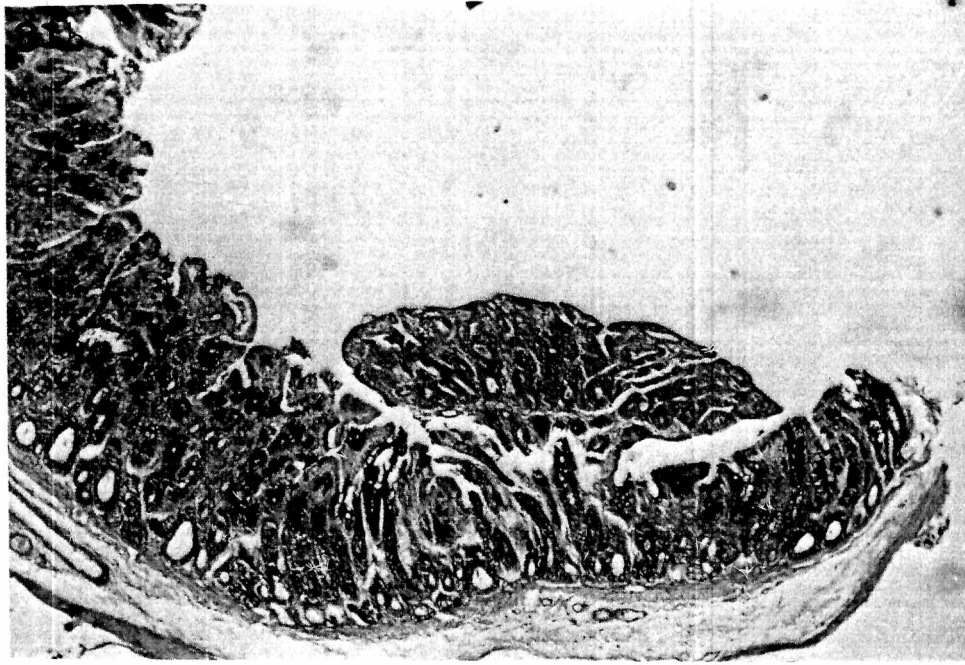
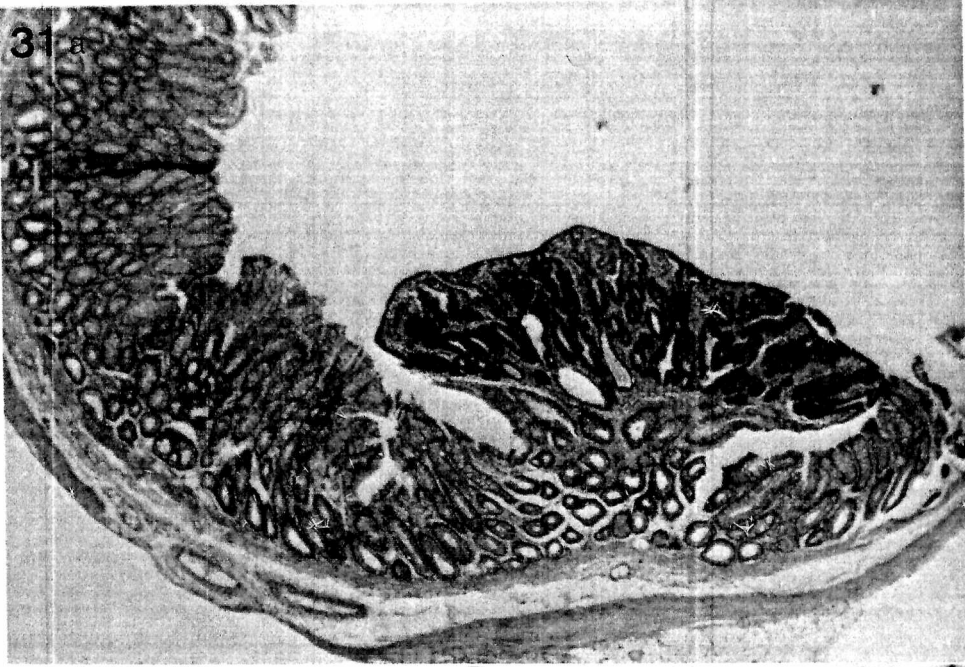
#### 6.5- Análisis histoquímico de tumores

Mediante el estudio histoquímico de los diferentes tipos de tumores, se observó en los adenomas y adenocarcinomas tubulares, una reacción negativa para las mucosustancias neutras y ácidas (Figura 31-a,b,c).

Figura 31(a): Pequeño adenoma tubular en la superficie mucosa del colon distal (H y E 40x).

Figura 31(b): El mismo tumor de la figura 31(a), negativo a la coloración con PAS, la mucosa vecina al tumor se colorea intensamente (PAS-Hematoxilina, 40x).

Figura 31(c): El mismo tumor de la figura 31(a), negativo a la coloración con Alcian blue, la mucosa vecina al tumor se colorea intensamente (Alcian blue, 40x).



Los adenocarcinomas tubulovelloso presentaron una débil reacción histoquímica para las mucosustancias coloreadas con Alcian blue, principalmente en la porción apical de las células en relación a la luz (Figura 32-a,b,c).

Figura 32(a): Pequeño adenocarcinoma tubulovelloso en la superficie del colon proximal (H y E, 40x).

Figura 32(b): El mismo tumor de la figura 32(a), negativo a la coloración de PAS, la mucosa vecina al tumor se colorea intensamente (PAS-Hematoxilina, 40x).

Figura 32(c): El mismo tumor de la figura 32(a), coloreado débilmente con Alcian blue, las flechas indican las superficies apicales positivas, la mucosa vecina al tumor se colorea intensamente (Alcian blue, 40x).

Los carcinomas de células en anillo de sello y los carcinomas mucinosos presentaron intensa coloración positiva tanto para mucosustancias neutras como ácidas (Figuras 33-a,b,c; 34-a,b,c; 35-a,b,c).

Figura 33(a): Carcinoma de células en anillo de sello en la superficie mucosa del ciego coloreado con H y E (40x).

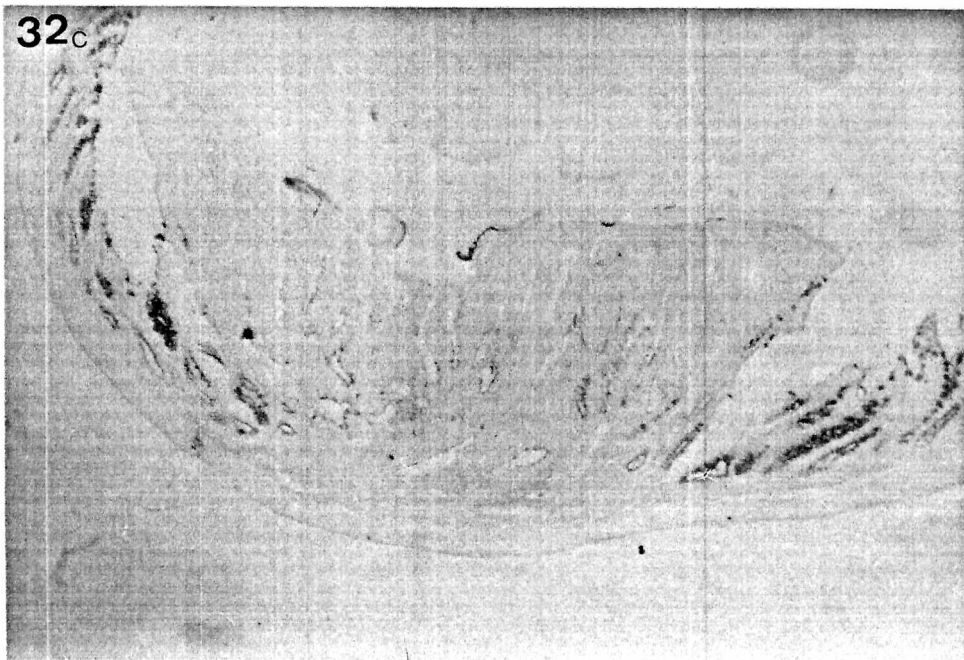
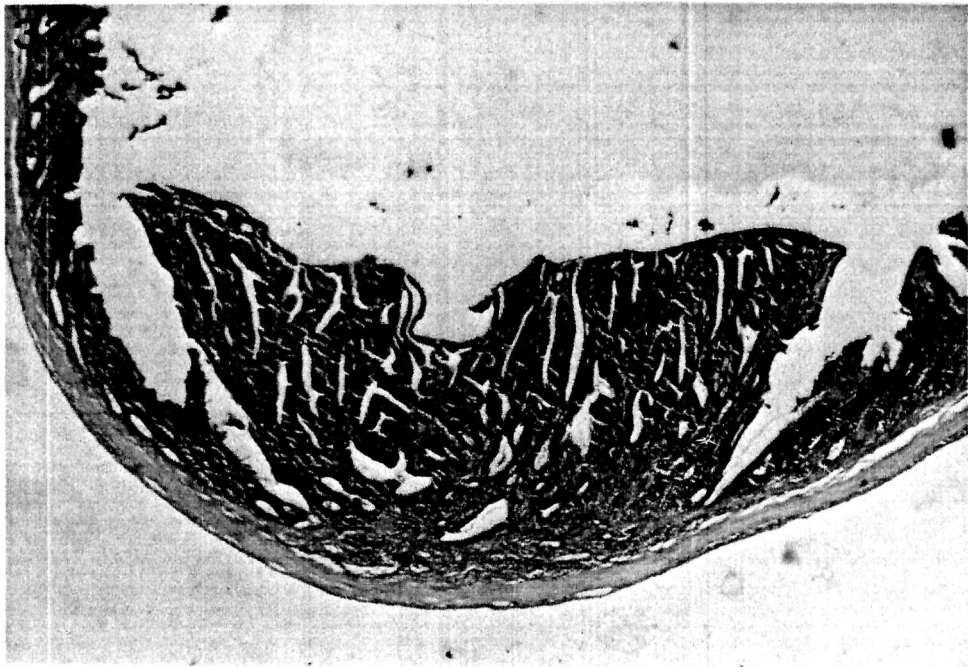
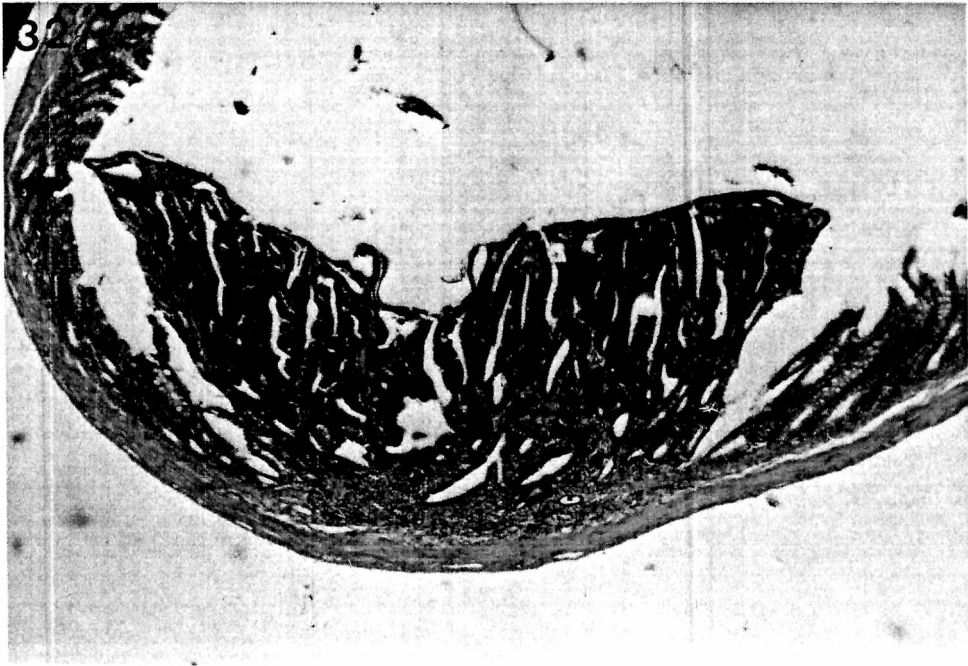
Figura 33(b,c): Las células del carcinoma se colorean intensamente con PAS (b) y Alcian blue (c) (40x).

Figura 34(a): Típicas células en anillo de sello con abundante citoplasma y núcleo desplazado hacia la periferia (H y E, 400x).

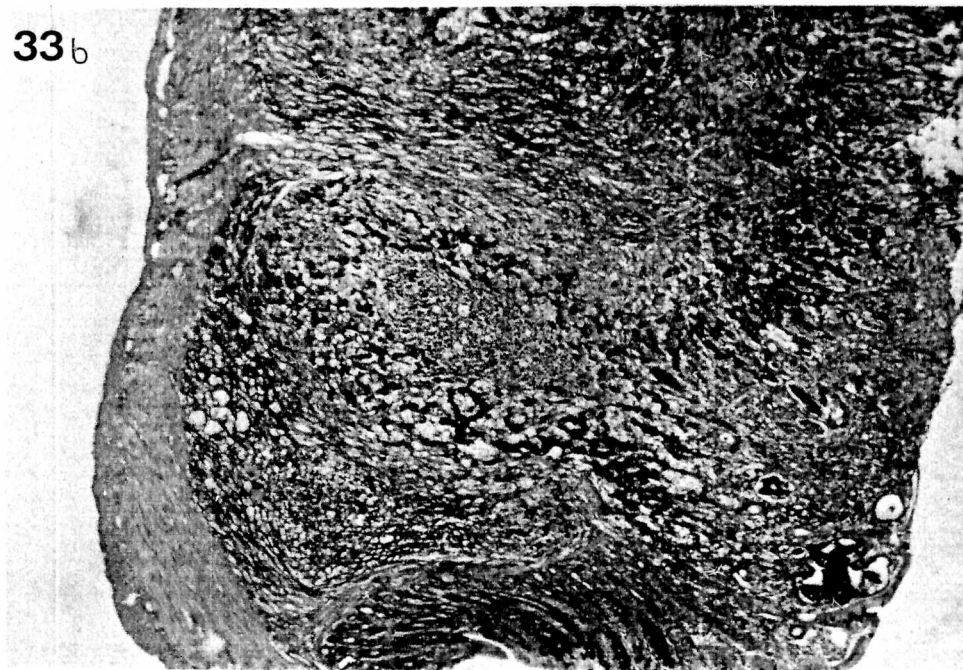
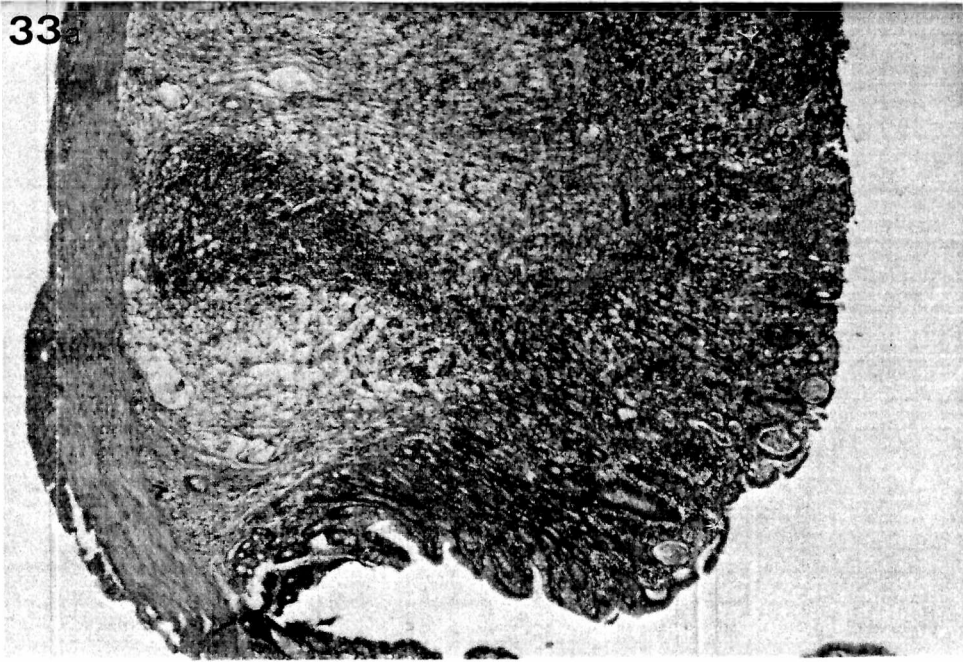
Figura 34(b,c): El citoplasma de las células neoplásicas reacciona positivamente con PAS (b) y Alcian blue (c) (400x).

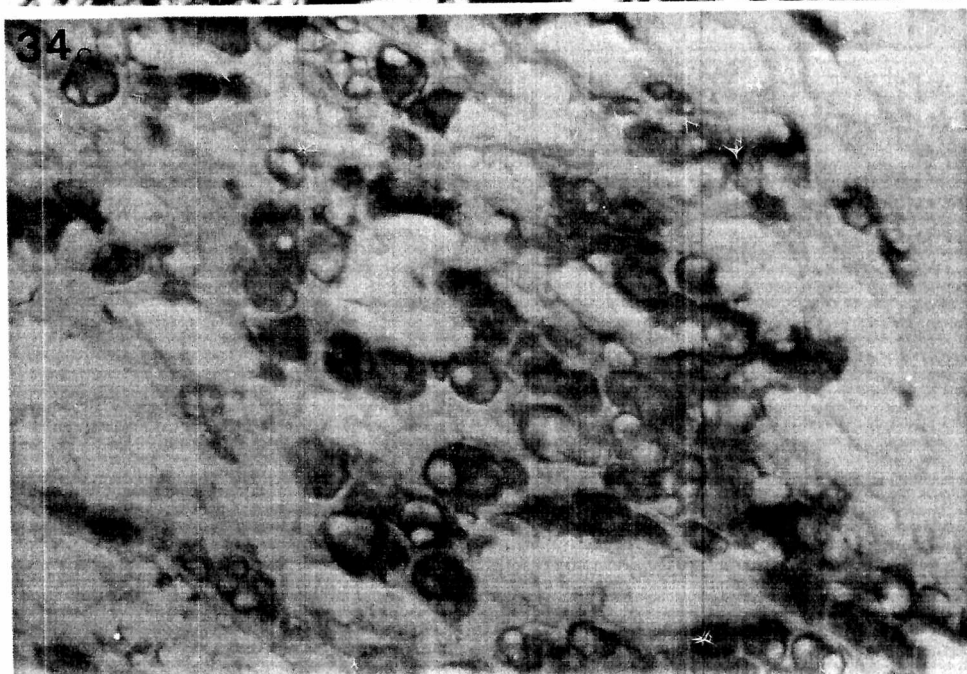
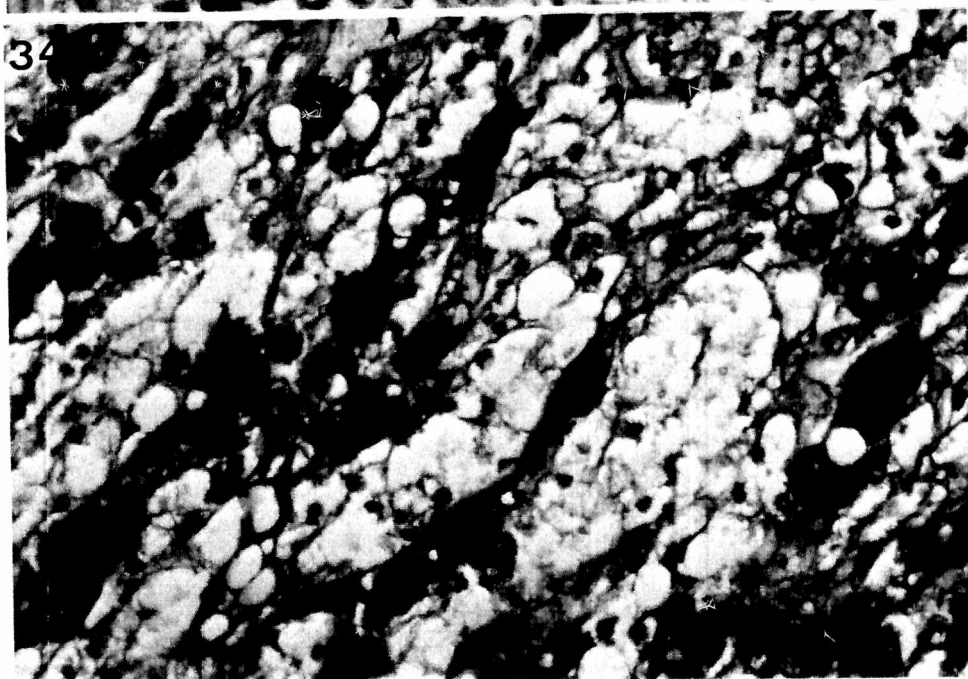
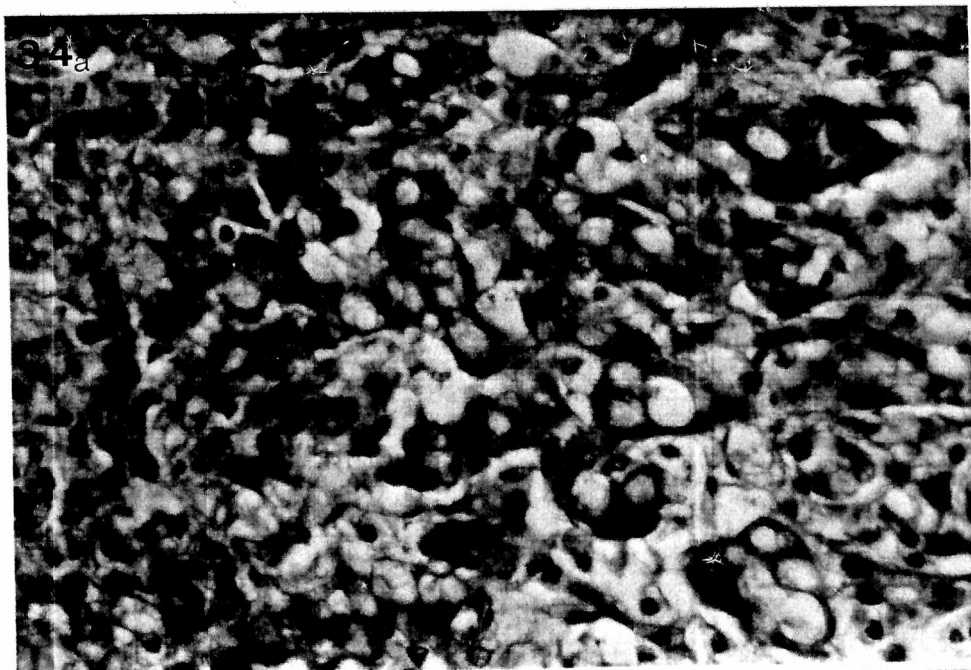
Figura 35(a): Carcinoma mucinoso en la superficie mucosa del colon distal coloreado con H y E (100x).

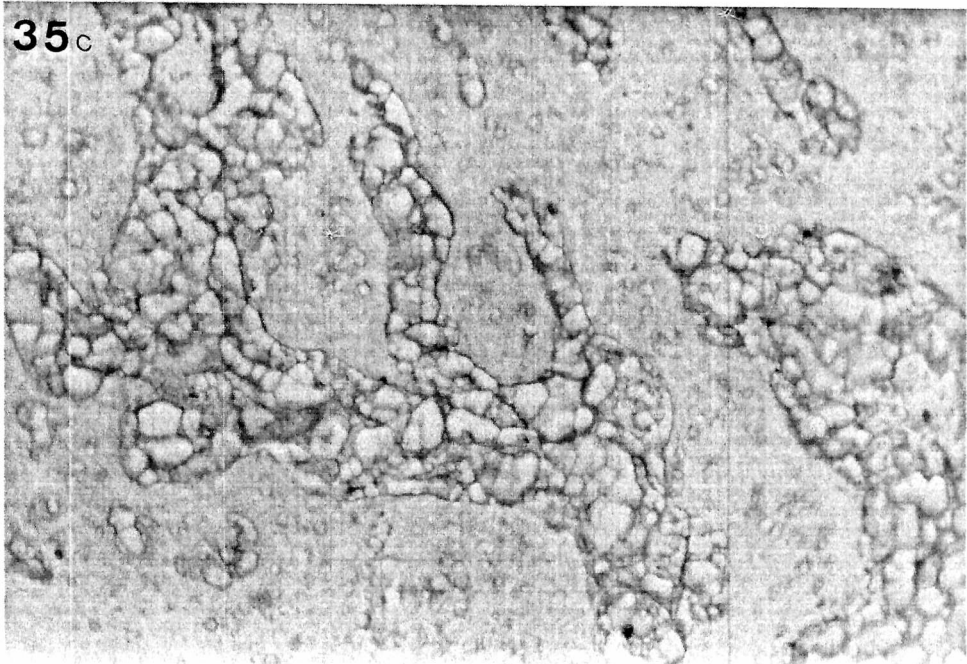
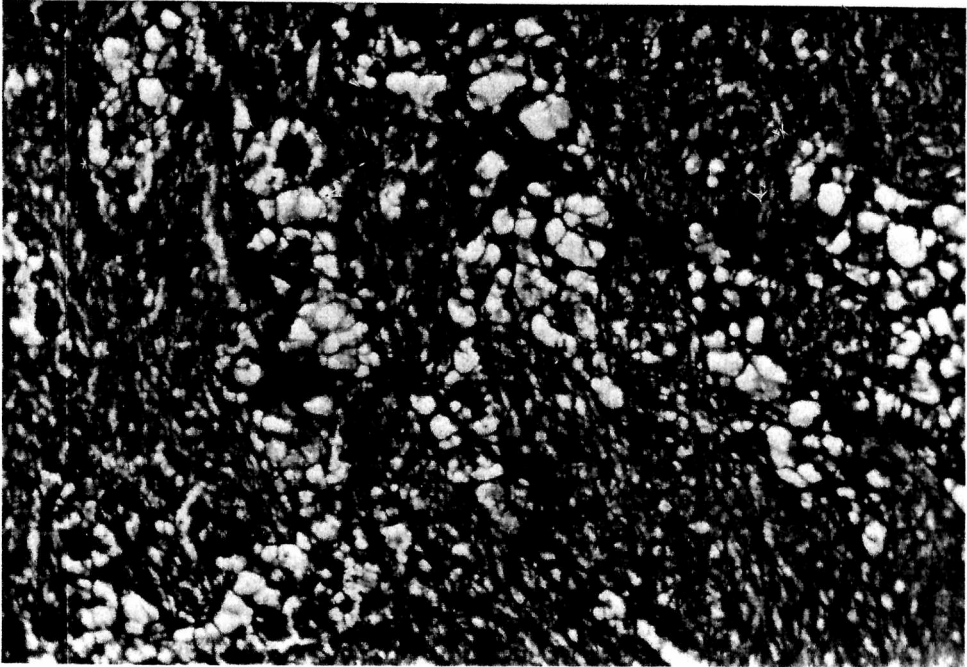
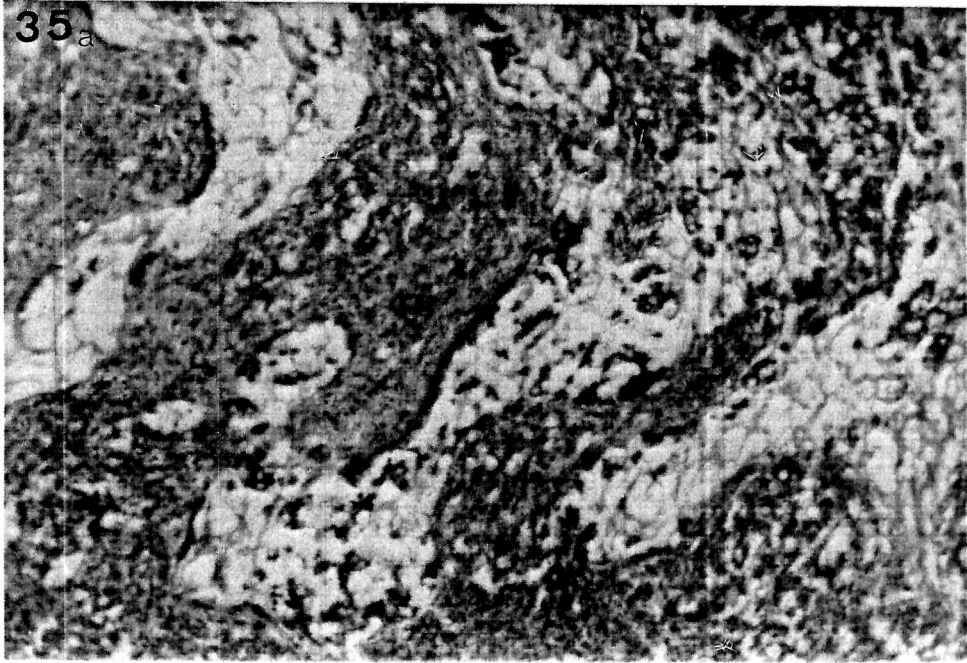
Figura 35(b,c): Los lagos de mucina del carcinoma se colorean intensamente con PAS (b) y Alcian blue (c) (100x).











## 6.6- Análisis histoquímico de las LNT

Todas las LNT presentaron una débil reacción histoquímica con las técnicas del PAS y Alcian blue a pH 2,5 evidenciando disminución de mucosustancias neutras y ácidas (Figura 36-a,b,c).

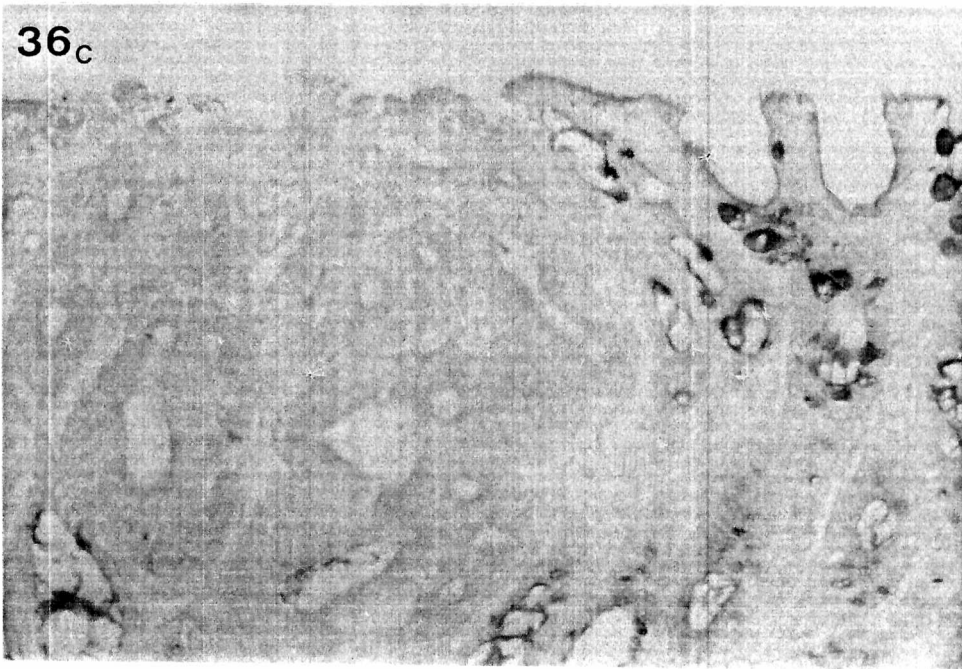
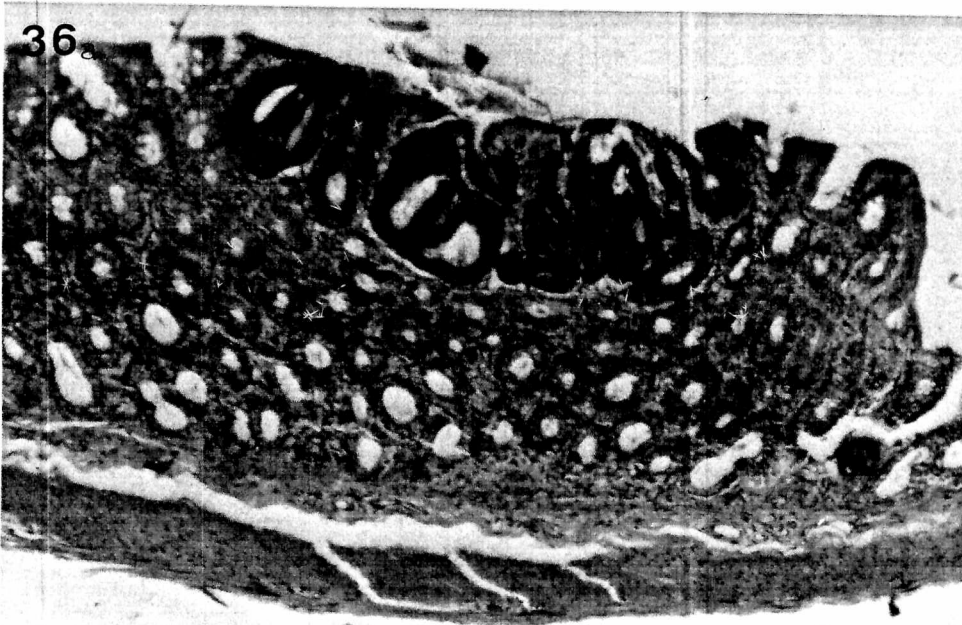
En las LNT que presentaron células caliciformes, las mismas aparecían como vacuolas claras, en ocasiones débilmente coloreadas en sus bordes.

De la misma manera, en algunas LNT se observó una débil coloración de la superficie apical de las células correspondientes a la chapa estriada y de algunas vacuolas localizadas en muy pocas células. En todos los casos, se observó en las criptas vecinas a las LNT, una mucosa que reaccionaba muy débilmente a las coloraciones del PAS y Alcian blue.

Figura 36(a): LNT que compromete a numerosas criptas ubicadas en la porción superior de la mucosa (H y E, 100x).

Figura 36(b): Margen de una LNT, a la derecha superficie epitelial débilmente coloreada con relación a la chapa estriada y criptas con células caliciformes escasamente positivas. A la izquierda la LNT es negativa al PAS (PAS-Hematoxilina, 200x).

Figura 36(c): La misma LNT de la figura 36(b). A la derecha se observa la mucosa débilmente coloreada con Alcian blue y a la izquierda la LNT es negativa (Alcian blue, 200x).



### 6.7- Análisis ultraestructural de los tumores mediante MEB

El estudio de la ultraestructura de la superficie mucosa de los tumores reveló anomalías caracterizadas por distorsión de las bocas de abertura de las criptas, con luces irregulares, con formas tortuosas, dilatadas, elongadas, cuyas paredes se presentaron de diferentes grosores, en ocasiones muy delgadas y en otras más engrosadas, y escasa producción de mucina (Figuras 37 y 38). En los casos de tumores planos, la mayoría de los mismos se encontraron ulcerados haciendo difícil la observación de la superficie mucosa tapizada por detritus (Figuras 39 y 40). Pequeños tumores menores a 1cm aparecían como masas de tejido cuyo grosor apenas superaba al de los pliegues de la mucosa, sobresaliendo escasamente sobre la superficie mucosa, presentando las bocas de abertura de las criptas con formas y tamaños irregulares y paredes de las mismas engrosadas (Figura 41). A mayor aumento se observó en las células neoplásicas, pérdida casi total de las microvellosidades; no se pudieron identificar células caliciformes.



Figura 37: Pequeño tumor de 2 mm de diámetro, ubicado entre dos pliegues de la mucosa del colon distal, con intensas irregularidades de la superficie (MEB 27 x).

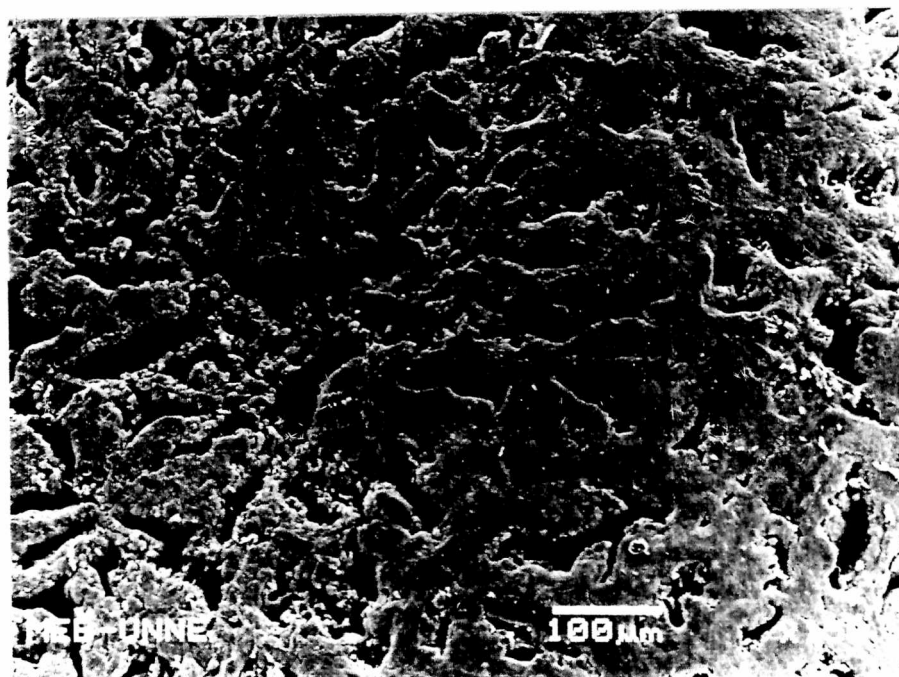


Figura 38: Mayor aumento de la figura 37. Las bocas de abertura de las criptas aparecen totalmente distorsionadas, con paredes engrosadas, en el centro de la imagen las paredes se encuentran adelgazadas (MEB 150x).

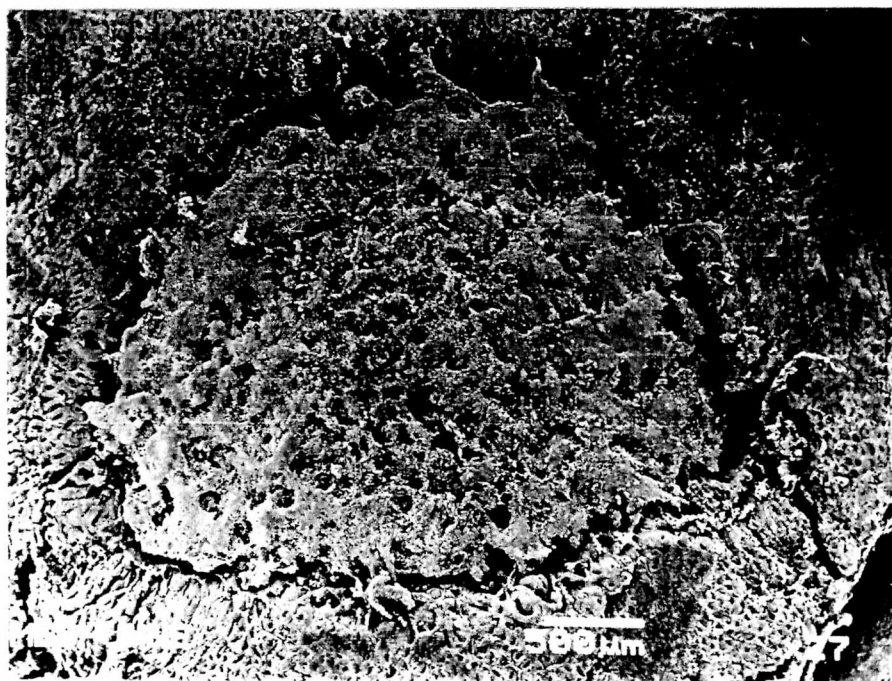


Figura 39: Pequeño tumor plano ubicado en el ciego con zona central ulcerada, bordes engrosados y elevados bien delimitados de la mucosa sana (MEB 27x).

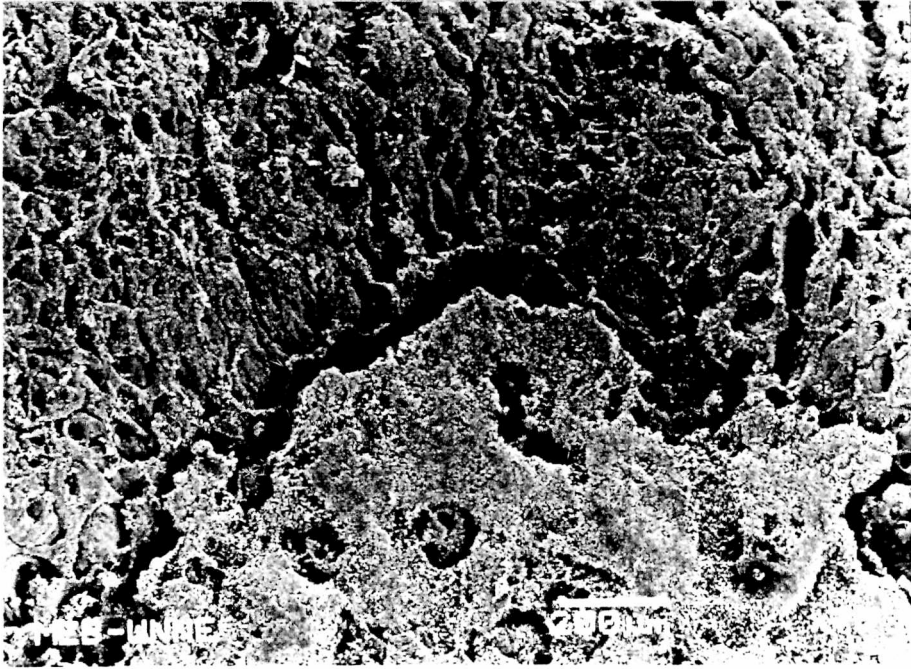


Figura 40: Mayor aumento de la figura 39, borde del tumor con criptas distorsionadas, de paredes irregulares, en la parte inferior se observa material necrótico correspondiente al centro de la zona ulcerada (MEB 75x).

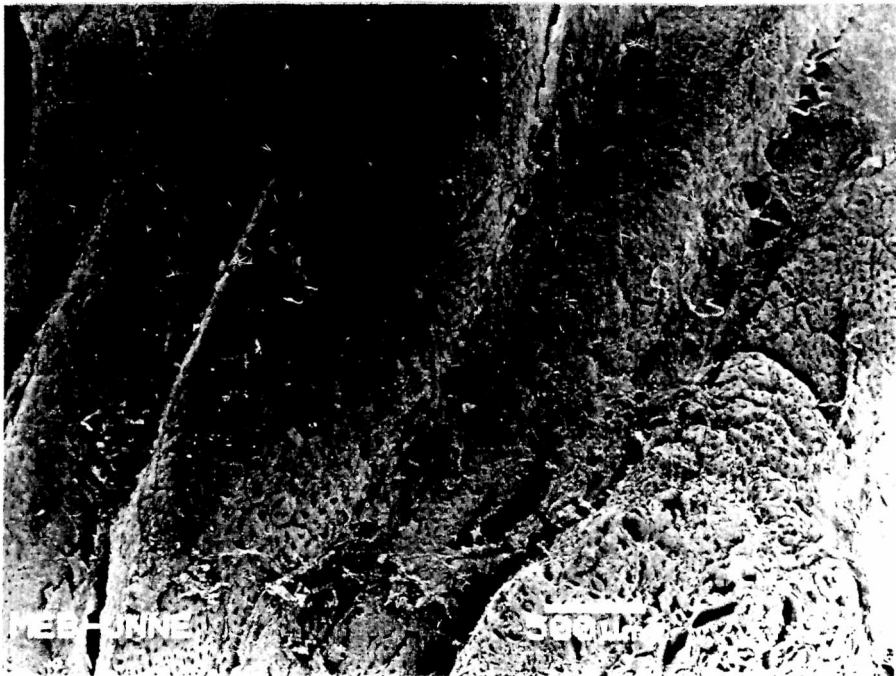


Figura 41: Tumor extendido a lo largo del pliegue de la mucosa, obsérvese la zona central con pérdida de la estructura, en el extremo inferior derecho parte de otro tumor de mayor tamaño (MEB 27x).



## 6.8- Análisis ultraestructural de las LNT mediante MEB

Las LNT fueron evidentes a pequeño aumento, manifestándose como grupos de criptas que sobresalen de la superficie mucosa. Dichas LNT evidenciaron cambios en la superficie caracterizados por una leve distorsión de las bocas de las aberturas de las criptas (Figura 42), aumento del grosor de la pared y disminución de las microvellosidades (Figura 43-a,b). Por otra parte, se observó aumento del tamaño de las criptas al comparar la superficie de una LNT con la superficie de la mucosa normal al mismo aumento (Figura 44-a,b).

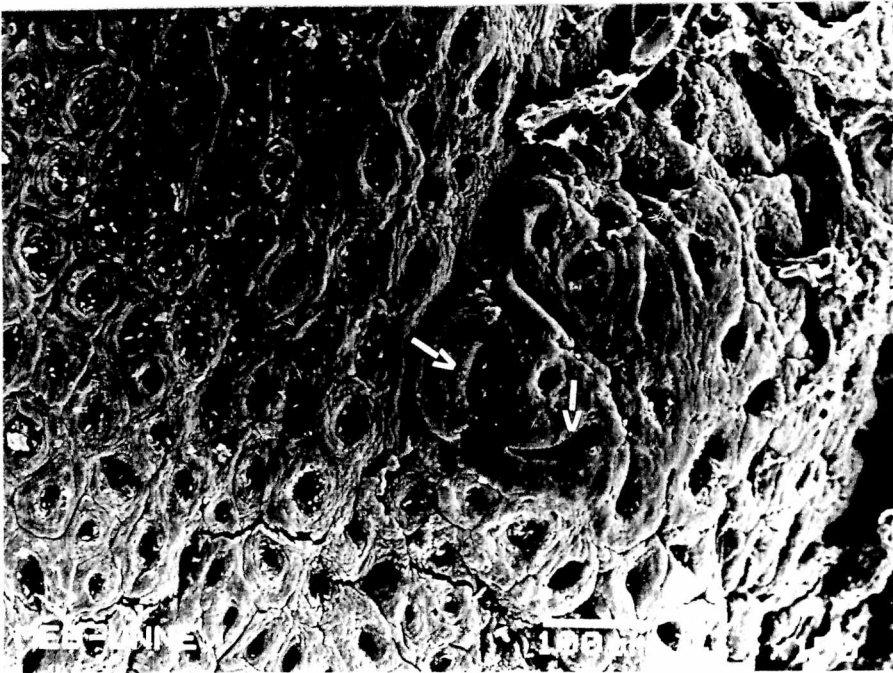


Figura 42: LNT, las flechas indican distorsión de la luz y engrosamiento de la pared de las criptas (MEB, 100x).

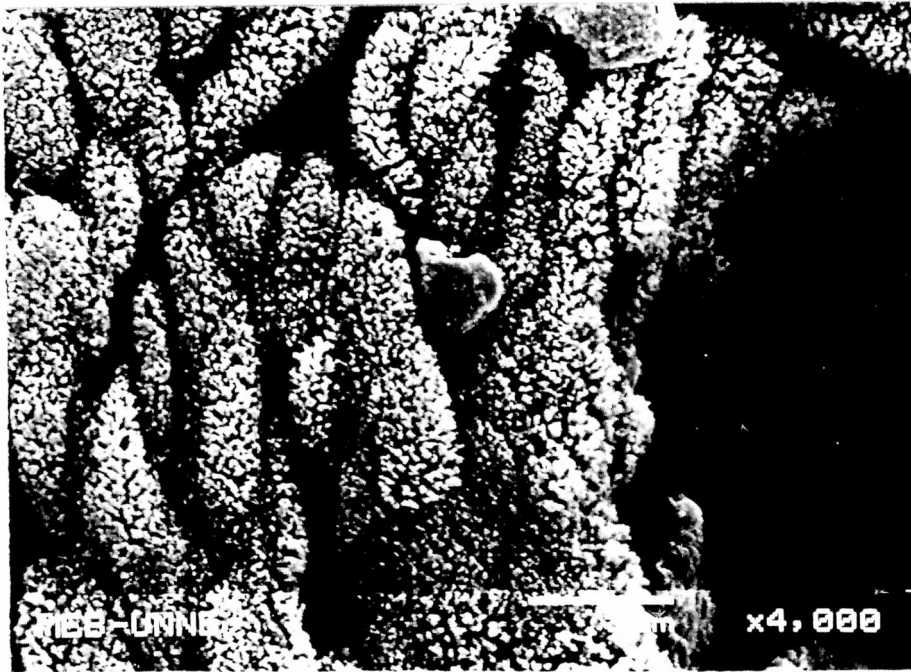


Figura 43(a): Superficie de las células ubicadas alrededor de una boca de abertura de una cripta en el colon distal de una rata sin tratamiento con DMH, mostrando abundantes microvellosidades (MEB, 4.000x).

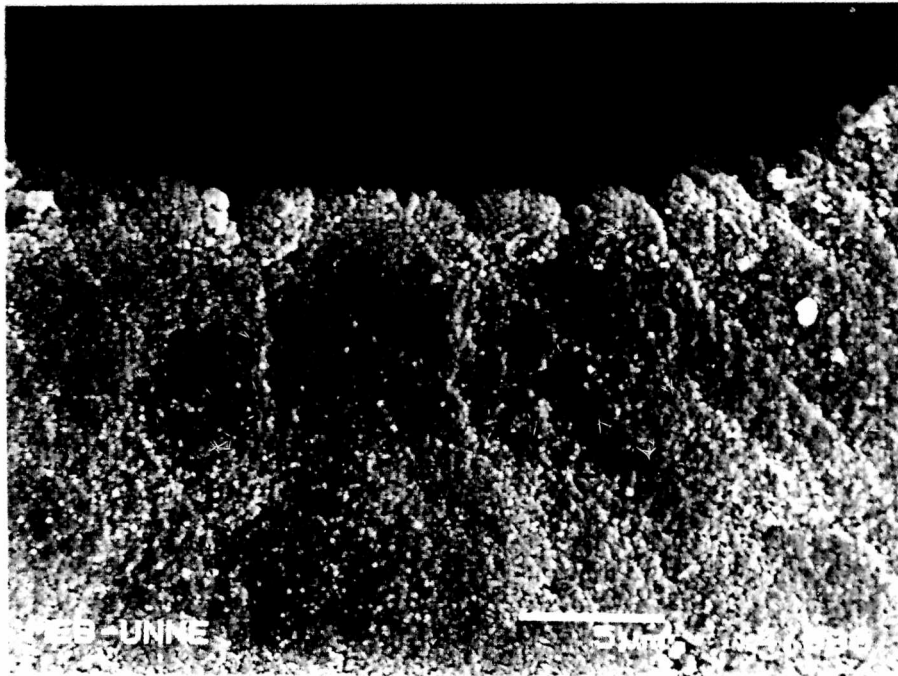


Figura 43(b): Superficie de las células ubicadas alrededor de una boca de abertura de una cripta correspondiente a una LNT en el colon distal de una rata tratada con DMH mostrando acortamiento y disminución de las microvellosidades (MEB, 4.000x).

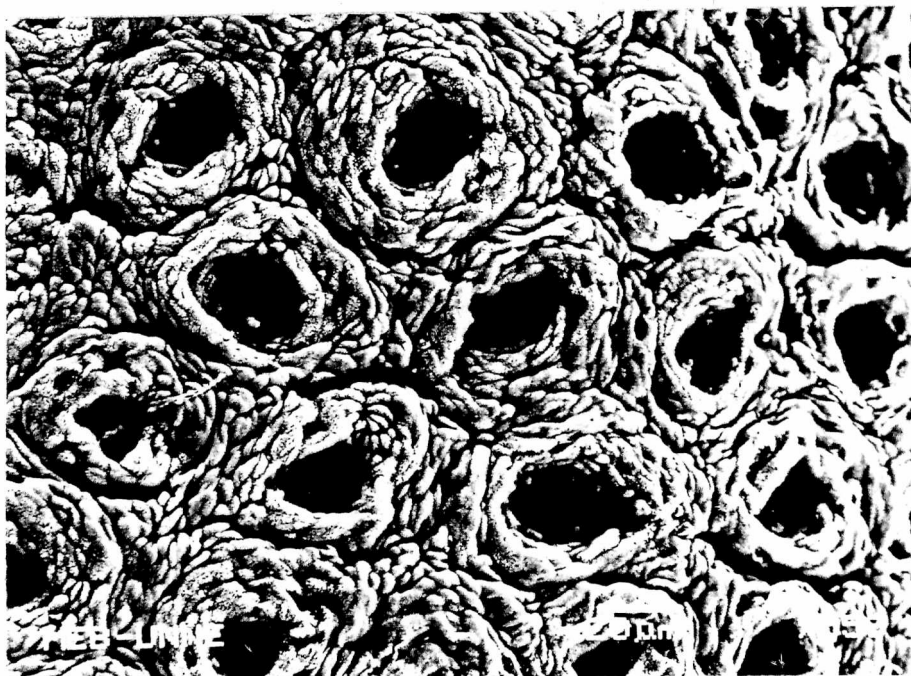


Figura 44(a): Superficie mucosa normal del colon distal en una rata sin tratamiento con DMH. Se pueden contar más de 12 criptas glandulares, cada una con un diámetro promedio de  $45 \mu\text{m}$  (MEB, 550x).

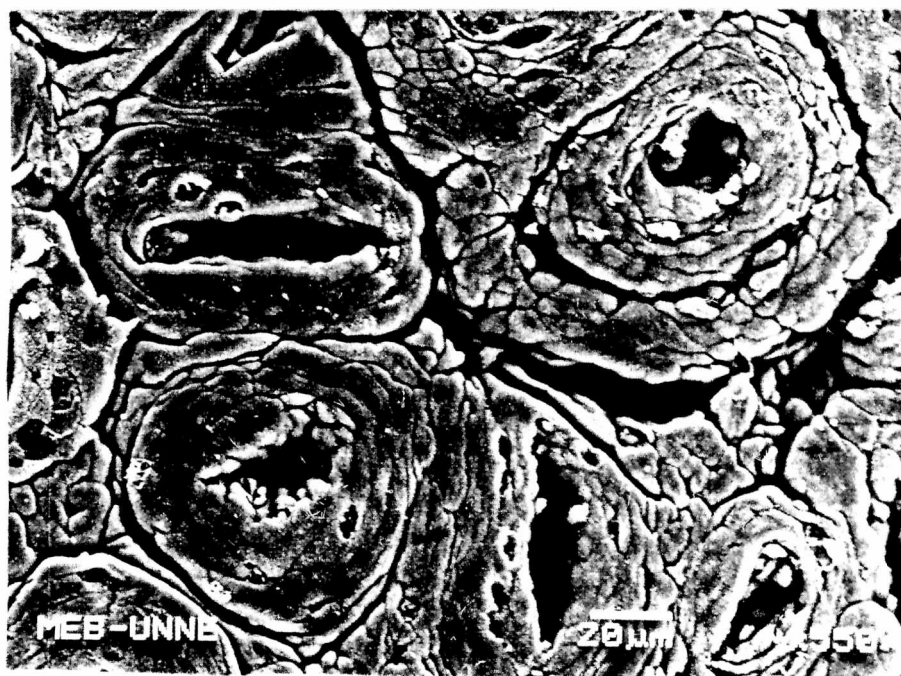


Figura 44(b): Superficie mucosa de una LNT localizada en el colon distal en una rata tratada con DMH, se observan menos criptas por campo, aumento del grosor de la pared de las criptas y distorsión de la luz (MEB, 550x).

## DISCUSION

### 1- Efectos de la administración de Mo y W previa al tratamiento con DMH

#### 1.1- Con relación al modelo biológico experimental

La presencia de 200 ppm de Mo y de W en el agua de bebida durante los dos meses previos al tratamiento del carcinógeno no modificó el peso corporal. Todos los animales se adaptaron y aceptaron sin inconvenientes el suministro diario tanto del Mo como del W. Esto también fue observado en ratas con niveles de 2, 20 y 100 ppm de Mo y 200 ppm de W en el agua de bebida <sup>(59)</sup>, así como con niveles de 500 ppm de Mo <sup>(39)</sup>.

Con respecto a la toxicidad del Mo existen diferencias entre las distintas especies, los bovinos son los más susceptibles, seguido por los ovinos, cobayos, aves, ratas, conejos, cerdos y equinos <sup>(16, 67)</sup>.

Los efectos tóxicos del Mo en ratas dependen de su concentración en la dieta. El molibdato de sodio administrado en el alimento en la concentración de 80 a 140 ppm, durante 4 a 7 semanas produjo, en ratas Long-Evans, pérdida del color de los pelos <sup>(46)</sup>. Miller et al <sup>(68)</sup>, observaron engrosamiento de la articulación femorotibial en ratas suplementadas con 300 ppm de Mo, mientras que exóstosis mandibular y maxilar fueron observadas en ratas suplementadas con 400 ppm <sup>(78, 117)</sup>. Fue observada diarrea a altas dosis entre 800 a 1.400 ppm <sup>(78)</sup>. Reducción de peso corporal fue observado con 400 a 1.200 ppm y la muerte ocurrió entre 4.000 y 5.000 ppm <sup>(73)</sup>.

En nuestra experiencia con 200 ppm administrado durante 6 meses en el agua de bebida, no observamos ninguno de estos efectos tóxicos.

## 1.2- Con relación a los niveles de Cu

En ratas, la ingestión de altas concentraciones de Mo, produce molibdenosis pero no interfiere en los niveles de Cu (27,39). En nuestra experiencia los animales suplementados con Mo durante los 2 primeros meses mostraron incremento significativo en las concentraciones hepáticas de dicho elemento, sin alterar las concentraciones hepáticas de Cu. Por otra parte las ratas suplementadas con W mostraron disminución de las concentraciones de Mo hepático; sin alterar los niveles de Cu hepático y sérico. Al final del segundo mes del tratamiento el contenido hepático de Mo para los lotes tratados con Mo, fue en promedio de 5,58 ppm, comparados con los lotes sin tratamiento con 2.18 ppm y de 0,96 ppm en los lotes suplementados con W; dichos niveles demuestran que el modelo experimental propuesto respondió a los objetivos planteados en un principio.

## 2- Efectos de la dieta con alto y bajo contenido de Mo sobre la carcinogénesis experimental del intestino grueso inducido con DMH en ratas

### 2.1- Frecuencia de neoplasias y LNT

En nuestra experiencia los efectos de la molibdenosis y de la deficiencia de molibdeno sobre el desarrollo de tumores y de LNT fueron diferentes en los tres lotes tratados con DMH.

La suplementación con Mo (Lote 5) provocó una marcada disminución del número de tumores: 47 en total, comparados con 105 en el Lote 2 (DMH) y 113 en el Lote 6 (W). De la misma manera la molibdenosis disminuyó el desarrollo de LNT correspondiendo para el lote con molibdenosis 24 LNT comparados con casi el doble del lote DMH, (50 LNT), ocupando el lote suplementado con W una posición intermedia. Estos datos refuerzan la teoría de que diversos componentes de la dieta juegan un rol importante en la prevención del cáncer de

colon, tanto en seres humanos como en animales de experimentación.

Los efectos de diferentes dietas y de diversos elementos administrados en la misma, han sido estudiados a fin de determinar el posible rol de la dieta sobre el desarrollo de neoplasias intestinales inducidas experimentalmente en animales de laboratorio. Estos estudios se originan sobre la base de investigaciones epidemiológicas en los seres humanos, en los que se relaciona al cáncer intestinal, principalmente al cáncer colo-rectal con la ingestión de alimentos ricos en grasa de origen animal y escaso consumo de fibras <sup>(109, 123)</sup>. Así en Japón, donde se consume una dieta con bajo contenido de grasa, se lo relaciona con un bajo riesgo de cáncer de colon <sup>(110)</sup>, en la población rural de Finlandia con un alto consumo de fibras pero también con un alto consumo de grasa, el doble que la población de Japón, también se lo asocia con un bajo riesgo de cáncer de colon al compararlo con la población de EEUU, aunque la misma no es tan baja como en Japón <sup>(92, 124)</sup>. De la misma manera otros investigadores concluyeron que lo recomendado para limitar el riesgo de cáncer de colon sería una ingestión de 15 a 20 % del total de calorías sobre la base de grasa y que el óptimo de ingestión de fibras sería aproximadamente 25 a 35g por día <sup>(128)</sup>.

Estos estudios consideran que no solo la cantidad de grasa y/o fibra ingerida inciden en el riesgo del cáncer de colon, sino también el tipo de grasa y el tipo de fibras consumidas. Así, si comparamos la frecuencia de cáncer de colon entre la población del sur (50% más baja en la incidencia de cáncer de colon) y la población del norte de Italia, se considera que el tipo de grasa, con relación a la grasa total ingerida, puede tener importancia etiológica, ya que en el sur existe un alto consumo de aceite de oliva, mayor que en el norte de Italia <sup>(11)</sup>.

De esta manera estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones y experimentales en animales de laboratorio, mantienen la hipótesis de que la composición de ácidos grasos de la dieta es uno de los factores determinantes en la

carcinogénesis del colon. Se observó que poblaciones del Mediterráneo así como esquimales, tenían bajo índice de cáncer de colon y cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva y el aceite de pescado que contiene omega-3 <sup>(48)</sup>. Experimentalmente se comprobó que la incidencia de tumores de colon es reducida en animales alimentados con una dieta con alto contenido de dos tipos de ácidos grasos: omega-3 y omega-6 <sup>(90)</sup>.

Por otra parte estudios referentes a los efectos de la suplementación con vitaminas y minerales, incluido el Mo, sobre poblaciones de alto riesgo de cáncer de esófago y estómago en China, demuestran la importancia del Mo en el desarrollo del cáncer <sup>(17, 118)</sup>. Estos trabajos surgen sobre la base de que los niveles de Mo en el agua de bebida, así como en suero, cabello y orina de habitantes de áreas de alto riesgo de cáncer de esófago y estómago fueron más bajos, que aquellos de áreas de bajo riesgo <sup>(19, 76)</sup>. Experimentalmente se observó que el Mo administrado en el agua de bebida a una concentración de 2 mg/l redujo la incidencia de cáncer de esófago y estómago, inducidos con NSEE en ratas machos Sprague-Dawley <sup>(59)</sup>.

En otra experiencia trabajando con un carcinógeno diferente: N-metil-N-benzilnitrosamina administrado por vía subcutánea en ratas, cuyas dietas fueron suplementadas con 2 ppm de Mo, se observó una significativa inhibición del carcinoma de células escamosas del esófago en ratas F 344 <sup>(51)</sup>. En esa experiencia se observó también un significativo aumento de las concentraciones de Mo y de la actividad de la enzima xantina oxidasa, en esófago y estómago.

La incidencia de tumores de la glándula mamaria inducidos experimentalmente con el carcinógeno N-nitroso-N-metil-urea (NMU) fue más baja en ratas Sprague-Dawley recibiendo 10mg/l de Mo en el agua de bebida comparada con los controles <sup>(102, 121)</sup>.

Dietas suplementadas con Mo en animales de laboratorio han demostrado un incremento de las concentraciones de xantina oxidasa en hígado, intestino y riñones <sup>(59)</sup>. Para Koisumi et al

(49), la acción protectora del Mo estaría relacionada al incremento del proceso de detoxificación mediante la denitrosación de compuestos nitrosos, así como la activación de reacción de dealquilación.

En nuestra experiencia utilizamos la DMH, un procarcinógeno que requiere activación metabólica dentro del organismo para transformarse en el carcinógeno activo (54). La activación metabólica de la DMH incluye primeramente su oxidación a azometano (25). Una segunda oxidación convierte el azometano en azoximetano, el cual es luego N-hidroxilado a metilazoximetanol. Estos pasos ocurren en el hígado y posiblemente en otros tejidos (54, 122). El metilazoximetanol es inestable químicamente a temperatura corporal, siendo descompuesto espontáneamente *in vitro* en formaldehído, agua y nitrógeno (71). Durante esta descomposición se forma un agente alquilante, el metildiazonio, el cual genera un ión carbónico capaz de metilar ADN, ARN y proteínas (66). La acción carcinogénica de la DMH involucra metilación del ADN de células epiteliales del colon (35, 36). Existe evidencia que el metilazoximetanol es convertido en metil-azoxiformaldehído por la enzima alcohol-dehidrogenasa (31). Esto es importante ya que esta enzima está presente en alta concentración en el colon e hígado de la rata, los cuales son órganos blancos para este carcinógeno.

En nuestra experiencia la menor cantidad de tumores y de LNT en las ratas tratadas con Mo, podría deberse a que dicho elemento interfiere en el metabolismo de la DMH. La molibdenosis posiblemente aumentaría las concentraciones de las enzimas en las cuales actúa como co-factor tales como xantina oxidasa, sulfito oxidasa y aldehído oxidasa, las cuales podrían inactivar algunos de los pasos en el metabolismo de la DMH y así dicho carcinógeno no alcanzaría a transformarse en el agente alquilante, el metildiazonio, capaz de generar el ión carbónico que es, en definitiva, el que metila ADN, ARN y proteínas.

Por otra parte, como la enzima alcohol-dehidrogenasa está presente en altas concentraciones en el intestino de ratas y



la misma participa activamente en la transformación del metilazoximetanol en metil-azoxiformaldehído y el Mo es un co-factor de la enzima aldehído oxidasa, podríamos inferir que esta enzima sería la responsable de oxidar grupos aldehídos y transformar al metilazoxiformaldehído en un elemento inocuo para el organismo.

Además el Mo podría también inhibir el proceso de metilación del ADN y proteínas al activar la reacción de dealquilación como fue sugerido por otros investigadores (49).

## 2.2- Frecuencia de tumores benignos y malignos

Nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores en lo referente al predominio en un mayor porcentaje de tumores malignos sobre los tumores benignos (62, 65, 98, 108). En nuestra experiencia observamos: 90,47%, 87,23% y 74,33% de tumores malignos en los Lotes 2 (DMH), 5 (Mo+DMH) y 6 (W+DMH), sin diferencias significativas entre los tres lotes. De esta manera podemos inferir que la molibdenosis y la deficiencia de molibdeno no alteraron el modelo experimental en lo referente a la frecuencia de tumores malignos y benignos.

Por otra parte estudios realizados en biopsias de seres humanos, demuestran que entre los tumores benignos, el porcentaje de AT es del 95%, el de ATV del 4% y el de AV es del 1% (30, 104). Estos porcentajes también se reproducen en modelos biológicos experimentales, principalmente en ratas, siendo los AT los más frecuentes Rubio & Takayama (98), trabajando con diferentes carcinógenos en 300 ratas Sprague - Dawley y 112 ratas Fischer (F344) encontraron un total de 341 tumores de diferentes tipos histológicos pero no observaron adenomas vellosos puros, siendo la mayoría de los tumores benignos adenomas tubulares. En nuestra experiencia sobre un total de 265 tumores no encontramos ningún adenoma velloso puro, siendo la mayoría adenomas tubulares y en menor

porcentaje adenomas tubulovelloso, estos últimos únicamente en el lote 6 tratado con W.

Por otra parte resulta interesante resaltar que tanto en seres humanos, como en animales de experimentación, los tumores benignos son muy pequeños. Así Lindstrom <sup>(57)</sup>, encontró que el 48% de los adenomas fueron diagnosticados microscópicamente, el 39%, tenía un tamaño de 1 a 3mm y el resto, (13%), entre 4 a 6mm. En nuestra experiencia la mayoría de los adenomas fueron muy pequeños, evidenciados principalmente mediante el estudio microscópico.

### **2.3-Relación entre las características macroscópicas y microscópicas de los tumores**

Generalmente existe una correlación entre la forma macroscópica y la estructura microscópica de los tumores del IG en ratas. Como regla, los tumores exofíticos muestran la estructura de adenomas o adenocarcinomas tubulares, mientras que los carcinomas de células en anillo de sello y los mucinosos son principalmente endofíticos; además estos últimos son los que tienden a dar metástasis <sup>(82)</sup>. En nuestra experiencia, estas características de comportamiento tumoral se mantuvieron y no se encontró diferencias entre los tres lotes.

Por otra parte analizando las diferentes formas macroscópicas de tumores (polipoides, planos y ulceroinfiltrantes) se observó que los animales con molibdenosis y con deficiencia de Mo, desarrollaron mayor porcentaje de tumores planos. El lote con molibdenosis presentó además menor porcentaje de tumores ulceroinfiltrantes, estos últimos corroborados histopatológicamente como los tumores más agresivos por su comportamiento infiltrativo, invasión de tejidos pericolónicos, siembra en cavidad abdominal y metástasis en pulmones. Con estos resultados podemos inferir que la molibdenosis y la deficiencia de molibdeno, pueden modificar

la frecuencia no solo del número de tumores sino también del tipo de neoplasias malignas.

#### 2.4- Localización de tumores y de LNT

En los tres lotes tratados con DMH, los tumores se localizaron preferentemente, en el colon distal (CD), 42,85%, 53,19% y 46,90% para los Lotes 2 (DMH), 5 (Mo+DMH) y 6 (W+DMH) respectivamente. Las LNT también se localizaron con mayor frecuencia, en el CD, sin marcadas diferencias entre los tres lotes. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores en los que el CD y el ciego presentan el mayor número de tumores y LNT (65, 103, 108). Por otra parte, Holt (38), investigando la distribución regional de tumores inducidos experimentalmente en 229 ratas con el carcinógeno azoximetano y los efectos con diferentes dietas, observaron que el AOM indujo un 63% más de tumores en CD que el resto del IG. Pero al suplementar las dietas con un alto contenido de grasas (23% de aceite de maíz) los tumores incrementaron tanto en el CD como en CP. No obstante, la restricción calórica con reducción progresiva de la dieta ad-libitum (10-30%) redujo la formación de tumores en el CD sin alterar la frecuencia de tumores en el CP.

En un intento por determinar los factores que pudieran actuar sobre la proliferación celular en el CD, Butler et al (9), realizaron un estudio morfológico determinando la respuesta proliferativa en ratas sometidas a ayuno. En esta investigación revelaron que la densidad de las criptas del colon era de 36% mayor en el CD que en el CP y que el número de colonocitos por unidad de área en el CD era el doble al compararlo con el CP.

Además observaron que la proliferación celular aumentaba en el CD durante el ayuno, pero el mayor incremento de la proliferación ocurría durante el proceso de realimentación en el CP y ciego. De esta manera, los autores concluyeron que existen cambios en la proliferación celular de las distintas

porciones del IG, los cuales pueden ser modificados con la dieta.

En nuestra experiencia, en los tres lotes tratados con DMH predominaron en el CD los ACT, mientras que en el ciego fueron los Ccas, sin diferencias entre los diferentes tratamientos. Nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores (57, 84, 98, 119) en que los Ccas, que son los tumores más indiferenciados, se sitúan en el ciego principalmente, mientras que los Adecarcinomas se ubican preferentemente en el colon distal y recto.

Con respecto al grado de infiltración y metástasis el comportamiento fue similar en los tres lotes, observándose que los tumores Ccas, Cmu y Mixtos fueron los que más infiltraron todas las capas del intestino, inclusive los mismos realizaron metástasis en otros órganos. Estos resultados coinciden con los estudios morfológicos realizados en otras experiencias en ratas (57, 84, 98, 119). Por otra parte, los ACT y ACTV, si bien fueron numerosos en los tres lotes, los mismos presentaron escaso grado de infiltración comprometiendo principalmente la submucosa.

Sobre la base de nuestros resultados podemos inferir que la molibdenosis y la deficiencia de molibdeno no modificaron el modelo experimental en lo referente a la distribución de los tumores y de las LNT en las distintas porciones del IG, como tampoco modificó el comportamiento infiltrativo ni la frecuencia de los ACT y de los Ccas en el CD y en el ciego respectivamente.

## 2.5-Análisis histoquímico y ultraestructural de tumores y LNT

El estudio histoquímico de los tumores permitió caracterizar a los diferentes tipos histológicos de acuerdo a la mayor o menor reacción positiva con las técnicas del PAS y Alcian blue a pH 2,5. No observamos diferencias histoquímicas entre los distintos tipos de neoplasias en los tres lotes tratados con DMH.

Con respecto a las LNT que en total fueron 104 en los tres lotes, las mismas presentaron una débil reacción histoquímica. No se encontraron diferentes grados de coloración que pueda permitirnos inferir si se trata de LNT con distintos grados de diferenciación.

Tampoco pudimos detectar marcadas diferencias histoquímicas entre estas LNT y los adenomas y/o adenocarcinomas tubulares.

Lindstrom <sup>(57)</sup>, observó sobre 50 tumores malignos inducidos experimentalmente en ratas que los adenocarcinomas mostraron reducción histoquímica de mucosustancias neutras y ácidas, principalmente sialomucinas, mientras que todos los tumores con marcada producción de mucus, principalmente Ccas y Cmu fueron ricos en ambos tipos de mucosustancias. Estas observaciones al igual que las nuestras coinciden con la de otros investigadores <sup>(26, 119, 132)</sup>.

Esta disminución y/o ausencia de mucosustancias en LNT, adenomas y adenocarcinomas se deberían probablemente al menor grado de diferenciación celular así como a la ausencia o menor número de células caliciformes <sup>(100, 131-133)</sup> pero debido a que este comportamiento es similar entre una LNT y un ACT resulta de poca utilidad como un posible marcador oncogénico a fin de diferenciar en etapas previas si una LNT podría evolucionar hacia un tumor benigno o hacia un tumor maligno. De la misma manera, no observamos marcadas diferencias entre la mucosa adyacente de las LNT y AT o ACT que nos puedan indicar una lesión preneoplásica.

El estudio ultraestructural mediante MEB reveló anomalías en la superficie de los tumores y de las LNT.

Las neoplasias polipoides presentaron las paredes de las criptas glandulares con diferentes grosores y las bocas u orificios de abertura distorsionadas dando un aspecto irregular característico en todos los tumores polipoides. En los tumores planos, la mayoría ulcerados, no pudimos determinar la superficie de los mismos, por la presencia de abundante tejido necrótico.

Lo más significativo en el estudio ultraestructural correspondió a las LNT, las que fueron evidentes a pequeño aumento, manifestándose como grupos de criptas que sobresalían de la superficie mucosa, con marcada distorsión de los orificios de abertura, aumento del grosor de la pared de las criptas y disminución de las microvellosidades.

Estas observaciones coinciden con la de otros trabajos experimentales en ratas <sup>(79)</sup> y ratones <sup>(5,12)</sup> tratados con DMH.

En lo referente a las microvellosidades, nuestras observaciones corroboran los resultados obtenidos en otras investigaciones en las cuales observaron ultraestructuralmente que la distribución, tamaño y número de las microvellosidades estaban disminuidas en las células tumorales <sup>(2,115,116)</sup>. No obstante, nuestras observaciones indican disminución de microvellosidades en las células de las LNT, sugiriendo que las mismas presentan un menor grado de maduración.

## CONCLUSIONES

El presente estudio arroja varias conclusiones:

### 1. Con respecto al modelo biológico experimental de molibdenosis y deficiencia de Mo.

1.1. La presencia de 200 ppm de Mo y de W en el agua de bebida durante 6 meses no provocó alteraciones físicas ni efectos tóxicos.

1.2. La administración de Mo provocó aumento de las concentraciones de Mo hepático y la administración de W, la disminución del mismo.

1.3. La administración de Mo y de W a la dosis de 200 ppm en el agua de bebida, no alteró los niveles de Cu hepático y sérico.

1.4. Las conclusiones anteriores demuestran que el modelo experimental propuesto respondió a los objetivos planteados en un principio.

### 2. Con respecto a los efectos de la molibdenosis y la deficiencia de Mo sobre la carcinogénesis experimental inducida con DMH.

2.1. La molibdenosis provocó una marcada disminución del número de tumores y de LNT.

2.2. La deficiencia de Mo en el lote tratado con W+DMH no provocó marcadas modificaciones en el número de tumores y de LNT al compararlo con el lote DMH.

2.3. La molibdenosis y la deficiencia de molibdeno no alteraron el modelo experimental en lo referente a la frecuencia de tumores malignos y benignos.

2.4. La molibdenosis no modificó la frecuencia del tipo de tumores benignos al compararlo con el Lote 2 (DMH), no obstante el Lote 6 (W+DMH) presentó además de adenomas tubulares, adenomas tubulovelloso.

2.5. Los animales con molibdenosis y con deficiencia de Mo, desarrollaron mayor porcentaje de tumores planos que el lote tratado únicamente con DMH. Por otra parte el lote con molibdenosis presentó además menor porcentaje de tumores ulceroinfiltrantes, estos últimos corroborados histopatológicamente como los tumores más agresivos por su comportamiento infiltrativo y capacidad de metástasis.

2.5.a. Las conclusiones 2.1, 2.4 y 2.5 hacen inferir que diferentes concentraciones de Mo pueden modificar la frecuencia no solo del número de tumores y de LNT sino también del tipo de neoplasias.

2.6. La molibdenosis y la deficiencia de molibdeno no alteraron el modelo experimental en lo referente a la localización de los tumores y de las LNT en las distintas porciones del IG. En los tres lotes tratados con DMH los tumores se localizaron en mayor porcentaje en el colon distal, mientras que en el ciego fueron los Ccas.

2.7. Histoquímicamente la molibdenosis y la deficiencia de Mo no modificaron las reacciones para mucosustancias neutras y ácidas entre los diferentes tipos de neoplasias.

2.7.a. Las LNT, los adenomas y los adenocarcinomas mostraron reacción negativa para las mucosustancias neutras y ácidas.



2.7.b. Los Ccas y Cmu presentaron intensa reacción positiva para ambas mucosustancias.

2.8. El estudio ultraestructural mediante MEB permitió caracterizar principalmente a las LNT, las que fueron evidentes a pequeño aumento, manifestándose como grupos de criptas que sobresalían de la superficie mucosa, con marcada distorsión de los orificios de abertura, aumento de grosor de la pared de los mismos y disminución de microvellosidades.

## BIBLIOGRAFIA

- 1-ALBERTS, D.S.; RITENBAUGH, C.; STORY, J.A.; AICKIN, M.; REES-McGEE, S.; BULLER, M.K.; ATWOOD, J.; PHELPS, J.; RAMANUJAM, P.S.; BELLAPRAVALU, S.; PATEL, J.; BEXTINGER, L.; CLARK, L. (1996) Randomized, double-blinded, placebo-controlled study of effect of wheat bran fiber and calcium on fecal bile acids in patients with resected adenomatous colon polyps. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 81-92.
- 2-BARKLA, D.H.; TUTTON, P.J.M. (1977) Surface changes in the descending colon of rats treated with dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 37: 262-271.
- 3-BARSOUM, G.H.; THOMPSON, H.; NEOPTOLEMOS, J.P.; KEIGHLEY, M.R. (1992) Dietary calcium does not reduce experimental colorectal carcinogenesis after small bowel resection despite reducing cellular proliferation. *Gut* 33: 1515-1520.
- 4-BEATY, M.M.; LEE, E.Y.; GLAUERT, H.P. (1993) Influence of dietary calcium and vitamin D on colon epithelial cell proliferation and 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats fed high fat diets. *J. Nutr.* 123: 144-152.
- 5-BIRD, R.P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37: 147-151.
- 6-BRALOW, S.P.; WEISBURGER, J.H. (1976) Experimental carcinogenesis in the digestive organs. *Clin. Gastroenterol.* 5: 527-542.
- 7-BURKITT, D.P. (1971) Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 28: 3-13.

- 8-BURRELL, R.J.; ROACH, W.A.; SHADWELL, A. (1966) Esophageal cancer in the Bantu of the Transkei associated with mineral deficiency in garden plants. *J. Natl. Cancer Inst.* 36: 201-209.
- 9-BUTLER, R.N.; BRUHN, B.; PASCOE, V.; FETTMAN, M.J.; ROBERTS THOMSON, I.C. (1992) Regional factors affecting proliferation in the large intestine of the rat. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1: 133-137.
- 10-CAMERON, I.L.; ORD, V.A.; HUNTER, K.E.; PADILLA, G.M.; HEITMAN, D.W. (1989) Suppression of a carcinogen (DMH) induced increase in mitotic activity in the colonic crypts of rats by addition of dietary cellulose. *Cancer Res.* 49: 991.
- 11-CAPOCACCIA, R.; FARCHI, G.; MARIOTTI, S.; VERDECCHIA, A.; ANGELI, A.; SCIPIONE, R. (1987) La mortalita in Italia nell'anno 1982. Rome: Instituto Centrale Di Statistica (ISTAT).
- 12-CARTER, J.W.; LANCASTER, H.A.; HARMAN, W.E.; CAMERON, I.L. (1994) Distribution of intestine-associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *Cancer Res.* 54: 4.304-4.307.
- 13-CASTRO, J.A. (1986) Cáncer, alimentación y alimento. *Epidemiología y etiología del cáncer de colon. II. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 17: 213-231.
- 14-CHEN, W.F.; PATCHEFESKY, A.S.; GOLSMITH, H.S. (1978) Colonic protection from dimethylhydrazine by a high fiber diet. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 147: 503-506.
- 15-COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (2000). *Robbins. Patología Estructural y Funcional. 6ª. Ed. Mc Graw-Hill. Interamericana, Mexico, 861-878.*

16-DAVIS, G.K (1950) The influence of copper on the metabolism of phosphorus and molybdenum. En: Mc ELROY, W.D. & Glass B.(eds): Copper metabolism: A symposium on Animal, plant and soil relationships. The Johns Hopkins Press, Baltimore, 216-229.

17-DAWSEY, S.M.; WANG, G.Q.; TAYLOR, P.R.; LI, J.Y.; BLOT, W. J.; LI, B.; LEWIN, K.J.; LIU, F.S.; WEINSTEIN, W.M.; WIGGETT, S. (1994) Effects of vitamin/ mineral supplementation of the prevalence of histological dysplasia and early cancer of the esophagus and stomach: results from the dysplasia and early cancer of the esophagus and stomach: results from the dysplasia trial in Linxian, China. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 3: 167-172.

18-DE COSSE, J.J. (1991) Clinical brief: cancer and fiber. Cancer Prev. 1: 13.

19-Department of Chemical Etiology and Carcinogenesis, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences. (1978) Molybdenum content in serum, urine and hair samples among inhabitants of high and low incidence areas of esophageal cancer in Henan Province. Res. Cancer Prevent Treat. 4: 19-24.

20-DE RENZO, E.C. (1954) Studies on the nature of the xanthine oxidase factor. Ann N.Y. Acad. Sci. 57: 905-908.

21-DEVESA, S.S.; CHOW, W.H. (1993) Variation in colorectal cancer incidence in the United States by subsite of origin. Cancer 71: 3.819-3.826.

22-DI SILVESTRO, R.A.; GREENSON, J.K.; LIAO, Z. (1992) Effects of Copper intake on dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 201: 94-97.

- 23-DOLL, R.; PETO, R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 1.191-1.308.
- 24-DWORKIN, B.M.; ROSENTHAL, W.S.; MITTELMAN, A.; WEISS, L.; APPLEBEE-BRADY, L.; ARLIN, Z. (1988) Selenium status and the polyp-cancer sequence: a colonoscopically controlled study. *Am. J. Gastroenterol.* 83: 747-748.
- 25-FIALA, E.S.; KULAKIS, C.; BOBTAS, G. (1976) Detection and estimation of Azomethane in expired air of 1,2dimethylhydrazine treated rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 1.271-1.273.
- 26-FILIPE, M.I.; BRANFOOT, A.C. (1974) Abnormal patterns of mucus secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma. *Cancer* 34: 282-289.
- 27-FUNGWE, T.V.; BUDDINGH, C.D.; DEMICK, D.S.; LOX, CH.D.; YANG, M.T.; YANG, S.P. (1990) The role of dietary Molybdenum on estrous activity, fertility, reproduction and Molybdenum and copper enzyme activities of female rats. *Nutr. Res.* 10: 515-524.
- 28-GERSHBEIN, L.L. (1994) Action on dietary trypsin, pressed coffee oil, silymarin and iron salt on 1,2-dimethylhydrazine tumorigenesis by gavages. *Anticancer Res.* 14: 1.113-1.116.
- 29-GERSHBEIN, L.L.; REZAI, V.K.; AMIR-MOKRI, E.; RAO, K.C. (1993) Adenocarcinoma production in rats administered 1,2-DMH and fed iron salt diet. *Anticancer Res.* 13: 2.027-2.030.
- 30-GILLESPIE, P.E.; CHAMBERS, T.J.; CHAN, K.W.; DORONZO, F.; MORSON, B.C.; WILLIAMS, C.B. (1979) Colonic adenomas-colonosopic survey. *Gut* 20: 240-245.
- 31-GRAB, D.J.; ZEDEK, M.S. (1977) Organ-specific effects of the carcinogen methylazoximethanol related to metabolism by

nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenase. Cancer Res. 37: 4.182-4.189.

32-GREENE, F.L.; LAMB, L.S.; BARWICK, M.; PAPPAS, N.J.J. (1987) Effect of dietary copper on colonic tumor production and aortic integrity in the rat. Surg. Res. 42: 503-512.

33-GREENWALD, P. (1992) Colon Cancer Overview. Cancer supplement 70: 1.206- 1.215.

34-HAENSZEL, W.; BERG, J.W.; KURIHARA, M.; LOCKE, F.B. (1976) Large bowel cancer in Hawaiian Japanese. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1.764-1.799.

35-HAWKS, A.; MAGEE, P.N. (1974) The alkylation's of nucleic acids of rat and mouse in vivo by the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. Br. J. Cancer 30: 440-446.

36-HAWKS, A.; SWANN, P.F.; MAGEE, P.N. (1971) Probable methylation of nucleic acids of mouse colon by 1,2-dimethylhydrazine in vivo. Biochem. Pharmacol. 21: 432-435.

37-HIROSE, M.; MASUDA, A.; ITO, N.; KAMANO, K.; OKUYAMA, H. (1990) Effects of dietary perilla oil, soybean oil and sunflower oil on 7,12-dimethylbenz-a-antracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) -Induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. Carcinogenesis 11: 731-735.

38-HOLT, P.R.; MOKUOLU, A.O.; DISTLER, P.; LIU, T.; REDDY, B.S. (1996) Regional distribution of carcinogen-induced colonic neoplasia in the rat. Nutr. Cancer 2: 129-135.

39-IGARZA, L.; QUIROGA, M.A.; AGOSTINI, M.C.; AUZA, N. (1999) Modelo experimental para el estudio de la molibdenosis y de la deficiencia primaria de cobre en ratas. Acta Physiologica Pharmacologica ET Terapeutica Latinoamericana 49: 170-176.

40-ISCOVICH, J.M. (1978) A cancer mortality analysis of the Province of Buenos Aires (Argentina). *Rev. Esp. Oncología* 26: 173-175.

41-ISCOVICH, J.M. (1979) Mortalidad por cáncer en la provincia de Buenos Aires. *Quirón* 10: 9-27.

42-ISCOVICH, J.M.; L' ABBE, K.A.; CASTELLETO, R.; CALZONA, A.; BERNEDO, A.; CHOPITA, N.A.; JMELNITZSKY, A.C.; KALDOR, J. (1992) Colon cancer in Argentina. I: Risk from intake of dietary items. *Int. J. Cancer* 51: 851-857.

43-ISCOVICH, J.M.; L' ABBE, K.A.; CASTELLETO, R.; CALZONA, A.; BERNEDO, A.; CHOPITA, N.A.; JMELNITZSKY, A.C.; KALDOR, J.; HOWE, G.R. (1992) Colon cancer in Argentina. II: Risk from fiber, fat and nutrients. *Int. J. Cancer* 51: 858-861.

44-JACOBY, R.F.; BOLT, M.J.; DOLAN, M.E.; OTTO, G.; DUDEIA, P.; SITRIM, M.D.; BRASITUS, T.A. (1993) Supplemental dietary calcium fails to alter the acute effects of 1,2-dimethylhydrazine on O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and cellular proliferations in the rat colon. *Carcinogenesis* 14: 1175-1179.

45-JAO, S.W.; LEE, W.; HO, Y.S. (1990) Effects of germanium on 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 33: 99-104.

46-JETER, M.A. & DAVIS, G.K. (1954) The effect of dietary molybdenum upon growth, hemoglobin, reproduction and lactation of rats. *J. Nutr.* 54: 215-220.

47-KARKARE, M.R.; CLARK, T. D.; GLAUERT, H. P. (1991) Effect of dietary calcium on colon carcinogenesis induced by a single injection of 1,2-dimethylhydrazine in rats. *J. Nutr.* 121: 568-577.

48-KINSELLA, J.E. (1986) Food components with potential therapeutic benefits in n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. Food Tech. 40: 89-97.

49-KOIZUMI, T.; TAJIMA, K.; EMI, N.; HARA, A.; SUZUKI, K.T. (1995) Suppressive effect of molybdenum on hepatotoxicity of N nitrosodiethylamine in rats. Biol. Pharm. Bull. 18: 460-462.

50-KOPF-MAIER, P.; LEITNER, Z.; VOIGTLANDER, R.; KOPF, H.M (1979) Molybdocene dichloride as an anti-tumor agent. Z. Naturforsch. 34: 1.174-1.176.

51-KOMADA, H.; KISE, Y.; NAKAGAWA, M.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. (1990) Effect of dietary molybdenum on esophageal carcinogenesis in rats induced by N-methyl-N-benzyl-nitrosamine. Cancer Res. 50: 2418-2422.

52-KLURFELD, D.M. (1992) Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. Cancer Res. 52: 2055-2059.

53-KURATKO, C.; PENCE, B.C. (1992) Rat colonic antioxidant status: interaction of dietary fats with 1,2-dimethylhydrazine challenge. J. Nutr. 122: 278-282.

54-LA MONT, J.T.; O'GORMAN, T.A. (1978) Experimental colon cancer. Gastroenterology 75: 1.157-1.169.

55-LAMPE, J.W.; SLAVIN, J.L.; MELCHER, E.A.; POTTER, J.D. (1992) Effects of cereal and vegetable fiber feeding on potential risk factors for colon cancer. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 11: 207-211.

56-LAPRE, J.A.; DE VRIES, H.T.; VANDER MEER, R. (1993) Cytotoxicity of feed water in dependent on the type of dietary fat and is reduced by supplemental calcium phosphate in rats. J. Nutr. 123: 578-585.



57-LINDSTROM, C.G. (1978) Experimental colo-rectal tumors in the rat. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section A, Suppl. 268: 1-75.

58-LUO, X.M.; LU, S.M.; LIU, Y.Y. (1982) The multiple correlation study on esophageal cancer mortality and contents of chemical elements in drinking water and grains from 50 Peoples Communes in Henan Province. Chin. J. Epidemiol. 3: 91-96.

59-LUO, X.M.; WEI, HUI-JUAN.; YANG, S.P. (1983) Forestomach carcinogenesis in rats. INCI 71: 75-78.

60-LUPTON, J.R.; CHEN, X.Q.; FROLICH, W. (1995) Calcium phosphate supplementation results in lower rat fecal bile acid concentrations and a more quiescent colonic cell proliferation pattern than does calcium lactate. Nutr. Cancer 23: 221-231.

61-MADAR, Z.; TIMAR, B.; NYSKA, A.; ZUSMAN, I. (1993) Effects of high-fiber diets on pathological changes in DMH-induced rat colon cancer. Nutr. Cancer 20: 87-96.

62-MADARA, J.L.; HARTE, P.; DEASY, J.; ROSS, D.; STEELE, G. (1983) Evidence for an Adenoma-carcinoma sequence in dimethylhydrazine-induced neoplasm of rat intestinal epithelium. Am J. Pathol. 110: 230-235.

63-Mc GARRITY, T.J.; PEIFFER, L.P. (1993) Selenium and difluoromethylornithine additively inhibit DMH-induced distal colon tumor formation in rats fed a fiber-free diet. Carcinogenesis 14: 2.335-2.340.

64-Mc INTOSH, G.H. (1992) The influence of dietary vitamin E and calcium status on intestinal tumors in rats. Nutr. Cancer 17: 47-55.

65-MASKENS, A.P.; DUJARDIN-LOITS, R.M. (1981) Experimental adenomas and carcinomas of the large intestine behave as distinct entities: most carcinomas arise de novo in flat mucosa. *Cancer* 47: 81-89.

66-MATSUMOTO, H.T.; HIGA, H.H. (1966) Studies on methylazoxymethanol, the aglicone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem. J.* 98: 20-22.

67-MILLER, R.F. & ENGEL, R.W. (1960) Interrelations of copper, molybdenum and sulfate sulfur in nutrition. *Fed. Proc.* 19: 666-667.

68-MILLER, R.F.; PRICE, N.O.; ENGEL, R.W. (1956) Added dietary inorganic sulfate and its effect upon rats fed molybdenum. *J. Nutr.* 60: 539-547.

69-MORI, H.; MORISHITA, Y.; SHINODA, T.; TANAKA, T. (1993) Preventive effect of magnesium hydroxide on carcinogen-induced large bowel carcinogenesis in rats. *Basic Life Sci.* 61: 111-118.

70-MUTO, T.; BUSSEY, H.J.R.; MORSON, B.C. (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36: 2.251-2.270.

71-NAGASAWA, H.T.; SHIROTA, F.N.; MATSUMOTO, H. (1972) Decomposition of methylazoxymethanol, the aglicone of cycasin in D20. *Nature* 236: 234-235.

72-NARISAWA, T.; MAGADIA, N.E.; WEISBURGER, J.H.; WYNDER, E.L. (1974) Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1.093-1.097.

73-NEILANDS, J.B.; STRONG, F.M.; ELVEHJEM, C.A. (1948) Molybdenum in the nutrition of the rat. J. Biol. Chem. 172: 431-439.

74-NELSON, R.; HOLIAN, O. (1991) Effects of dietary fish oil and corn oil on protein kinase in rat colonic adenocarcinoma. Anticancer Res. 11: 157-160.

75-NELSON, R.L.; DAVIS, F.G.; SUTTER, E.; SOBIN, L.H.; KIKENDALL, J.W.; BOWEN, P. (1994) Body iron stores and risk of colonic neoplasia. J. Natl. Cancer Inst. 86: 455-460.

76-NEMENKO, B.A.; MOLDAKULOVA, M.M.; ZORINA, S.N. (1976) Rasprostranenie raka pishchevoda V Gur'evskoi oblasti v zavisimosti ot mineral'nogo sostava pit' evoi vody. Vopr. Onkol (Leningr) 22: 75-76.

77-NEUMARK, H.L.; LIPKIN, M. (1992) Calcium, Vitamin D and colon cancer. Cancer Res. 52: 2.067-2.070.

78-OSTROM, C.A.; VAN REEN, R.; MILLER, C.W. (1961) Changes in the connective tissue of rats fed toxic diets containing molybdenum salts. J. Dent. Res. 40: 520-528.

79-PAULSEN, J.E.; STEFFENSEN, I.L.; NAMORK, E.; ALEXANDER, J. (1994) Scanning electron microscopy of aberrant crypt foci in rat colon. Carcinogenesis 10: 2.371-2.373.

80-PENCE, B.C. (1991) Dietary selenium and antioxidant status: toxic effects of 1,2-dimethylhydrazine in rats. J. Nutr. 121: 138-144.

81-PENCE, B.C. (1993) Role of calcium in colon cancer prevention: experimental and clinical studies. Mutat Res. 290: 87-95.

82-POZHARISSKI, K.M. (1972) Intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. Vop. Onkol. 18: 64-71.

83-POZHARISSKI, K.M. (1973) Tumors of the intestines. En: TUROSOV, V.S.(ed): Pathology of Tumors in laboratory animals. Vol. 1. Tumors of the rat. IARC Scientific Publications N° 5: 119- 40.

84-POZHARISSKI, K.M. (1975) Morphology and Experimental Epithelial Tumors of the Intestine. J. Natl. Cancer Inst. 54: 1.115-1.123.

85-RAO, C.V.; REDDY, B.S. (1993) Modulating effect of amount and types of dietary fat on ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase and prostaglandin production during colon carcinogenesis in male F344 rats. Carcinogenesis 14: 1.327-1.333.

86-REDDY, B.S. (1981) Dietary fiber and colon carcinogenesis: a critical review. En: VAHOUNY, G.V.; KRITCHEVSKY, D. (eds): Dietary fiber in health and disease. New York: Plenum, 265-285.

87-REDDY, B.S. (1986) Colon Cancer: future directions. En: VAHOUNY, G.V.; KRITCHEVSKY, D. (eds): Dietary fiber: basic and clinical applications. New York: Plenum, 543-552.

88-REDDY, B.S. (1987) Dietary fiber and colon cancer: animal model studies. Prev. Med. 16: 559-565.

89-REDDY, B.S. (1992) Dietary fat and colon cancer: animal model studies. Lipids 27: 807-813.

90-REDDY, B.S.; BURILL, C.; RIGOTTY, J. (1991) Effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and post initiation stages of colon carcinogenesis. Cancer Res. 51: 487-491.

91-REDDY, B. S.; ENGLE, A.; KATSIFIS, S.; SIMI, B.; BARTRAM, H-P.; PERRINO, P. (1989) Biochemical epidemiology of colon cancer: effects of types of dietary fiber on fecal mutagens, acid, and neutral sterols in healthy subjects. *Cancer Res.* 49: 4.629-4.635.

92-REDDY, B.S.; HEDGES, A.R.; LAAKSO, K.; WYNDER, E.L. (1978) Metabolic epidemiology large bowel cancer: fecal bulk and constituents of high-risk North American and low-risk Finnish population. *Cancer* 42: 2.832-2.838.

93-REDDY, B.S.; SHARMA, C.; SIMI, B.; ENGLE, A.; LAAKSO, K.; PUSKA, P. (1987) Metabolic epidemiology of colon cancer: effect of dietary fiber on fecal mutagens and bile acids in healthy subjects. *Cancer Res.* 47: 644-648.

94-REDDY, B.S.; WEISBURGER, J.H.; WYNDER, E.L. (1974) Fecal bacterial B-glucuronidase: control by diet. *Science* 183: 416-417.

95-REDDY, B.S.; WEISBURGER, J.H.; WYNDER, E.L. (1974) Effects of dietary fat level and dimethylhydrazine on fecal acid and neutral sterol excretion and colon carcinogenesis in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 507-511.

96-REDDY, B.S.; WYNDER, E.L. (1973) Large bowel carcinogenesis: fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 1.437-1.442.

97-ROBLEE, N.M.; BIRD, R.P. (1994) Effects of high corn oil on preneoplastic murine colon: prostanoid production and lipid composition. *Lipids* 29: 67-71.

98-RUBIO, C.A.; TAKAYAMA, S. (1994) Difference in histology and size in colonic tumors of rats receiving two different

carcinogens. *Journal of Environmental Pathology, toxicology and Oncology* 13: 191-197.

99-RUBIO, C.A.; NYLANDER, G.; SVEANDER, M.; DUVANDER, A.; ALUN, M.L. (1986) Minimal invasive carcinoma of the colon in rats. *Am. J. Pathol.* 123: 161-165.

100-SANCHEZ NEGRETTE, M.; BORDA, J.T.; MONTENEGRO, M.A.; LERTORA, J.W. (1998) Estudio histológico e histoquímico de lesiones hiperplásicas y displásicas del intestino grueso en *Cebus apella* (Primate) tratado con 1,2-dimetilhidrazina. *Acta Physiologica Pharmacologica et Terapeutica Latinoamericana.* 48: 211-223.

101-SCHNEIDER, H. (1992) A factor in the increased risk of colorectal cancer due to ingestion of animal fat is inhibition of colon epithelial cell glutathione S-transferase, an enzyme that detoxifies mutagens. *Med. Hypotheses* 39: 119-122.

102-SEABORN, C.D.; YANG, S.P. (1993) Effect of molybdenum supplementation on N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinogenesis and molybdenum excretion in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 39: 245-256.

103-SHIMODA, T.; IKEGAMI, M.; FUJISAKI, J.; MATSUI, T.; AIZAWA, S.; ISHIKAWA, E. (1989) Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 64:1.138-1.146.

104-SHINYA, H.; WOLFF, W.I. (1979) Morphology, anatomic distribution and cancer potential of polyps. An analysis of 7.000 polyps endoscopically removed. *Ann. Surg.* 190: 679-683.

105-SITRIM, D.M.; HALLINE, A.G.; ABRAHAMS, C.; BRASITUS, T.A. (1991) Dietary calcium and vitamin D modulate 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* 51: 5.608-5.613.

- 106-SLOAN, D.A.; FLEISZER, D.M.; RICHARDS, G.K.; MURRAY, D.; BROWN, R.A. (1993) The effect of the fiber components cellulose and lignin on experimental colon neoplasia. *J. Surg. Oncol.* 52: 77-82.
- 107-STEINBACH, G.; LUPTON, J.; REDDY, B.S.; KRAL, J.G.; HOLT, P.R. (1994) Effect of calcium supplementation on rectal epithelial hyperproliferation in intestinal by-pass subjects. *Gastroenterology* 106: 1.162-1.167.
- 108-SUNTER, J.P.; APPLETON, D.R.; WRIGHT, N.A.; WATSON, A.J. (1978) Pathological features of the colonic tumors induced in rats by the administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 29: 211-223.
- 109-SUZUKI, K.; MITSUOKA, T. (1992) Effect of low-fat, high-fat, and fiber-supplemented high-fat diets on colon cancer risk factors in feces of healthy subjects. *Nutr. Cancer* 18: 63-71.
- 110-TAJIMA, K.; HIRSE, K.; NAKAGAWA, N.; KUROSHISHI, T.; TOMINAGA, S. (1985) Urban-rural differences in the trend of colo-rectal cancer in Japan. *Jpn. J. Cancer Res.* 76: 717-728.
- 111-TAMURA K.; ISHIGURO, S.; MUNAKATA, A.; YOSHIDA, Y.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. (1996) Annual Changer in colorectal Carcinoma incidence in Japan. Analysis of survey data on incidence in Aomori prefecture. *Cancer* 8: 1.187-1.194.
- 112-THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSSEN, E. (1992) Effect of a dietary fiber (beet fiber) on dimethylhydrazine-induced colon cancer in Wistar rats. *Nutr. Cancer* 17: 251-261.
- 113-THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSSEN, E. (1994) Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced

aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats. Nutr. Cancer 21: 177-182.

114-TOPHAM, R.W.; WALKER, M.C.; CALISCH, M.P.; WILLIAMS, R.W. (1982) Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. Biochemistry 21: 4.529-4.535.

115-TOTH, B.; MALICK, L.; SHIMIZU, H. (1976) Production of intestinal and other tumors by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. Am. J. Pathol. 84: 6986.

116-TRAYNOR, O.J.; COSTA, N.L.; WOOD, C.B. (1983) A scanning electron microscopically study of changes in the colonic mucus layer during chemical carcinogenesis. Cancer 51: 1.847-1.853.

117-VAN REEN, R. (1959) The specificity of the molybdate-sulfate interrelationship in rats. J. Nutr. 68: 243-250.

118-WANG, G.Q.; DAWSEY, S.M.; LI, J.Y.; TAYLOR, P.R.; LI, B.; BLOT, W.J.; WEINSTEIN, W.M.; LIU, F.S.; LEWIN, K.J.; WANG, H. (1994) Effect of vitamin/mineral supplementation on the prevalence of histological dysplasia and early cancer of the esophagus and stomach: results from the general population trial in Linxian, China. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 3: 161-166.

119-WARD, J.M. (1974) Morphogenesis of chemically induced neoplasm of the colon and small intestine in rats. Laboratory Investigation 4: 505-513.

120-WARGOVICH, M.J.; ALLNUTT, D.; PALMER, C.; ANAYA, P.; STEPHENS, L.C. (1990) Inhibition of the promotional phase of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in the F344 rat by calcium lactate: effect of simulating two human nutrient density levels. Cancer Lett. 53: 17-25.



- 121-WEI, H.J.; LUO, X.M; YANG, S.P. (1985) Effects of Molybdenum and Tungsten on mammary carcinogenesis in SD rats. J. Natl. Cancer Inst. 74: 469-473.
- 122-WEISBURGER, J.H. (1971) Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. Cancer 28: 60-70.
- 123-WEISBURGER, J.H.; WYNDER, E.L. (1991) Dietary fat intake and cancer. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 5: 7-23.
- 124-WYNDER, E.L.; FUJITA, Y.; HARRIS, R.E.; HIRAYAMA, T.; HIYAMA, T. (1991) Comparative epidemiology of cancer between the United States and Japan: a second look. Cancer 67: 746-763.
- 125-WYNDER, E.L.; KAJITANI, T.; ISHIKAWA, T.; DODO, H.; TAKANO, A. (1969) Environmental factors of cancer of the colon and rectum II, Japanese epidemiological data. Cancer 23: 1.210-1.220.
- 126-WYNDER, E.L.; REDDY, B.S. (1973) Studies of large bowel cancer: human leads to experimental application. J. Natl. Cancer Inst. 50: 1.099-1.106.
- 127-WYNDER, E.L.; REDDY, B.S. (1974) The epidemiology of cancer of the large bowel. Am. J. Dig. Dis. 19: 937-946.
- 128-WYNDER, E.L.; REDDY, B.S.; WEISBURGER, J.H. (1992) Environmental dietary factors in colorectal issues. Some unresolved issues. Cancer 70: 1.222-1.228.
- 129-WYNDER, E.L.; SHIGEMATSU, T. (1967) Environmental factors of cancer of the colon and rectum. Cancer 20: 1.520-1.561.
- 130-YANG, G. (1993) Relationship between colorectal cancer and ten inorganic elements. Chung Hua Yu Fang Y Hsueh Tsa Chih. 27: 282-285.

131-ZUSMAN, I.; MADAR, Z.; NYSKA, A. (1992) Individual variability of pathological parameters in chemically induced rat colon tumors. Acta Anat. 145: 106-111.

132- ZUSMAN, I.; ZIMBER, A.; MADAR, Z.; NYSKA, A. (1992) Morphological, histochemical and immunohistochemical differences between tumors and adjacent tissues in chemically induced colon cancer in rats. Acta Anat. 145: 29-34.

133- ZUSMAN, I.; ZIMBER, A.; NYSKA, A. (1991) Role of morphological methods in the analysis of chemically induced colon cancer in rats. Acta Anat. 142: 351-356.

**Anexo 1**

Peso expresado en gramos (gr), de los seis lotes estudiados, en los tres momentos que se tomaron de referencia.

**Lote 1: sin tratamiento**

Lote 1	M 1	M 2	M 3
rata			
1	290	350	400
2	160	310	340
3	290	340	370
4	310	360	410
5	270	330	370
6	240	300	360
7	310	360	390
8	230	270	320
9	280	360	390
10	270	330	370
11	260	310	340
12	270	330	380
13	290	340	370
14	280	360	410
15	330	380	420
16	270	330	360
17	260	310	340
18	270	340	370
19	290	340	380
20	280	360	390
x	272,5	335,5	374
S	35.075	26.051	26.237

**Lote 2: tratado con DMH**

Lote 2	M 1	M 2	M 3
rata			
1	310	350	400
2	270	330	380
3	290	340	370
4	280	360	410
5	330	380	410
6	270	330	360
7	260	310	340
8	270	340	370
9	290	340	380
10	280	360	390
11	290	350	400
12	260	310	340
13	290	340	370
14	310	360	400
15	270	330	370
16	270	310	360
17	310	350	400
18	240	270	320
19	280	360	390
20	270	330	370
x	282	337,5	376,5
S	21.175	24.468	24.553

M 1: Corresponde al final del segundo mes de tratamiento con Mo y W

M 2: Corresponde al final del tratamiento con DMH (6 ° mes de la experiencia)

M 3: Final de la experiencia al 9° mes

X: Media S: Desvío standard (n - 1)

**Lote 3: tratado con Mo**

Lote 3	M 1	M 2	M 3
rata			
1	240	300	330
2	230	290	330
3	230	280	320
4	270	320	350
5	280	330	360
6	270	340	370
7	280	330	360
8	270	350	380
9	260	330	370
10	270	320	360
11	280	340	370
12	260	330	370
13	290	340	360
14	270	330	370
15	280	330	360
16	260	320	350
17	280	330	360
18	270	320	360
19	260	310	350
20	290	340	370
x	267	324	357.5
S	17.198	17.591	15.517

**Lote 4: tratado con W**

Lote 4	M 1	M 2	M 3
rata			
1	280	310	340
2	300	340	370
3	320	350	380
4	290	330	370
5	310	350	380
6	310	340	380
7	290	330	360
8	300	330	360
9	280	310	340
10	300	330	370
11	270	310	340
12	320	350	380
13	300	340	380
14	270	320	360
15	280	310	350
16	310	350	380
17	310	340	370
18	290	330	370
19	320	360	380
20	270	310	340
X	296	332	365
S	16.982	16.091	15.389

M 1: Corresponde al final del segundo mes de tratamiento con Mo y W

M 2: Corresponde al final del tratamiento con DMH (6 ° mes de la experiencia)

M 3: Final de la experiencia al 9° mes

X : Media

S : Desvio standart (n - 1)

**Lote 5: tratado con Mo+DMH**

Lote 5	M 1	M 2	M 3
rata			
1	250	280	340
2	290	350	400
3	280	290	330
4	310	350	390
5	280	360	390
6	310	360	410
7	320	380	420
8	270	330	370
9	270	330	280
10	250	290	320
11	290	340	370
12	250	320	360
13	230	270	320
14	290	330	380
15	270	340	370
16	330	380	410
17	260	310	340
18	240	300	360
19	250	280	320
20	250	300	350
X	274.5	324.5	361.5
S	27.999	33.478	36.745

**Lote 6: tratado con W+DMH**

Lote 6	M 1	M 2	M 3
rata			
1	240	280	330
2	260	300	330
3	270	360	390
4	270	340	360
5	290	340	390
6	260	300	340
7	260	320	350
8	300	370	410
9	330	300	330
10	260	340	380
11	280	400	410
12	280	360	370
13	250	320	350
14	270	350	380
15	280	350	380
16	280	340	370
17	290	380	410
18	300	400	400
19	300	370	370
20	310	360	360
X	279	344	370.5
S	21.980	33.150	26.650

M 1: Corresponde al final del segundo mes de tratamiento con Mo y W

M 2: Corresponde al final del tratamiento con DMH (6 ° mes de la experiencia)

M 3: Final de la experiencia al 9° mes

X : Media

S : Desvio standart (n - 1)

Ganancia promedio de peso, expresada en gramos, de los 6 lotes en los tres momentos estudiados

Momentos	M 1	M 2	M 3
Lotes			
Lote 1 (sin tratamiento)	272,5	335,5	374
Lote 2 (DMH)	282	337,5	376,5
Lote 3 (Mo)	267	324	357,5
Lote 4 (W)	296	332	365
Lote 5 (Mo+DMH)	274,5	324,5	361,5
Lote 6 (W+DMH)	279	344	370,5

M 1: Corresponde al final del segundo mes de tratamiento con Mo y W  
M 2: Corresponde al final del tratamiento con DMH (6 ° mes de la experiencia)  
M 3: Final de la experiencia al 9 ° mes

