

# Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno

Montenegro, M.A.; Sánchez Negrette, M.; Lértora, W.J.; Catuogno, M.S.

Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax: 03783-425753, E-mail: patgral@vet.unne.edu.ar

## Resumen

**Montenegro, M.A.; Sánchez Negrette, M.; Lértora, W.J.; Catuogno, M.S.: Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno.** Con el propósito de investigar frecuencia, desarrollo y localización de focos de criptas displásicas (FCD) inducidos por el cancerígeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno, fueron utilizados 120 machos de la cepa Wistar, de 3 meses de edad, mantenidos con dieta balanceada *ad-libitum* y agua desmineralizada. Molibdeno (Mo) y tungsteno (W) fueron administrados en el agua de bebida a la concentración de 200 ppm. Los FCD fueron inducidos mediante inyección subcutánea semanal de DMH durante 16 semanas, a la dosis de 20 mg/kg de peso corporal. El Mo, en 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 forma de tungstenato de sodio  $(\text{Na}_2\text{WO}_4)$ , fueron administrados en el agua de bebida a partir de los dos meses previos a la iniciación del tratamiento con DMH y continuaron suministrándose durante 4 meses más, hasta la última dosis de DMH. Todos los animales fueron sacrificados 3 meses después de concluido el tratamiento con DMH. Cortes histológicos de cada uno de los segmentos del intestino grueso fueron examinados a fin de detectar, localizar y caracterizar a los FCD, como así también determinar su relación con los nódulos linfoides asociados al intestino. En el grupo con molibdenosis se observó una significativa disminución del número de FCD ( $n=27$ ), comparado con el grupo tratado únicamente con DMH ( $n=49$ ) y el grupo tratado con tungsteno ( $n=35$ ). Estos datos refuerzan la teoría que diversos componentes de la dieta pueden jugar un importante rol en la causa y prevención del cáncer de colon, tanto en seres humanos como en animales de laboratorio.

**Palabras clave:** criptas displásicas, dimetilhidrazina, molibdeno, tungsteno, ratas.

## INTRODUCCIÓN

Los modelos experimentales en animales brindan una excelente oportunidad para el estudio de procesos tumorales y para efectuar experimentos con diversos factores del medio ambiente, que permiten estimar la etiología, el tratamiento y la prevención del cáncer de colon. Así, el estudio de estados preneoplásicos en el colon, es posible mediante la identificación de lesiones conocidas como *focos de criptas aberrantes* (FCA). Son lesiones encontradas tanto en roedores tratados con carcinógenos, como en forma espontánea en seres humanos, y representan el estado inicial del cáncer colónico<sup>25,30</sup>. El estudio de FCA es realizado en trozos de intestino observados bajo lupa y en cortes histológicos<sup>2</sup>; abarcan lesiones en criptas con fenómenos proliferativos, hiperplásicos, diferentes grados de displasia y pequeños adenomas<sup>10</sup>.

Con referencia al estado inicial del cáncer colónico, existen trabajos que determinan la presencia de lesio-

nes neoplásicas tempranas, conocidas como *focos de criptas displásicas* (FCD), formados por áreas focales de criptas con diferentes grados de displasia, luces dilatadas y en ocasiones de contornos irregulares, con marcada basofilia celular, frecuentes figuras mitóticas, disminución de células mucosas, así como estratificación y pérdida de la polaridad. Los FCD comprometen sólo la mucosa y no van más allá de la muscular de la mucosa<sup>38</sup>.

La existencia de FCA y de criptas hiperplásicas con localización predominante sobre y alrededor de los *nódulos linfoides asociados al intestino* (NLA), fueron estudiados en ratas y ratones tratados con 1,2-dimetilhidrazina a fin de determinar el papel de los acúmulos linfoides en la carcinogénesis colónica<sup>13,36</sup>. Así, en diversas investigaciones se encontró que los adenocarcinomas colónicos inducidos experimentalmente en ratas se originaron preferentemente en criptas relacionadas con los NLA<sup>8,38</sup>. Estos resultados sostienen que los NLA desempeñan un rol de promoción en la carcinogénesis del colon.

Muchos componentes de la dieta han sido implicados como promotores o inhibidores de la carcinogénesis colónica, los cuales afectan el crecimiento de las criptas en fases tempranas de la carcinogénesis, estudiadas mediante la identificación de FCA y/o FCD <sup>20, 36, 42</sup>.

Estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones y trabajos experimentales en animales de laboratorio, sostienen la hipótesis que diversos componentes de la dieta constituyen importantes factores determinantes en la carcinogénesis del intestino. La dieta sugerida como factor de riesgo para el carcinoma de intestino, incluye excesos en la ingesta de grasa de origen animal y baja ingesta de frutas, vegetales, fibra, calcio y otros micronutrientes <sup>1</sup>. En este sentido, varios estudios han demostrado el efecto protector del molibdeno (Mo) en la carcinogénesis experimental. La administración de Mo en el agua de bebida a una concentración de 2mg/l redujo la incidencia de cáncer de esófago y estómago en ratas tratadas con el carcinógeno N-nitrososarcosine ethyl ester (NSEE) <sup>21</sup>; resultado semejante se obtuvo utilizando el carcinógeno N-methyl-N-benzylnitrosamine <sup>18</sup>. La incidencia de tumores de la glándula mamaria inducido con el carcinógeno N-nitroso-N-methylurea (NMU) fue más baja en ratas hembras Sprague-Dawley que recibieron 10mg/l de Mo en el agua de bebida comparada con las controles <sup>33, 39</sup>. La administración de Mo en el agua de bebida redujo significativamente el número de tumores del intestino en ratas tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) <sup>26</sup>.

Por otra parte, se ha observado que el tungsteno (W) interfiere en la absorción del Mo. En ratas tratadas con 100 y 200 ppm de W en el agua de bebida se logró provocar deficiencia de Mo, constatada en tejido hepático, corroborando que en estos animales el efecto del W es altamente específico y no produce síntomas y/o signos de toxicidad <sup>21</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia, desarrollo y localización de FCD inducidos con DMH en intestino grueso de ratas tratadas con Mo y W en la dieta, así como su relación con la localización de los NLA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron utilizadas ratas Wistar, machos, de 3 meses de edad, con un peso promedio de 180 g. Las mismas fueron alojadas en jaulas individuales en ambiente con temperatura controlada de 21°C, mantenidas con agua desmineralizada y dieta *ad-libitum*. Molibdeno (Mo) y tungsteno (W) fueron administrados en el agua de bebida a la concentración de 200 ppm. Los FCD en el intestino grueso fueron inducidos mediante una inyección subcutánea semanal de DMH durante 16 semanas a la dosis de 20 mg/kg de peso corporal.

A fin de evitar contaminaciones químicas del medio ambiente y de los animales no tratados con la droga cancerígena, los dos grupos fueron alojados en salas

separadas. Los animales fueron divididos al azar en dos grupos con diferentes lotes (de 20 ratas cada uno), conformados de la siguiente manera:

*Grupo Control* (sin administración de DMH), compuesto por lote 1 (sin tratamiento), lote 2 (tratado con Mo) y lote 3 (tratado con W), y

*Grupo experimental* (con administración de DMH), compuesto por lote 4 (tratado sólo con DMH), lote 5 (tratado con DMH + Mo) y lote 6 (tratado con DMH + W).

El Mo, en la forma de molibdato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O] y el W, en la forma de tungstenato de sodio (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>), fueron administrados en el agua de bebida dos meses antes del primer tratamiento con DMH y el suministro continuó durante 4 meses más, hasta la última dosis de la DMH.

Dicho cancerígeno fue preparado como una solución conteniendo 400 mg de DMH disuelto en 100 ml de agua destilada estéril, conteniendo 37 mg de EDTA como agente estabilizador y mantenida a pH 6,5 con hidróxido de sodio.

Todos los animales fueron sacrificados 3 meses después de la última dosis de DMH. En cada uno de los animales el intestino grueso en su totalidad fue extraído, abierto longitudinalmente y colocado sobre una plancha de cartón, fijado con formol bufferado al 10 % durante 24 horas, procesado por la técnica histológica clásica para bloques parafinados, cortado en micrótomos tipo Minot, en 5µm de espesor y coloreados con la técnica de hematoxilina-eosina.

Fueron analizados cortes histológicos de cada uno de los segmentos del intestino grueso a fin de detectar, localizar y caracterizar a los FCD. Para el análisis del número de FCD por rata y por grupo, se aplicó un diseño no paramétrico mediante el estadístico de Kruskal-Wallis, apoyado por un análisis de la variancia de los datos ranqueados.

## RESULTADOS

Los FCD fueron observados en la mayoría de los animales tratados con DMH en ciego, colon proximal (CP), colon distal (CD) y recto. En el lote tratado con Mo se observó una significativa menor incidencia de FCD (n=27), comparada con el lote que solo recibió DMH (n=49), detectándose un número intermedio en el grupo tratado con W (n=35). Los FCD se localizaron en los tres lotes, con mayor frecuencia en CD: n=25 (51,02%), n=18 (66,66%) y n=22 (62,86%) para los lotes: 4 (DMH), 5(Mo+DMH) y 6 (W+DMH), respectivamente. El número y localización de los FCD se detallan en la Tabla 1.

En los tres lotes tratados con DMH los FCD se ubicaron preferentemente en criptas alejadas a los NLA. En el grupo tratado con Mo, solo dos se localizaron con relación a NLA; en el lote tratado con W, cinco tuvieron relación con los NLA (Figura 1); y en el grupo DMH once de ellos se localizaron con relación a los

**Tabla 1.** Frecuencia y localización anatómica de FCD en las diferentes porciones del intestino grueso, en los 3 lotes tratados con DMH.

lote	DMH (n=20)	Mo+DMH (n=20)	W+DMH (n=20)
Nº de FCD	49	27	35
Nº de ratas sin FCD	4	8	5
Relación con NLA*	11 (22,45%)	2 (7,40%)	5 (14,28%)
Recto**	4 (8,16%)	1 (3,71%)	5 (14,28%)
Colon Distal**	25 (51,02%)	18 (66,66%)	22 (62,86%)
Colon proximal**	10 (20,41%)	7 (25,92%)	6 (17,14%)
Ciego**	10 (20,41%)	1 (3,71%)	2 (5,71%)

*FCD: focos de criptas displásicas, DMH: 1,2-dimetilhidrazina, Mo: molibdeno, W: tungsteno, NLA: nódulos linfoides asociados al intestino, \* cantidad y porcentaje de FCD hallados en relación a los NLA, sobre el total de FCD de cada lote; \*\*cantidad y porcentaje de FCD en cada segmento del intestino grueso, sobre el total de cada lote.*

NLA. No se observaron FCD en los lotes 1, 2 y 3 del grupo control.

Los FCD se caracterizaron por comprometer grupos de 2 a 3 criptas (Figura 2), hasta grupos con numerosas criptas, ubicándose en la superficie de la mucosa, en su parte media o comprometiendo casi todo el espesor de la misma. Se caracterizaron por marcada basofilia citoplasmática, disminución y/o ausencia de células caliciformes, núcleos prominentes con cromocentros gruesos y evidente nucleolo; en ocasiones estratificación celular y pérdida de la polaridad, así como dilatación y formación de pseudopapilas y/o brotes glandulares (Figuras 1 y 2).

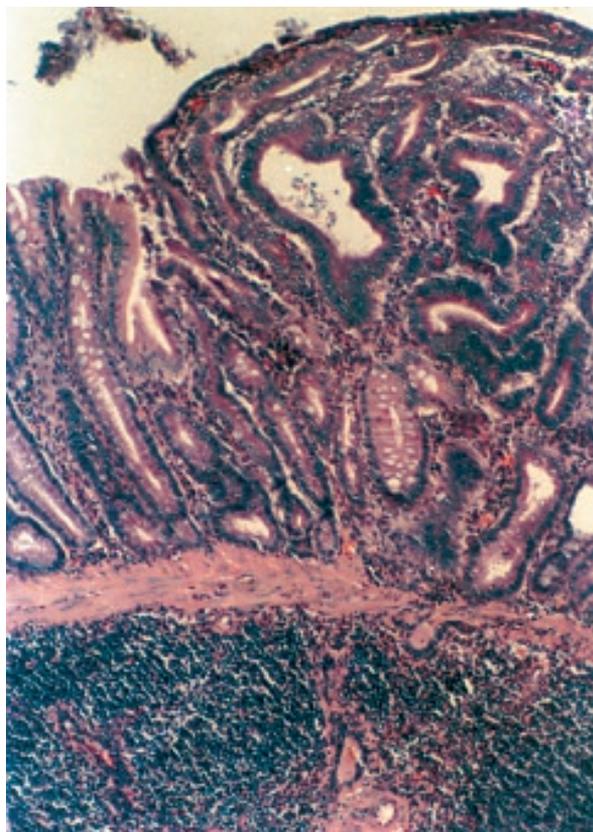
No se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes con respecto a la localización de los FCD en las diferentes porciones del intestino grueso; no obstante las ratas suplementadas con Mo mostraron menor número de FCD, así como mayor número de ratas sin ningún FCD.

## DISCUSIÓN

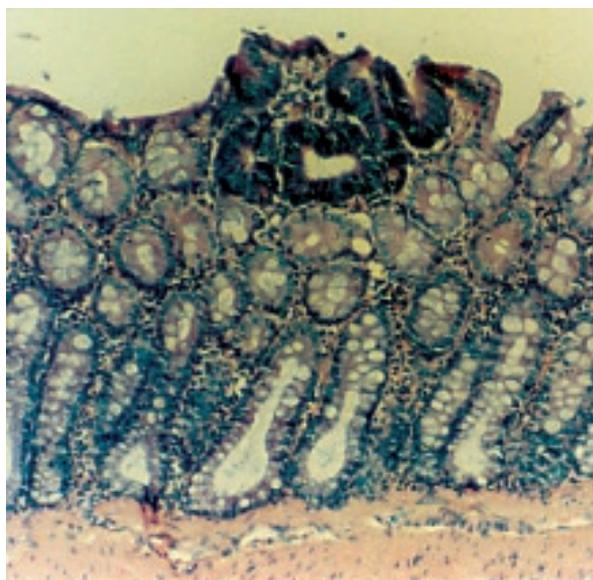
Los efectos de la molibdenosis y de la deficiencia de Mo provocada por exceso de W sobre el desarrollo de FCD fueron diferentes en los tres lotes tratados con DMH.

La suplementación con Mo provocó una marcada disminución del número de FCD, comparados con casi el doble de los hallados en el lote DMH, ocupando el lote dosificado con W una posición intermedia. Estos datos respaldan la teoría que diversos componentes de la dieta juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer de colon, tanto en seres humanos como en animales de experimentación.

Estudios epidemiológicos realizados en seres humanos, relacionan al cáncer intestinal, principalmente al cáncer colorrectal, con la ingestión de alimentos ricos en grasas de origen animal y escaso consumo de fibras<sup>35,41</sup>. Se considera que no solo la cantidad de grasa



**Figura 1.** Foco de criptas displásicas localizado sobre un nódulo linfoide asociado a la mucosa del colon distal (H y E, 100x).



**Figura 2.** Foco de criptas displásicas que compromete algunas criptas en la superficie mucosa del colon distal (H y E, 40x).

y/o fibra ingerida incide en el riesgo del cáncer de colon, sino también el tipo de grasa y de fibra consumidas<sup>5</sup>. Trabajos realizados en diferentes grupos poblacionales humanos y animales experimentales permiten sostener la hipótesis que la composición de ácidos grasos de la dieta es uno de los factores determinantes en la carcinogénesis del colon. En poblaciones mediterráneas y en

esquimales, cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva y el aceite de pescado que contienen ácido graso omega-3, se registró bajo índice de cáncer de colon<sup>16</sup>. Experimentalmente se comprobó que la incidencia de tumores de colon es reducida en animales alimentados con alto contenido de dos tipos de ácidos grasos: omega-3 y omega-6<sup>31</sup>.

Por otra parte estudios realizados en China 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, demuestran la disminución del desarrollo de estos tipos de cáncer ante tal suplementación<sup>7,37</sup>. Estos trabajos se basan en el hecho que los niveles de Mo en el agua de bebida, así como en sangre, cabello y orina de habitantes de áreas de alto riesgo de cáncer de esófago y estómago fueron más bajos que en aquéllos de áreas de bajo riesgo<sup>9,29</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>21</sup>.

En otra experiencia en ratas con un carcinógeno diferente, N-metil-N-benzilnitrosamina administrado por vía subcutánea y con dietas suplementadas con 2 ppm de Mo, se observó una significativa inhibición del carcinoma de células escamosas del esófago<sup>18</sup>. En ese estudio se observó también un significativo aumento de las concentraciones de Mo y de la actividad de la enzima xantinoxidasa en esófago y estómago. La incidencia de tumores en glándula mamaria inducidos experimentalmente con el carcinógeno NMU fue más baja en ratas Sprague-Dawley recibiendo 10 mg/l de Mo en el agua de bebida, comparada con los controles<sup>33,39</sup>.

Dietas suplementadas con Mo en animales de laboratorio han demostrado un incremento de las concentraciones de xantinoxidasa en hígado, intestino y riñones<sup>21</sup>. Para algunos autores, la acción protectora del Mo estaría relacionada al incremento del proceso de detoxificación mediante la denitrosación de compuestos nitrosos, así como la activación de reacciones de dealquilación<sup>17</sup>.

En nuestra experiencia utilizamos DMH, un procarcinógeno que requiere ser activado dentro del organismo para transformarse en carcinógeno activo<sup>19</sup>. La activación metabólica de DMH incluye primeramente su oxidación a azometano<sup>11</sup>; una segunda oxidación convierte el azometano en azoximetano, el que es luego N-hidroxilado a metilazoximetanol, transformaciones que ocurren en el hígado y posiblemente en otros tejidos<sup>19,40</sup>. El metilazoximetanol es inestable químicamente a temperatura corporal; *in vitro* es descompuesto espontáneamente en formaldehído, agua y nitrógeno<sup>27</sup>. Durante este proceso se forma un agente alquilante, el metildiazonio, el cual genera un ión carbónico capaz de metilar ADN, ARN y proteínas<sup>24</sup>.

La acción carcinogénica de DMH involucra metilación del ADN de células epiteliales del colon<sup>14,15</sup>. Existe evidencia que el metilazoximetanol es descompuesto en metil-azoxiformaldehído mediante la enzima alco-

hol-dehidrogenasa<sup>12</sup>. Esto es importante ya que esta enzima está presente en alta concentración en colon e hígado de la rata, los cuales son órganos blancos para este carcinógeno.

En el presente estudio, la menor cantidad de FCD en las ratas tratadas con Mo, podría deberse a que dicho elemento interfiere en el metabolismo de la DMH. El exceso de Mo posiblemente aumentaría las concentraciones de las enzimas xantinoxidasa, sulfitoxidasa y aldehídoxidasa, en las que el Mo actúa como co-factor, inactivando algunos de los pasos en el metabolismo de la DMH, la cual no llegaría a transformarse en agente alquilante. 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<sup>17</sup>.

Nuestros resultados coinciden con los de otros trabajos en los que el CD y el ciego presentan el mayor número de FCD y de tumores<sup>23,34</sup>. En un intento por determinar los factores que pudieran actuar sobre la proliferación celular en el CD, algunos investigadores realizaron un estudio morfológico determinando la respuesta proliferativa en ratas sometidas a ayuno<sup>4</sup>. En esta investigación revelaron que la densidad de las criptas del colon era un 36% mayor en CD que en CP y que el número de colonocitos por unidad de área en CD era el doble al compararlo con el CP. Además observaron que la proliferación celular aumentaba en CD durante el ayuno, pero el mayor incremento de la proliferación ocurría durante el proceso de realimentación en CP y ciego. De esta manera, concluyeron que existen cambios en la proliferación celular de las distintas porciones del intestino grueso, los cuales pueden ser modificados con la dieta.

En base a nuestros resultados podemos inferir que la molibdenosis y la deficiencia secundaria de Mo provocada por interferencia de W, en este modelo experimental no modificaron la distribución de los FCD en las distintas porciones del intestino grueso.

Otros investigadores demostraron la presencia de glándulas atípicas con relación a NLA en colon de ratas tratadas con DMH<sup>32</sup>. Además, observaron que el 50% de las ratas que recibieron DMH presentaron un engrosamiento de los NLA en comparación a los animales controles. Resultados obtenidos en otros trabajos permiten argumentar que los NLA podrían promover el crecimiento de adenocarcinomas<sup>6,22,28</sup>.

Varios investigadores demostraron que los adenocarcinomas ocurren preferentemente en tres sitios diferentes a lo largo del colon de ratas, y que están íntimamente relacionados con la localización de los nódulos linfoides<sup>3,13,28</sup>. En base a resultados obtenidos mediante la detección inmunohistoquímica del *factor de crecimiento transformante alfa* (TGF) en criptas localizadas sobre o dentro de los nódulos linfoides y en la lámina propia adyacente a las criptas, se postula la hipótesis que existen factores en los nódulos linfoides que estimulan a las células epiteliales de las criptas adyacentes a dichos nódulos linfoides, para producir

y/o secretar TGF<sup>13</sup>. Todos estos hallazgos son concordantes en el sentido que los NLA desempeñan un rol de promoción en la carcinogénesis del colon.

En conclusión, los resultados del presente estudio indican que si bien existieron FCD en criptas relacionadas con los NLA, las mismas no fueron lo suficientemente importantes en número. No obstante, el lote tratado con Mo mostró menor número de FCD con relación a los NLA.

### Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE, así como al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el aporte realizado para el presente trabajo.

### Abstract

**Montenegro, M.A.; Sánchez Negrette, M.; Lértora, W.J.; Catuogno, M.S.: Large intestinal dysplastic crypt foci induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats treated with molybdenum and tungsten.** Wistar male rats, 3 month-old, were fed *ad-libitum* with a balanced diet and demineralized water. Molybdenum (Mo) and tungsten (W) were added to drinking water at 200 ppm concentration. Large intestinal dysplastic crypt foci (DCF) were induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH), given subcutaneously as 16 weekly doses at 20 mg/kg body weight. Mo, in the form of  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  or W, in the form of  $(\text{Na}_2\text{WO}_4)$ , were administered in drinking water two months before the first DMH treatment and then 4 months after, until the last DMH treatment. Three months after the last carcinogen injection, all animals were sacrificed and examined for intestinal DCF. Number, characteristics and location of the DCF were recorded and its relation with intestine-associated lymphoid nodules was examined histologically. A significantly lower incidence of DCF was observed in the molybdenum group (n= 27), compared to the control group given DMH alone (n= 49), and W group (n= 35). These data strengthen the theory that diverse components of the diet play an important role in the cause and prevention of colon cancer, in human beings as well as experimental animals.

**Key words:** dysplastic crypt, dimethylhydrazine, molybdenum, tungsten, rats.

### REFERENCIAS

1. **Alberts DS, Ritenbaugh C, Story JA, Aickin M, Rees-McGee S, Buller MK, Atwood J, Phelps J, Ramanujam PS, 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. **Bird RP, Good CK.** 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol. Lett.* 15: 395–402.
3. **Bland PW, Britton DC.** 1981. Colonic lymphoid tissue and its influence on tumor induction in dimethylhydrazine treated rats. *Br. J. Cancer.* 44: 275–276.
4. **Butler RN, Bruhn B, Pascoe V, Fettman MJ, Roberts-Thomson IC.** 1992. Regional factors affecting proliferation in the large intestine of the rat. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1: 133–137.
5. **Capocaccia R, Farchi G, Mariotti S, Verdecchia A, Angeli A, Scipione R.** 1987. La mortalita in Italia nell' anno 1982. Ed. *Inst. Centrale Di Statistica (ISTAT)*, Roma.
6. **Carter JW, Lancaster HA, Harman WE, Cameron IL.** 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: 4304–4307.
7. **Dawsey SM, Wang GQ, Taylor PR, Li JY, Blot WJ, Li B, Lewin KJ, Liu FS, Weinstein WM, Wiggert S.** 1994. Effects of vitamin/mineral supplementation on 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.
8. **Deasy JM, Steele GJ, Ross DS, Lahey SJ, Wilson RE, Madara J.** 1983. Gut-associated lymphoid tissue and dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma in the Wistar/Furth rat. *J. Surg. Oncol.* 24: 36–40.
9. **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.
10. **Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A.** 1999. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol. Pathol.* 27: 632–642.
11. **Fiala ES, Kulakis C, Bobotas G.** 1976. Detection and estimation of azomethane in expired air of 1,2-dimethylhydrazine treated rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 1271–1273.
12. **Grab DJ, Zedek MS.** 1977. Organ-specific effects of the carcinogen methylazoximethanol related to metabolism by nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenase. *Cancer Res.* 37: 4182–4189.
13. **Hardman WE, Cameron IL.** 1994. Colonic crypts located over lymphoid nodules of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats are hyperplastic and at high risk of forming adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 15: 2353–2361.
14. **Hawks A, Magee PN.** 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.
15. **Hawks A, Swann PF, Magee PN.** 1971. Probable methylation of nucleic acids of mouse colon by 1,2-dimethylhydrazine *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 21: 432–435.
16. **Kinsella JE.** 1986. Food components with potential therapeutic benefits in n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Tech.* 40: 89–97.

17. **Koizumi T, Tajima K, Emi N, Hara A, Suzuki KT.** 1995. Suppressive effect of molybdenum on hepatotoxicity of N-nitrosodiethylamine in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 460–462.
18. **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.
19. **Lamont JT, O’Gorman TA.** 1978. Experimental colon cancer. *Gastroenterology* 75: 1157–1169.
20. **Latham P, Lund EK, Jonson IT.** 1999. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis* 20: 645–650.
21. **Luo XM, Wei HJ, Yang SP.** 1983. Forestomach carcinogenesis in rats. *INCI* 71: 75–78.
22. **Martin MS, Hamman A, Martin F.** 1986. Gut-associated lymphoid tissue and 1,2-dimethylhydrazine intestinal tumors in rat: an histological and immunoenzymatic study. *Int. J. Cancer.* 38: 75–80.
23. **Maskens AP, Dujardin-Loits RM.** 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.
24. **Matsumoto HT, Higa HH.** 1966. Studies on methylazoxymethanol, the aglicone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem. J.* 98: 20–22.
25. **McLellan EA, Medline A, Bird RP.** 1991. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in the rat colon. *Carcinogenesis* 12: 2093–2098.
26. **Montenegro MA, Sánchez Negrette M, Gimeno EJ, Borda JT.** 2002 Effects of high molybdenum intake on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal tumors in rats. *Biocell* 26: 339–345.
27. **Nagasawa HT, Shiota FN, Matsumoto H.** 1972. Decomposition of methylazoxymethanol, the aglicone of cycasin in D20. *Nature* 236: 234–235.
28. **Nauss KM, Locniskar M, Newberne PM.** 1984. Morphology and distribution of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon tumors and their relationship to gut-associated lymphoid tissue in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 915–921.
29. **Nemenko BA, Moldakulova MM, Zorina SN.** 1976. Rasprostranenie raka pishchevoda V Gur’evskoi oblasti v zavisimosti ot mineral’nogo sostava pit’ evoi vody. *Vopr. Onkol* 22: 75–76.
30. **Otori K, Sugiyama K, Hasebe T, Fukushima S, Esumi H.** 1995. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res.* 55: 4743–4746.
31. **Reddy BS, 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.
32. **Rubio CA, Nylander G, Sveander M, Duvander A, Alun, ML.** 1986. Minimal invasive carcinoma of the colon in rats. *Am. J. Pathol.* 123: 161–165.
33. **Seaborn CD, Yang SP.** 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.
34. **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: 1138–1146.
35. **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.
36. **Thorup I, Meyer O, Kristiansen E.** 1995. Effect of potato starch, cornstarch and sucrose on aberrant crypt foci in rats exposed to azoxymethane. *Anticancer. Res.* 15: 2101–2106.
37. **Wang GQ, Dawsey SM, Li JY, Taylor PR, Li B, Blot WJ, Weinstein WM, Liu FS, Lewin KJ, 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.
38. **Ward JM, Rice JM, Roller PP, Wenk ML.** 1977. Natural history of intestinal neoplasms induced in rats by a single injection of methyl (acetoxymethyl) nitrosamine. *Cancer Res.* 37: 3046–3052.
39. **Wei HJ, Luo XM, Yang P.** 1985. Effects of molybdenum and tungsten on mammary carcinogenesis in SD rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 469–473.
40. **Weisburger JH.** 1971. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer* 28: 60–70.
41. **Weisburger JH, Wynder EL.** 1991. Dietary fat intake and cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 5: 7–23.
42. **Zheng Y, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ, Pereira MA.** 1999. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 20 : 255–260.