

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTOS CAUSADOS CON 14 mg/Kg DE Ro 4-6467/1
DURANTE LA GESTACION DE LA RATA**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

SILVIA ARACELI VELEZ ONGAY

México, D. F.

1975



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES:

POR SU CARINO Y COMPRENSION

A MIS HIJAS:

SILVIA GEORGINA Y YOLANDA HAYDEE

A MI FAMILIA Y AMIGOS:

POR SU DESINTERESADA AYUDA

Agradezco a la Srita. M. en C. Elvira Estrada Flores por su valiosa orientación para la realización del presente trabajo.

A LOS SINODALES:

Dr. Consuelo Savin Vázquez
Biol. Carmen Uribe
Biol. Leonor Peralta
Biol. Humberto González
Por su valiosa ayuda en la redacción de ésta tesis.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO:

Ma. Pilar Torres
Marcela Aguilar
Humberto González
José Luis Cervantes
Marco Arturo Moreno

Gracias.

INDICE .

I .-	Introducción	Pag.	1
II .-	Objetivo	"	6
III .-	Material y Métodos	"	7
IV .-	Resultados	"	9
V .-	Discusión	"	23
VI .-	Conclusiones	"	25
VII.-	Bibliografía	"	26

I.- INTRODUCCION

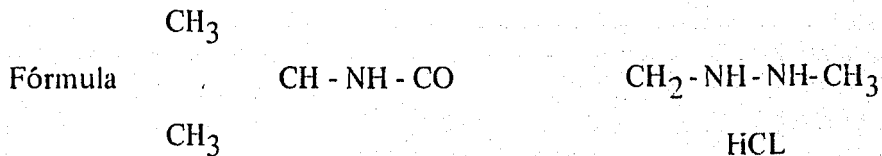
El cáncer que tantos trastornos ha causado a la humanidad, ha hecho que los científicos traten de descubrir el mejor medio para combatirlo y acabar con él. lo que ha dado como resultado que los investigadores esten buscando entre una gran cantidad de sustancias químicas la solución para suprimir las enfermedades de tipo cancerígeno.

Entre estas sustancias se encuentran las series de metil-hidracina, los primeros en estudiarlas fueron W. Bollag y E. Grunberg, del Departamento de Medicina experimental de F. Hoffmann-La Roche Inc., Nutley (New Jersey, U.S.A.), ellos observaron por primera vez, en 1963, la acción de estos agentes antitumorales y nos dan como fórmula de estas: $R - NH - NH - CH_3$. (7, 10)

Estos derivados de las metil-hidracinas se autooxidan fácilmente con la producción de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno.

Según Zeller y Bollag estos elementos liberados son los productores del efecto citostático. (54)

Con estos conocimientos se llegó a sintetizar la metil-hidracina conocida con el nombre de: Ro 4 - 6467/1



1.- metil-2-p-(isopropilcarbamoil) bencil hidracina hidroclorado. (10)

Este compuesto ha recibido varios nombres, entre los cuales están:

- 1.- N-isopropil-(2 metil-hidracina)-p-toluamide
hydrochloride. (33)
- 2.- Clorhidrato de p-(n-metil-hidrazine metil)
-N-iso propil benzamida. (6)
- 3.- Procarbazina. (15)
- 4.- Matulane. (38)
- 5.- Ibenzmethylin. (40)
- 6.- 1-metil-2-bencil-hidracinafosfato. (MBH).
(46).

En lo que refiere a su mecanismo de acción, las investigaciones de tipo citológico, han revelado, que la metil-hidracina altera el ciclo mitótico dando por resultado la supresión de la mitosis, causada por una prolongación de la interfase, lo que trae como consecuencia un alto porcentaje de cromátidas rotas ocasionando un intercambio entre ellas y uniones de tipo trirradial. (7)

A. Rutishuaser, del Laboratorio Citológico de la Universidad de Zurich (Switzerland), y Bollag sugiere que la ruptura de las cromáticas es dependiente de la dosis y del tiempo que transcurre despues de la inyección del agente citotóxico; se vio además que estas drogas son capaces de suprimir las relaciones inmunológicas y se ve afectada la formación de los anticuerpos. (46)

Los trabajos realizados en animales experimentales (ratas), demostraron que el Natulan causa trastornos en los tejidos de rápida proliferación como: Los epitelios germinativos de los testículos lo que conduce a su atrofia, suprimiendo la espermatogénesis; tambien se ven afectados los sistemas formadores de sangre, siendo los más dañados el leucopoyético y el trombopoyético, mientras que el eritropoyético es el menos afectado, también se ven alterados los folículos pilosos, provocando la caída del pelo. (11). Además daña a las células de tipo mesenquimatoso. Los derivados de las metil-hidracinas no causan trastor-

nos en la rápida proliferación de la mucosa gastrointestinal.

En experimentos efectuados en ratones demostraron la acción inhibitoria del Ro 4-6467/1, sobre cinco tumores trasplantables como son: carcinosarcoma de Ehrlich, sólido y ascítico, sarcoma de Croker S 180, carcinosarcoma de Walker 256 y epiteloma T8 de Guerin. Los mejores resultados fueron obtenidos con el carcinosarcoma de Walker 256, obteniendose un 100% en la remisión del tumor. (8). Todo lo anterior se demostró por medio de pruebas citológicas, ya que en los tres primeros días de iniciado el tratamiento, las células tumorales son reemplazadas por tejido de granulación y cicatrizante (7).

Otros científicos como Shakuntala Chaube y M. L. Murphy del Instituto Sloan Kettering, para la Investigación del Cáncer en Nueva — York, N. Y. han estudiado la acción del Natulan durante la gestación de la rata, aún con dosis muy bajas. (13)

L. Mercier-Parot y colaboradores dieron dosis de 20 mg/kg, aplicadas del séptimo al noveno día de la gestación en las ratas y vieron que se presenta una fuerte embriotoxicidad y poca teratogénesis; entre el octavo y el décimo segundo día predomina el efecto teratógeno sobre el embriotóxico. (37)

En los estudios realizados en el laboratorio de Histología y Embriología, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por Estrada E. y colaboradores, observaron los efectos causados por esta droga en ratas preñadas, aplicaron tres dosis diferentes, 5, 10 y 20mg/kg., los vías usadas fueron: oral, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. El 63% de ratas a las cuales se les administraron 5 y 10 mg/kg, presentaron gestación normal sin malformaciones en los hijos, el 37% mostraron reabsorciones parciales. (12, 20, 45). Los animales tratados con 20mg/kg, presentaron: Leucopoyésis trombocitopenia y supresión inmunológica. La droga produjo además reabsorciones totales, impidiendo el desarrollo de los embriones, por lo que no se presentó descendencia.

En otro estudio realizado en el mismo departamento se llegó a la conclusión de que en la primera generación de ratas, la droga produce esterilidad. Los testículos se ven mas afectados que los ovarios, y el grado

de atrofia testicular es proporcional a la cantidad de droga empleada. (51)

Basandose en los datos bibliográficos internacionales los clínicos han aplicado a enfermos que padecen diferentes tipos de cánceres, con los siguientes resultados.

George Martz, de la División de Oncología del Departamento Médico del Hospital Universitario de Zurich, Suiza; aplicó dosis diarias de 100 a 300 mg/kg., por vía oral e intravenosa, obteniendo buenos resultados en linfomas. El puod notar que la mejor vía es la oral: que la droga no presenta resistencia cruzada con otros agentes quimioterapéuticos. Sus pacientes presentaron trastornos digestivos, prurito y depresión en la función de la médula ósea, viendose afectados en primer lugar los trombocitos y después los leucocitos. (33, 34)

De acuerdo con los estudios clínicos de H. Gerhartz, el Natulan es excretado de un 60 a un 80% por la orina, por lo que puede presentarse hemorragia en la vejiga. De especial interés son las reacciones psíquicas que presentaron sus pacientes, tales como: confusión, desorientación, disturbios de la sensibilidad y en ocasiones alucinaciones.

También se presenta euforia y el síndrome de enrojecimiento. (por la intolerancia al vino, durante el tratamiento) (18, 34)

G. Mathé y L. Berumen del Servicio de Hematología del Instituto Gustavo-Rossy en Villejuif, Sena, Francia, obtuvieron de once enfermos con retículo sarcoma, tres remisiones aparentemente completas y cuatro incompletas. (35).

En la tesis del Dr. Lucero Avila de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, encontro que las respuestas van de acuerdo con la dosis empleada. (32)

La Dra. Hidalgo del Hospital General de México, reporta resultados satisfactorios en pacientes con melanomas, de 7 enfermos se presentaron tres casos con muy buenos resultados, dos dudosos y dos fracasos totales. (21)

Otros científicos reportan haber trabajado con el Ro 4-6467/1 combinado con otros agentes quimioterapéuticos como son: vincristina, 5 fluoracil, mostaza nitrogenada, velbe, los resultados de estas combinaciones han sido satisfactorios. (5. 1, 3, 25).

II.- OBJETIVO DE LA INVESTIGACION

La presente investigación tiene como antecedentes los estudios realizados por Estrada E. y colaboradores (12, 20, 45), quienes experimentaron en ratas embarazadas, administrándoles el Ro 4-6467/1 en dosis de: 5, 10 y 20mg/kg.

Los resultados obtenidos fueron descendencia normal para los dos primeros grupos, aunque en menor número que el esperado.

Teniendo como base lo anterior, tratamos de investigar si con 14 mg/kg. de Natulán se producen anomalías durante la gestación en ratas ó si se llega a impedir ésta, provocando reabsorciones.

III.- MATERIALES Y METODOS

Para este experimento se utilizaron 12 ratas albinas hembras y los machos necesarios para el cruzamiento, todos de la especie *Rattus rattus*, de la cepa Wistar.

El método fue cruzarlas teniendo estas como mínimo de edad tres meses, período en que los animales empiezan a ser fértiles; para comprobar la posible fecundación se hicieron frotis vaginales diarios, hasta encontrar espermatozoides, a partir de este día se tomo a la rata como embarazada y se empezaron a contar los días de la gestación.

La dosis aplicada a los animales experimentales fue de 14 mg/kg, por vía oral. La iniciación del tratamiento fue a partir del séptimo y décimo segundo día de la gestación; el número de dosis fue variable desde una hasta quince. Tabla I

El 75% de los fetos obtenidos del útero se fijaron en formol al 10%, para ser cortados por la técnica de navaja libre y observar las alteraciones de tipo macroscópico a los diferentes niveles del cuerpo; el 25% restante se fijaron en alcohol etílico al 95%, para ser transparentados en potasa al 1%, y teñidos con alizarina roja, con la finalidad de ver las malformaciones de tipo esquelético.

Los ovarios también fueron fijados y procesados, por medio de inclusión en parafina, cortados en microtomo y teñidos con hematoxilina y eosina.

TABLA I

Rata número	Número de dosis de Nautlán	Días en que se administró la droga durante el embarazo.	Día del sacrificio.
109	1	7'	21'
103	2	7' y 8'	21'
107	3	7' al 9'	21'
111	4	7' al 10'	21'
105	5	7' al 11'	21'
106	6	7' al 12'	21'
110	7	7' al 13'	21'
112	10	7' al 21'	21'
113	10	7' al 21'	21'
104	10	7' al 21'	21'
108	12	10' al 21'	21'
102	15	7' al 21'	21'

IV.- RESULTADOS

En los 12 especímenes tratados se observó que el 99% de los ovarios se encontraron en la fase de diestro y el 1% restante en metaestro.

Al hacer la disección de los úteros en los especímenes vimos que el número de sitios de implantación fue normal en la mayoría de los casos individuales de 10 a 14; el número total corresponde a 136 y se encuentran distribuidas de la siguiente manera. Tabla II y Tabla III

TABLA II

1) Embriones normales	100 -----	73 %
2) Reabsorciones	27 -----	19.8 %
3) Embriones anormales	8 -----	6.1 %
4) Embriones muertos	1 -----	.7 %
<hr/>		
Total de implantaciones	136 -----	100 %

- 1) Los embriones normales fueron los más numerosos.
- 2) Las 27 reabsorciones se presentaron con las características habituales de nódulos amarillentos en el sitio de implantación a los 21 días en que los úteros fueron disecados.

<i>Rata número.</i>	<i>No. de dosis.</i>	<i>Días de aplicación.</i>	<i>No. de implantaciones.</i>	<i>No. de reabsorciones.</i>	<i>No. de hijos muertos.</i>	<i>No. de hijos vivos.</i>	<i>No. de hijos normales.</i>	<i>No. de hijos anormales.</i>	<i>Dosis total.</i>
109	1	7'	11	4	1	7	7	-	2.6 mg.
103	2	7' y 8'	12	-	-	12	12	-	6.4 mg.
107	3	7' al 9'	13	-	-	12	12	-	7.5 mg.
111	4	7' al 10'	11	5	-	6	6	-	13.6 mg.
105	5	7' al 11'	10	9	-	1	1	-	12.5 mg.
106	6	7' al 12'	12	-	-	12	12	-	19.2 mg.
110	7	7' al 13'	12	8	-	4	2	2	24.5 mg.
112	10	12' al 21'	14	-	-	14	14	-	34 mg.
113	10	12' al 21'	8	-	-	8	8	-	34 mg.
104	10	12' al 21'	12	-	-	12	6	6	38.4 mg.
108	12	10' al 21'	11	-	-	11	11	-	33.6 mg.
102	15	7' al 21'	10	-	-	10	10	-	49 mg.
TOTALES			136	27	1	109	91	8	

TABLA III

- 3) Los ocho hijos anormales se presentaron en 2 ratas; la 107 con siete dosis, tuvo un total de cuatro hijos dos de los cuales resultaron anormales. El 2o espécimen el 104 tuvo un total de 12 hijos, en donde sei de ellos presentaron malformaciones; fue tratada con 10 dosis de) Ro 4-6467/1.

El estudio de estos fetos se efectuo macroscopicamente.

En los embriones de la rata 107, nos revelaron alteraciones como: cavidad craneana hundida, cuerpo pequeño y edematizado por lo que los miembros anteriores dan la apariencia de estar unidos al cuerpo. Fotografía I

Fotografía I



a) Embrión testigo

b) Embrión anormal mostrando la cavidad craneana hundida y los brazos unidos al cuerpo.

Los fetos anormales del espécimen 104 se observan en la fotografía II



fotografía II

T) testigo

Camada completa del espécimen 104

Embriones normales: a, b, c, d, f, g.

Embriones anormales: e, h, i, j, k, l.

En el embrión malformado marcado con la letra e, el cuerpo se ve ampliamente edematizado, por lo que se da el aspecto de tener los miembros anteriores pegados al cuerpo, sobresaliendo solo las manos, y en cada una de ellas solo se observan cuatro dedos por lo que hay ectodactilia la cabeza carece de conductos auditivos externos. Los embriones h, j, tienen como características cuerpo pequeño con forma momificada, los ojos prominentes con un halo de hematoma al rededor de estos, los conductos auditivos externos no se observan, los miembros anteriores se ven cortos debido a la configuración del embrión.

En los embriones i, k, el cuerpo se encuentra muy alterado, presentan anoftalmia bilateral, carencia de conductos auditivos externos, cuerpo pequeño y arrugado, miembros anteriores pegados al cuerpo

y con ectodactilia, el color del cuerpo de los embriones es amarillento; el embrión i, presentó doble placenta. El embrión I, fué el más afectado y el más pequeño de la camada, la cabeza carece de ojos, nariz hocico y conductos auditivos externos, se presenta como una masa pequeña, los miembros anteriores pequeños y cortos en forma de clava y con ectodactilia, el cordón umbilical se observa con nudos. El tamaño promedio de los embriones anormales es de 1.8 cm. menos que los normales.

Ver fotografía II

A continuación del estudio macroscópico se dividieron en dos grupos.

1.- Grupo. Técnica de transparentación realizada en los embriones con siete y diez dosis.

En los dos embriones transparentados de la rata 107, se observaron malformaciones que correspondieron a: hundimiento de los huesos de la cabeza, los cuales son; parietales interparietales y parcialmente a los occipitales que son los que forman las fontanelas las que se ven amplias, las demás estructuras óseas son normales en tamaño y número.

Ver fotografía I

En el embrión de la rata tratada con diez dosis se presentaron malformaciones correspondientes a: fontanelas amplias, falta de osificación de los huesos parietales, interparietales y occipitales; en las costillas la osificación también se encuentra retardada, los miembros anteriores solo presentan cuatro falanges, por lo que se presenta ectodactilia.

fotografía III

fotografía III



- a) Embrión testigo
- b) Embrión anormal. Cuerpo edematizado, falta de osificación de los huesos parietales occipitales y costillas. Dedos con ectodactilia.

20. Grupo. Técnica de navaja libre, efectuada en cinco embriones malformados de la rata con 10 dosis.

a) Malformaciones a nivel de cabeza.

Embrión i, anoftalmia bilateral, microcefalia ya que los ventrículos cerebrales se observan pequeños, bulbos olfatorios poco desarrollados.

Fotografía IV



foto IV

- a) Embrión testigo. Corte a nivel de cabeza
- b) Embrión anormal mostrando microftalmia bilateral ventrículos cerebrales pequeños y bulbos olfatorios poco desarrollados.

Embrión j, microftalmia unilateral, con hematoma alrededor del cristalino, ventrículos cerebrales poco desarrollados.

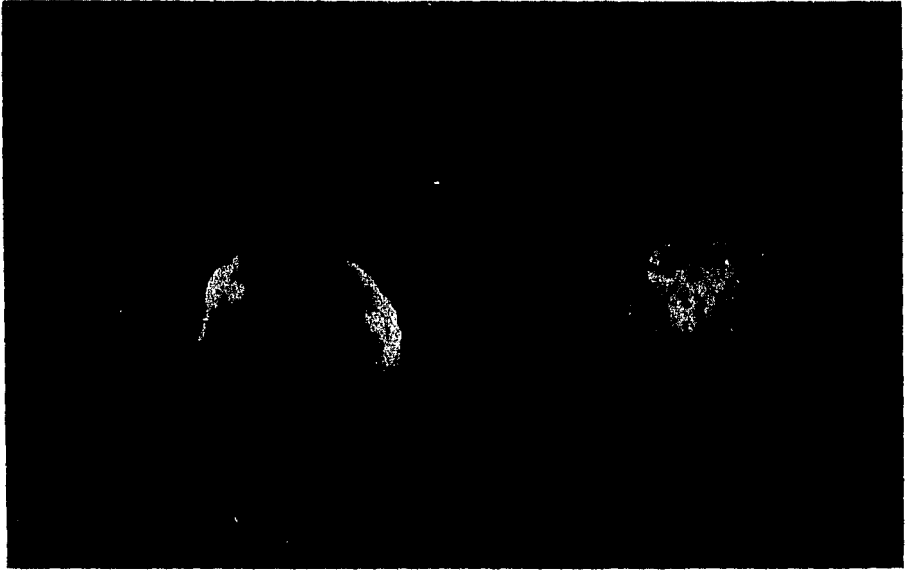
fotografía V



Fotografía V

- a) Embrión testigo. Corte a nivel de cabeza
- b) Embrión anormal, mostrando microftalmia unilateral y ventrículos cerebrales poco desarrollados.

Embrión k, anoftalmia en el ojo izquierdo, microftalmia en el ojo derecho con hematoma alrededor del cristalino. anencefalia, carencia, de bulbos olfatorios.

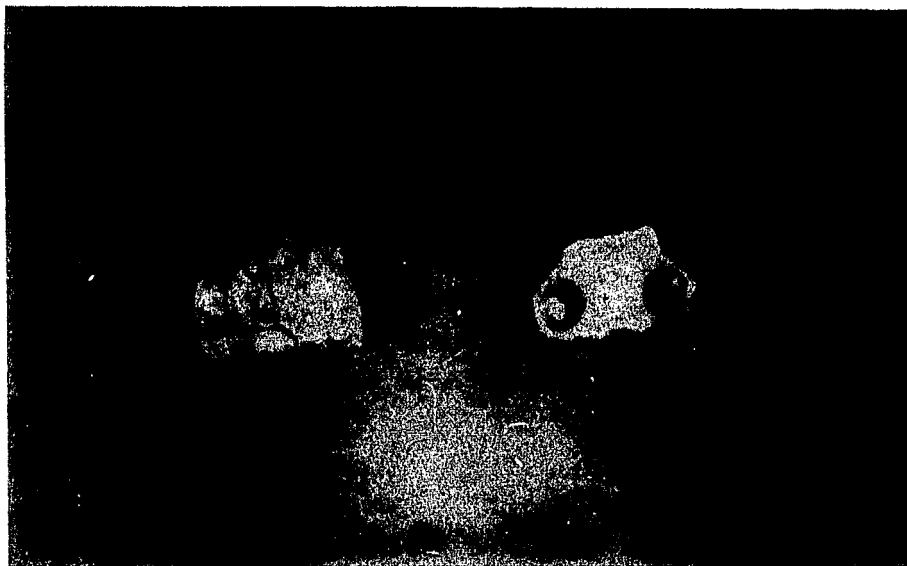


Fotografía VI

- a) Embrión testigo
- b) Embrión con anoftalmia en el ojo izquierdo y microftalmía en el ojo derecho.

Embrión h, microftalmia bilateral, con hematoma en los ojos, ventrículos cerebrales pequeños, por lo que hay microcefalia; carencia de bulbos olfatorios.

fotografía VII

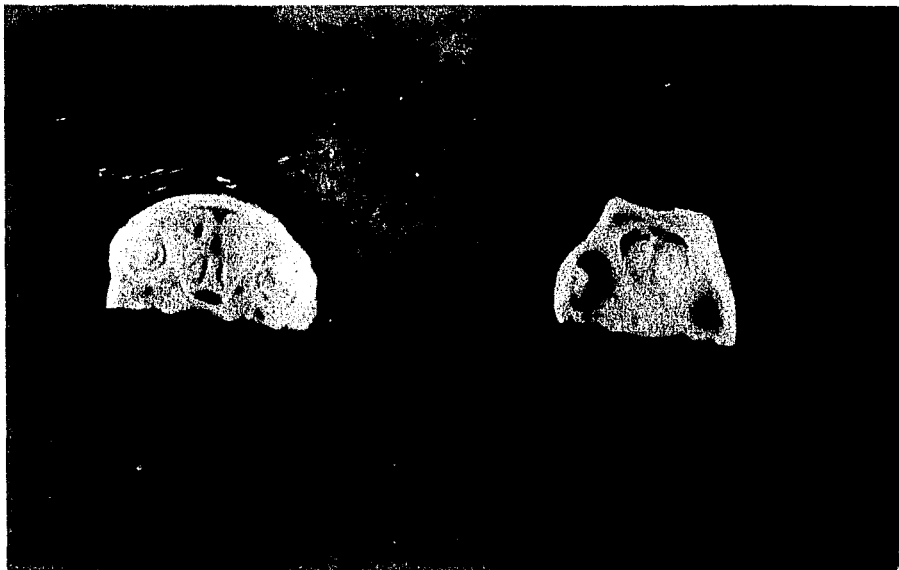


Fotografía VII

- a) Embrión testigo, Corte a nivel de cabeza
- b) Embrión anormal, con microftalmia bilateral, microcefalia, bulbos olfatorios no existen.

Embrión 1, microcefalia, microftalmia en el ojo derecho y anoftalmia en el ojo izquierdo, carencia de bulbos olfatorios.

fotografía VIII



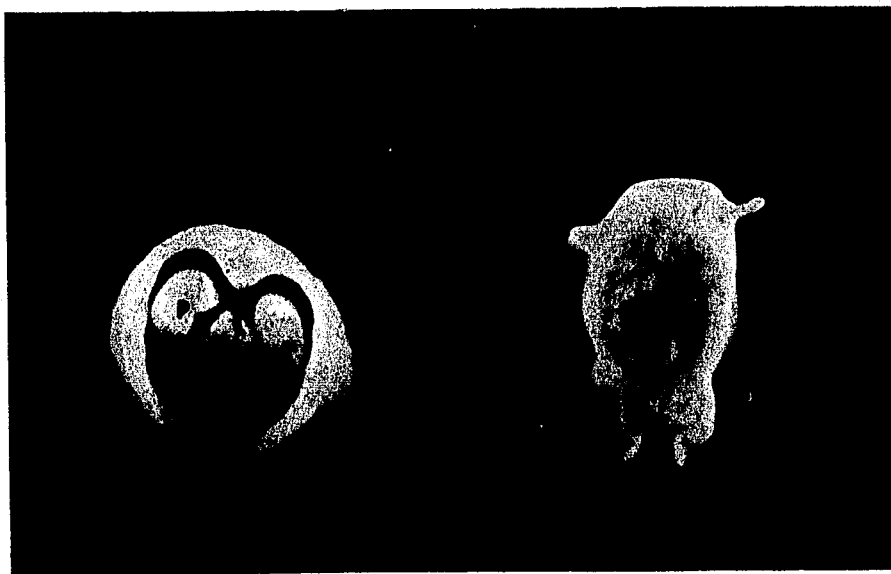
Fotografía VIII

- a) Embrión testigo
- b) Embrión anormal con microcefalia, microftalmia del ojo derecho, anoftalmia del ojo izquierdo.

Los cortes a navaj libre en el tronco, solo se lograron en los ejemplares h, j, ; ya que los embriones i, k, l, fueron deleznales.

Al efectuar el estudio de corazón (c) y pulmones (p) nos demostraron en los embriones h, j, ya que la pared del corazón es gruesa, con una cavidad pequeña sin sangre; los lóbulos pulmonares no están bien delimitadas son pequeños e irregulares; por lo que respecta a la musculatura el cuerpo presenta forma irregular y disminuida.

fotografía IX

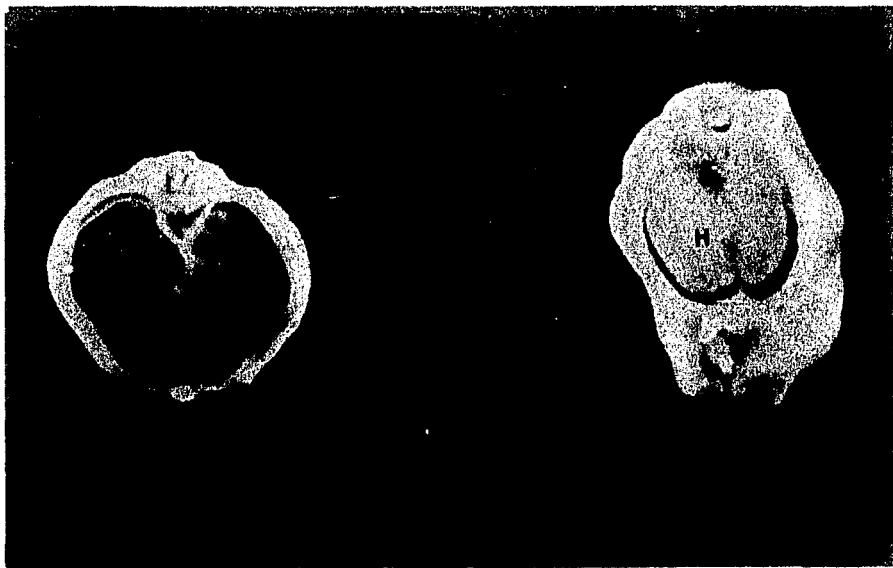


Fotografía IX

- a) Embrión testigo
- b) Embrión anormal, mostrando corazón, pulmones y la forma irregular del cuerpo.

En los embriones anormales h, j, los cortes a nivel de hígado demostraron este órgano de menor tamaño y de color amarillento.

fotografía X

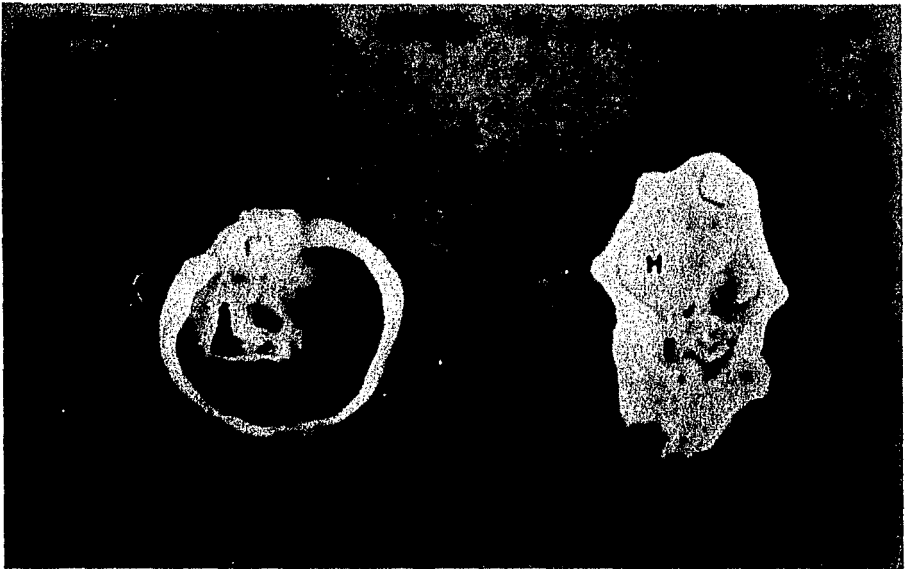


Fotografía X

- a) Embrión testigo
- b) Embrión anormal, mostrando las alteraciones hepáticas.

D) en la sección más caudal de los embriones h, j, se encuentra situado el estómago (E), cerca de la mitad del hígado (H) se presenta el duodeno (D) y el páncreas. En el embrión con alteraciones, el estómago se encuentra fuera de lugar ocupando casi una posición ventral, no se observa el duodeno ni el páncreas

fotografía XI

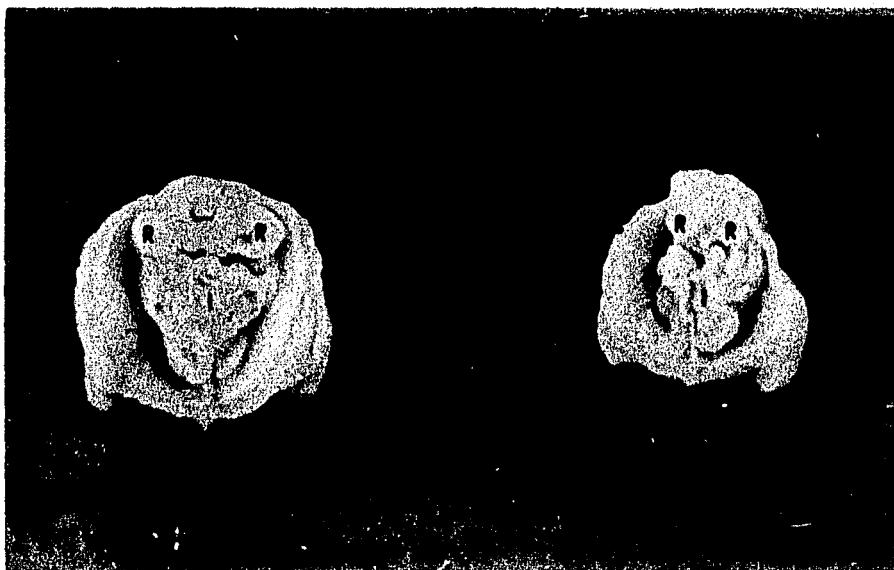


Fotografía XI

- a) Embrión testigo
- b) Embrión anormal, mostrando solo el hígado y el estómago fuera de lugar.

E) En el embrión h, j, los riñones (R), se encontraron muy juntos y de forma irregular, los intestinos (I) son poco desarrollados.

fotografía XII



Fotografía XII

- a) Embrión testigo
- b) Embrión anormal mostrando los riñones irregulares y los intestinos.

F) Al remover los intestinos en el embrión alterado debimos de observar los organos sexuales, los cuales no se presentaron.

V.- DISCUSION

En el trabajo presente se utilizaron 12 animales experimentales lo que no constituye un número representativo desde el punto de vista estadístico.

Las técnicas utilizadas fueron las de inclusión en parafina y tinción hematoxilina y eosina por ser una de las mejores para hacer las observaciones macroscópicas de los ovarios. Las técnicas de transparentación y de navaja libre son las más prácticas para el estudio de las alteraciones presentadas por los fetos, tanto en la estructura externa como interna y estructuras óseas.

La forma en que el Ro 4-6467/1 fué administrada tuvo como finalidad observar las reacciones y las alteraciones que podían presentar cada embrión ya implantado, con dosis progresivas a partir del séptimo día de la gestación; el dejarlos vivir hasta un día antes del alumbramiento fue para poder observar los úteros con las reabsorciones y los fetos normales y anormales, ya que si se les deja nacer la madre elimina algunos descendientes y el número de estos no podría ser exacto.

Por lo que se refiere a las implantaciones se presentaron en la mayoría de los casos números normales, de acuerdo con Wilson y Warkany son por individuo de 10 a 14 implantaciones. (54)

Las reabsorciones se presentaron en un 19.8% en nuestros especímenes a los cuales se les administró el quimioterapéutico del 7º al 13º día; en nuestros animales experimentales los cuales se utilizaron como testigos no se presentaron reabsorciones, datos que están de acuerdo con los emitidos con Dupressis y L. Mercier-Parot. (15). Nosotros coincidimos que la proporción de la reabsorción es baja en nuestro material

debido a que el mayor número de estas reabsorciones 50%, se presenta del 3' al 6' día, y nosotros empezamos la administración de la droga el 7' día.

El porcentaje de hijos anormales obtenidos en el presente trabajo fue del 6.9%, aplicando el quimioterapéutico durante la organogénesis. Según L. Mercier-Parot y colaboradores; el Ro 4-6467/1 en ratones con dosis de 20 mg/kg entre el 8' y 12' día del embarazo produce una teratogénesis del 36%, la diferencia puede ser debida a las dosis empleadas y por que se usaron diferentes especies, ya que coincidimos en los días de aplicación y el citostático empleado. (38).

Las alteraciones sufridas por nuestros animales experimentales son iguales a las descritas por L. Mercier-Parot en ratones y con el mismo citostático fueron: anoftalmias y microftalmias; alteraciones de corazón, riñones, hígado y órganos sexuales; las malformaciones a nivel de esqueletos corresponden a falta de osificación; estas alteraciones coinciden con las descritas por Wilson y Warkany. (54)

Murphy al usar también Natulan en los mismos días describe malformaciones como ectodactilia, las cuales también se presentaron en nuestros especímenes. (13)

VI.- CONCLUSIONES.

- 1.- La dosis de 14 mg/kg de Natulan en ratas embarazadas, produce reabsorciones en un 19.8% en los embriones.
- 2.- Cuando el Ro 4-6467 se aplicó a las ratas embarazadas entre el 7' y el 13' día de la gestación se produjeron la mayor parte de las reabsorciones.
- 3.- La aplicación de 14 mg/kg Natulan en la forma indicada produce anomalías embrionarias en una proporción de 6.9%.
- 4.- El Ro-6467 aplicado en dosis de 14 mg/kg no es considerado como dosis letal para los fetos.
- 5.- Las alteraciones sufridas en el esqueleto de los embriones son proporcionales con el número de dosis empleada.
- 6.- Las anomalías en las vísceras se presentan cuando se aplica el citostático, durante la organogénesis.
- 7.- La dosis de 14 mg/kg de Natulan en ratas no afecta la estructura de los órganos reproductores revisados en la rata madre.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aldea, G., Ionescu-Goga, y col. 1970. Resultados comparativos en el tratamiento de los Estadios Avanzados de la enfermedad de Hodgkin como Velbe y Natulan. Rev. Latinoamericana de quimioterapia Antineoplásica, V. III. No. 1. p. 28-30.
- 2.- Baggiolini, M. Bickel. M.H. and Messiha. F.S. 1965 Demethylation in vivo of Natulan, a Tumour-Inhibiting Methylhydrazine Derivative, *Experientia*. V. XXI p, 334-336.
- 3.- Bernard, J., Boiron, M, et coll. Décembre 1967. Traitment de la maladie de Hodgkin par une polychimiothérapie-Associant Moutard a L' Azote, Vincristine Méthylhydrazine et Prednisone. *La Presse Médicale*. V. 75 No. 52 p. 2647/2649.
- 4.- Berneis, K. Bollag, W. et al. 1965. Synergism between Ionozing Radiation and a Cytotoxic Methylhydrazine Effect on DNA-Degradation. *Experientia*. V. XXI/6, p. 318-320.
- 5.- Berneis, K., Kofler, M. et al. 1963. The degradation of Deoxyribonucleic Acid by New Tumour Inhibiting Compounds: the Intermediate Formation of Hydrogen Peroxide. *Experientia* V. XIX/3 p. 132-133.
- 6.- Berumen, L. Franco G. 1966. Ensayo de tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y otros Linfomas con una Metil-Hidracina. *Revista Medicina*. Departamento de Hematología, Hospital General. México, D.F. . P. 559-564.
- 7.- Bollag, W. 1964. Investigations with Methylhydrazine. Derivates Chemotherapy of cancer. Edité par P.L.A. Plattner Amsterdam. London. New York, Elsevier. p. 191-197.
- 8.- Bollag, W. 1963. The Tumor-inhibitory Effects of the Methylhydra-

- zine Derivative Ro 4-6467/1 (NSC-77213). Cancer Chemotherapy Rep. No. 33. p. 1-4.
- 9.- Bollag, W. 1963. Suppression of the Immunological Reaction by Methylhydrazine, a New Class of Antitumor Agents. Experimentia. (Suiza). V. XIX/6, p. 304-305.
 - 10.- Bollag, W. and Grunberg E. 1963. Tumor Inhibitory Effects of a New Class of Cytotoxic Agents: Methylhydrazine Derivatives. Experimentia. V. XIX/3, p. 130-131.
 - 11.- Bollag, W. and Theiss E. 1964. Methylhydrazine Derivatives. Chemotherapy of Cancer. Edited by Pl. A. Plattner. Amsterdam, London, New York, Elsevier. p. 311-313.
 - 12.- Cervantes, V. Jose Luis. 1970. Acción Teratogena de un Medicamento Citostático, Ro 4-6467/1, Administrado por Vía Intravenosa. Tesis Recepcional U.N.A.M. pp 51.
 - 13.- Chaube, S. Murphy, M.L. 1964. The Teratogenic Effects of 1-methyl-2-para (isopropyl-carbamoyl) benzil-hydrazine HCL (MHI). Proc. Amer. Ass. Cancer Res. V.5 p. 11.
 - 14.- Duperrat, B. et H. Colliard. 17 avril 1969. Une Aponévrosite Hypertrophique, Variante particuliere de la Maladie de Dupuytren. Excellent résultat therapeutique d' un agent cytotatique (méthyl-hydrazine). La Presse Medicale. V. 77 No, 17.p . 645.
 - 15.- Estévez, R. . Estévez de O.T., y Col. 1962. Procarbazina. Rev. Latinoamericana de Quimioterapia Antineoplásica. Catálogo de Drogas Antitumorales Utilizadas Actualmente en la Clínica. Buenos Aires, Argentina. p. 40.
 - 16.- Farris, E. and Griffith, J. 1967. The Rat in Laboratory Investigation. Hafner Publishing Co. New York. pp. 542.
 - 17.- Fasio, M., Minetto, et Cavallero P. 13 décembre 1969. Le Traitement de L' Asthme Bronchique Chronique par la Méthylhydrazine (25 cas) . La Presse Medicale. V 77. No.53 p 1996.
 - 18.- Gerhartz, H. 1964. Contributiona to the Biological and Clinical Effect of a Methylhydrazine Derivative. Chemotherapy of Cancer. Edited by Pl. A. Plattner. Amsterdam, London, New York. Elsevier. p. 215-218.

- 19.- Gerhartz, H. Blum K. U. Coöper H. 1964. Zur Chemoterapie mit dem Methyldrazinderivat Ro 4-6467 bei Hamoblastosen und Karzinomen. Conference. 70e Sessão de la Société Allemande de Médecine Interne, Weisbaden, 6-9 abril.
- 20.- González, V. Humberto. 1970. Efectos Teratógenos del Ro 4-6467. Administrado por Vfa oral. Tesis Recepcional. U.N.A.M. 53 pp.
- 21.- Hidalgo, I.N., Montaña. G. 1967. Resultados Clínicos de los derivados de la Metilhidracina. Sobretiro de la Revista Médica del Hospital General. México, D.F. V. XXX. No. 5 p. 349-357.
- 22.- Instructivo General de Laboratorios Roche para la aplicación del Ro 4-6467.
- 23.- Ionescu-Goga, S., Aldea, G. y col. 1969. El Tratamiento Combinado con Citosfáticos de Linfomas Malignos en Estadíos Avanzados. Rev. Latinoamericana de Quimioterapia Anti-neoplásica. V. 2. No. 4. p. 187-189.
- 24.- J. C. 28 Aout-4 Sept. 1965. Le Natulan dans la Thérapeutique des Affections Malinges. La Presse Médicale V. 73. No. 36. p 2062.
- 25.- Kayibanda, B. Amiel, J.L. el Bérardet M. 22 mars 1969. Utilization de L' action Immuno-Dépressive des Produits Antimitotiques pour l' étude de leur Mécanisme d' action. Application a la Methyl-hydrazine. La Presse Médicale. V. 77. No. 14. p. 525.
- 26.- Kenis, Y. 1964. Contributions to the Biological and Clinical of Cancer. Edité par Pl. A. Plattner. Amsterdam. London New York. Elsevier. p. 219-220.
- 27.- Kenis, Y. 1965. A. Comparative Study of Vinblastine and Natulan in the treatment of Hodgkin's Disease. First G. E. C. A. Symposium. Excerpta Medica Foundation. pl 35-140.
- 28.- Kreis, W., Yen W. 1965. An Antineoplastic O¹⁴ -Labeled Metthylhydrazine Derivative in P. 815 Mouse Leukemia A. Metabolic Study. Experientia. V. XXI/5. p. 284-286.

- 29.- Kreis, W., Piepho, S.B. and Bernhard. H. V. 1969. Studies on the Metabolic Fate of the ^{14}O -Labeled Methyl Group of a Methylhydrazine Derivative in P 815. Mouse Leukemia, *Experientia*. V. XXII/7. p. 431-433.
- 30.- Kreis. W., Burchenal, J. H. and Hulchison D. J. 1968. Influence of Methylhydrazine Derivative on the in Vivo Trasmethylation of the S Methyl Group of Methionine on to Purine and Pyrimide Bases of RNA. *Proc. Amer. Assoc. For Cancer Res.* . New York. V. 9.
- 31.- Kreis, W. 1970. Metabolism of an Antineoplastic Methylhydrazine Derivative in a P 815 Mouse Neoplasm. *Cancer Research*. V. 30. p. 82-89.
- 32.- Lucero, A. P. 1967. La Methilhidrazina y otro Citostático en los Tumores Sólidos Malignos. Tesis Recepcional. U.N.A.M. p. 42.
- 33.- Martz, G. 1964. Clinical Results with a Methylhydrazine Derivative. *Chemotherapy of Cancer*. Amsterdam. London. New York, Elsevier. p. 198-203.
- 34.- Martz, G. A. D'alessandri et al. 1963. Preliminary clinical. Results with a New Antitumor Agent Ro 4-6467 (NSC 77213). *Cancer Chemotherapy Reports*. No. 33 pp. 5-13.
- 35.- Mathé, G. L. Berumen, et al. 1964. Essai de Traitement de la Maladie de Hodgkin et de Divers - Hématosarcomes et Leucémies par une Méthylhydrazine in treatment of Hodgkin's Disease. *Dancet* V. II. p. 1077-1080.
- 36.- Mercier-Parot, L. et Tuchmann-Duplessis, M. H. . 8 mars. 1969. Action Embriotoxique et Teratogene d'une Methylhydrazine chez la Souris et le Lapin. *La Presse Medicale*. V. 77. No. 12. p. 446.
- 37.- National Drug Code Directory. 1971. Matulane. Public.- Health Service; U. S. Department of Health Education and Welfare. Washington, D. C. p. 1141-1142.
- 38.- Oliverio, V. T. and Kelly M. G. 1964. Contributions to the Biological and Clinical Effect of a Methylhydrazine Derivative. *Chemotherapy of Cancer*. Amsterdam, London, New York.

Elsevier. p. 221/227.

- 39.- Priario, J. C., Iriondo, L.S., D'auria, A., Gardiol, V. C. 1968. Infusión Intrarterial con 5-fluorouracil y con la Asociación de 5-fluorouracil y Natulán. Rev. Latinoamericana de Quimioterapia Antineoplásica. V. 1. No. pp. 96-98.
- 40.- Priario, J. C., P. Paseyro, Iriondo, L. S., Gardiol V. C. D'auria 1968. Infusión Intra-Esternal Continua de 5-fluorouracil y Natulan. Rev. Latinoamericana de Quimioterapia Antineoplásica. V. 1. No. 2. p. 94-95.
- 41.- Raaflaub, J., Schwartz, D. E. 1965. Uber den Metabolismuseines Cytostatisch Wirksamen Methylhydrazin-Derivates. (Natulan). Experientia. V.XXI/1, p. 44-45.
- 42.- Ravina, A. 1965. Le Practicien Devant La Chimiothérapie Antinéoplasique. La Presse Médicale. V.73. No. 6 p. 287-290.
- 43.- Reed, D. J. and Dost, F. M. 1966. Methane and CO₂ Formation by rats During Metabolis of a Methylhydrazine (Natulan). Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. V. 7. p. 57.
- 44.- Riva y F. Asunción. 1970. Alteraciones producidas por un Derivado de Metilhidracina administrado por Vía Subcutánea Durante la Gestación. Tesis Recepcional. U.N.A.M. 47 pp.
- 45.- Rutishauser, A. et. Bollag, W. 1963. Cytological Investigations with a New Class of Cytotoxic Agents: Methylhydrazine Derivatives. Experientia. V. XLX/3, p. 131-132.
- 46.- Schwatz, D. E. 1966. Comparative Metabolic Studies with Natulan Methylhydrazine and Methylamine in Rats. Experientia . V. XXIII/4, p. 212-213.
- 47.- Slonaker, J. R. 1929. Pseudopregnancy in the Albino Rats Amer. Journal Physiol. V. 89. p. 406-416.
- 48.- Snell, G. D. 1967. Biology of the Laboratory Mouse, pp.
- 49.- Todd, I. D. H., et coll. 1965. Natulan in Management of late Hodgkin's Disease, Other Lymphoreticular Neoplasms, and Malignant Melanoma. British Medical Journal.
- 50.- Torres Ma. del Pilar. 1973. Efectos de Esterilidad causados por el

Ro 4-6467, en la primera generación ratas.
Tesis recepcional U.N.A.M.

- 51.- Tuchmann-Duplessis, M. H. et L. Mercier-Parot. 30 Decembre 1967 production chez le Rat de Malformations Oculaires et Squelettiques par Administration d'une Méthylhydrazine. La Presse Médicale. V. 75. No. 55 p.2843.
- 52.- Wilson and Warkani. 1967 Teratology. Principles and Techniques . Univ. Chicago Press. Chicago and London. 277 pp.
- 53.- Zeller, P. Bollag W., 1964 Cytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. Experientia Schweiz. V.XX/38, p. 1-4.
- 54.- Zeller, P., Gutmann H., Hegedüs B. A. Kaiser. Lange mann, Müller M. 1963. Methylhydrazine Derivatives, a New Class of Cytotoxic Agents. Experientia. V. XIX/3, p. 129.