

2 ej 195



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Quimioterapia con Compuestos de Coordinación Derivados del Platino:  
Estudio Monográfico



T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G A

P r e s e n t a

ALBA PATRICIA ROLDAN MASIAS



FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1989



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 está 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.

# I N D I C E

INTRODUCCION .....		1
CAPITULO I	ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACION Y SUS INTERACCIONES	
I.1.	COMPUESTOS DE COORDINACION .....	5
I.2.	QUIMICA Y PROPIEDADES DE ALGUNOS COMPUESTOS DEL PLATINO .....	6
I.3.	ALGUNOS AGENTES ANTITUMORALES .....	8
I.4.	ACIDOS NUCLEICOS .....	9
I.5.	NUCLEOTIDOS .....	12
I.6.	PRIMEROS ESTUDIOS REALIZADOS .....	15
CAPITULO II	QUIMICA ESTRUCTURAL DE LOS COMPLEJOS DEL PLATINO EN INTERACCION CON EL ADN	
II.1.	ANTECEDENTES .....	22
II.2.	NIVELES EN LA ESTRUCTURA DEL ADN .....	23
II.3.	UNION PLATINO-ADN .....	25
II.4.	INTERACCION DE LOS COMPUESTOS DEL PLATINO CON EL ADN .....	27
II.5.	REACCIONES DE LOS COMPLEJOS DEL PLATINO EN ESTADO NEUTRAL, CON LOS COMPONENTES DE LOS ACIDOS NUCLEICOS <u>IN VITRO</u> .....	28
II.6.	REACCION DEL ADN CON CELULAS EN CULTIVO ...	36
II.7.	REACCION DEL CIS-DDP SOBRE EL ADN EN CELU-- LAS <u>IN VIVO</u> .....	39
II.8.	EFFECTOS BIOQUIMICOS EN LA INTERACCION DRG-- GAS-ADN .....	44

CAPITULO III	ADMINISTRACION DEL CIS-DICLORO AMINO PLATI- NO II Y SUS CONSECUENCIAS	
III.1.	FARMACOLOGIA .....	53
III.2.	NEFROTOXICIDAD .....	57
III.3.	LABORATORIOS QUE MANUFACTURAN AL CIS-DDP ..	57
III.4.	TERAPIA POR RADIACION SENSIBILIZADORA .....	58
III.5.	EFECTOS SECUNDARIOS CAUSADOS POR EL CISPLA- TINO .....	62
CONCLUSIONES	.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	.....	69

## INTRODUCCION

El cáncer es una alteración que afecta a todos los organismos pluricelulares, dando como resultado una reproducción indiscriminada de células, por lo que se le clasifica como una enfermedad neoplásica, siendo la neoplasia una masa anormal de tejidos cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales estando incorporado en estos, persistiendo de la misma manera excesiva después de cesar los estímulos que desencadenan el cambio.

Debido a que esta enfermedad se puede localizar en cualquier parte del organismo y manifestarse de diferentes formas puede clasificarse de manera básica en:

- 1) Formación de tumores sólidos, carcinomas, sarcomas y epitelomas, entre otros.
- 2) Leucemias, enfermedades de los órganos hematopoyéticos caracterizados por el marcado aumento del número de glóbulos blancos de 5000 a 8000 hasta 100 000 ó más por  $\text{mm}^3$  de sangre (Waizel, 1979).

De acuerdo a la alta tasa de mortalidad por enfermedades neoplásicas, se han desarrollado numerosos tratamientos para combatirlas; mediante pruebas estadísticas se ha determinado

que en la República Mexicana el problema del cáncer ocupa el 5<sup>o</sup> lugar, encontrando en los primeros lugares a las enfermedades \_ cardíacas y del sistema circulatorio.

En la tabla I se muestran los datos estadísticos obtenidos de 1982-1987 en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, acerca de la incidencia de diversos tipos de cáncer.

TABLA I

INCIDENCIA DE DIFERENTES TIPOS DE CANCER EN LA CIUDAD DE MEXICO

TIPO DE CANCER	1982	1983	1984	1985	1986	1987
Pulmón	71	73	114	156	182	249
Utero	548	568	582	626	641	602
Ganglios Lin fáticos Sec.	90	94	184	206	253	261
Mama	279	286	333	380	411	404
Piel	196	199	210	212	225	227
Sarcoma Ret.	77	84	90	112	136	148
Otros	1200	1277	1413	1536	1738	2054
CASOS TOTALES	2461	2581	2926	3228	3586	3945

En donde se observa que el cáncer en el cuello del útero y en \_

la mama son los que tienen mayor incidencia, es por esto que cada vez hay más personas que se preocupan por obtener una atención adecuada ya que el número de pacientes se incrementa año con año, no por haber más casos con esta enfermedad, sino por la conciencia que se está tomando al respecto. Por esto, gran parte de los estudios científicos se han enfocado al estudio de la quimioterapia como arma importante en la lucha contra el cáncer. Dentro de los compuestos que muestran actividad antitumoral se encuentran algunos compuestos organometálicos (Macquet y Theophanides, 1976) donde se encuentran presentes algunos elementos de transición.

La primera base metálica utilizada en el tratamiento del cáncer fue la llamada Solución Fowler, constituida de una suspensión de arseniato de plomo en benceno (Furst, 1963), por otra parte Magat y Tarashchanskaya en 1974 estudiaron las propiedades antitumorales de complejos hechos a base de fierro y arsenico como auxiliares en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, específicamente Leucemias.

Collier y Krauss en 1931 realizaron estudios con 64 compuestos metálicos incluyendo óxidos, haluros, cianuros y aminas para probar su efectividad contra el llamado Carcinoma de Erlich, Balo y Banga en 1957, desarrollaron complejos autooxidables de metales (metales de transición) con ácido ascórbico obteniendo resultados interesantes en el caso del hierro (Fe), cadmio (Cd) y manganeso (Mn) para contrarestar el llamado Carcinoma Güerin.

Rosemberg et al. en 1960, dieron a conocer la posibilidad de coordinación del platino (Pt) con ciertos ligantes los ----  
cuales eran usados como agentes antitumorales, asimismo desde  
el año de 1977 el Instituto Nacional de Salud de los Estados \_  
Unidos de Norteamerica realiza investigaciones con compuestos\_  
derivados del Pt. Es por lo anterior que en el presente traba\_  
jo de investigación bibliográfica se hace una revisión exhaus\_  
tiva acerca de la Quimioterapia con Compuestos de Coordinación  
en la lucha contra el cáncer con el objeto de obtener la infor\_  
mación adecuada que pueda sentar bases sólidas para un estudio  
experimental ulterior en la utilización de complejos de coordi\_  
nación como agentes antineoplásicos.

# C A P I T U L O I

## ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACION Y SUS INTERACCIONES

## I.1 COMPUESTOS DE COORDINACION

Los compuestos de coordinación son sustancias formadas por un átomo central, generalmente un metal de transición rodeado por un grupo de iones o moléculas orgánicas neutras unidas al metal conocidos como ligantes, el número de moléculas o iones orgánicos que rodean al metal se denomina número de coordinación. En la figura 1 se muestra un ejemplo de un compuesto de coordinación en donde el metal tiene un número de coordinación igual a 4.

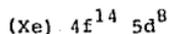
Werner, citado por Huheey en 1981 fue el primero que trató de explicar estas interacciones con base en tres postulados:

- 1) La mayor parte de los elementos tienen varias valencias:
  - a) La primaria que corresponde al estado de oxidación del metal.
  - b) La secundaria que se refiere al número de coordinación.
- 2) Los elementos tienden a satisfacer todas sus valencias.
- 3) Las valencias secundarias están dirigidas a posiciones fijas en el espacio.

A continuación se describen algunas propiedades del Pt, elemento del cual son obtenidos compuestos de coordinación que han mostrado alguna actividad antitumoral.

## I.2 QUIMICA Y PROPIEDADES DE ALGUNOS COMPUESTOS DEL PLATINO

El Platino es un elemento localizado en el grupo 8B en la Tabla Periódica de los Elementos Químicos, es considerado un metal de transición ya que posee 8 electrones en su último orbital, su configuración electrónica en un estado de oxidación igual a cero es:



este último orbital (d) es el que la confiere su caracter altamente covalente y en algunos casos le provee la estereoespecificidad de sus ligaduras. Esto es, que sus ligaduras pueden producir diferentes isómeros de acuerdo a la variación de la energía, como se muestra en la Figura 1.

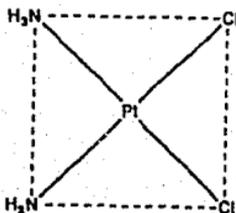


Figura 1a.- *cis*- Dicloroamminoplatino [II]

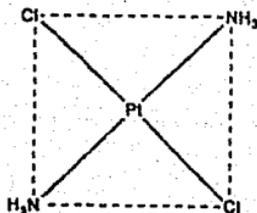


Figura 1b.- *trans*- Dicloroamminoplatino [II]

Cuando el Platino se encuentra en un estado de oxidación de +2 puede acomodar 4 ligantes, y con un estado de oxidación de +4 existen 2 ligantes más que forman su configuración octaédrica con base el el cuadrado plano (Douple, 1984). Figura 2.

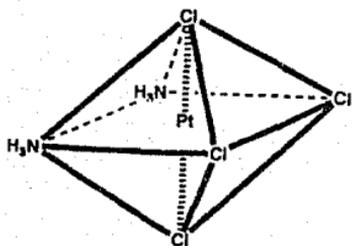


Figura 2a.- *cis*- Pt (IV).

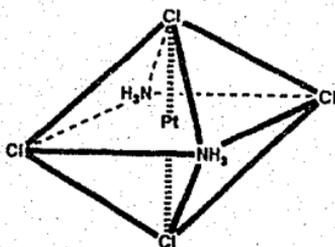


Figura 2b.- *trans*- Pt (IV)

### I.3 ALGUNOS AGENTES ANTITUMORALES

En la Tabla II, se observan dentro de la clase B o grupo del platino una región más pronunciada que corresponde a los aceptores de electrones; siendo metales cuya forma estable lo logran formando complejos olefínicos como: Cu (II), Rh (I), Pd (II), Ag (I), Pt (II) y el Hg (II) (Chatt, 1950).

TABLA II

TABLA PERIODICA DE LOS ELEMENTOS

 CLASE (a)

 CLASE (b)

 REGION DEL BORDE

Adoptando dentro de su esfera de coordinación configuraciones de diversas formas geométricas.

Tanto el platino como el paladio son elementos muy utilizados para formar compuestos antitumorales, y aunque los iones del paladio reaccionan con otros compuestos arriba de  $10^6$  veces más rápido que los del platino, los complejos del platino son más inertes puesto que esta característica inhibe la coordinación axial retardando la velocidad en las reacciones de sustitución; es por esto, que el platino ha sido utilizado más frecuentemente como la base principal en la formulación de las drogas antitumorales desde hace muchos años, no obstante se sigue investigando ya que todavía faltan varios mecanismos de acción por esclarecer.

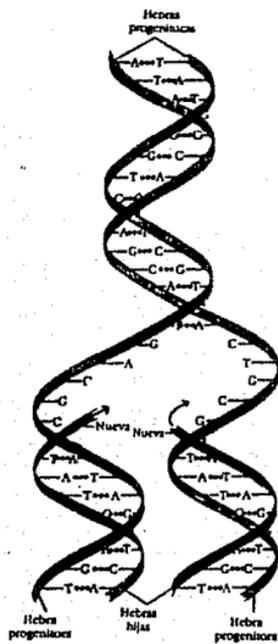
#### I.4 ACIDOS NUCLEICOS

Por el papel tan importante que juegan los ácidos nucleicos dentro del mecanismo de acción del Cis-platino con las células, a continuación se describirán algunas de sus propiedades.

Las moléculas de ADN son cadenas extremadamente largas, que contienen muchos miles de desoxirribonucleótidos de cuatro clases distintas, unidos en una secuencia que es característica para cada organismo, y que constan, habitualmente de dos hebras (Lehninger, 1983).

FIGURA 3

REPLICACION DEL ADN



Según Watson y Crick  
Tomado de Lehninger, (1983)

El cromosoma de las células procarióticas es una gran molécula de ADN, dispuesta de modo compacto en una zona central. Las células eucarióticas contienen muchas moléculas de ADN, cada una de las cuales son en general mucho más grandes que las moléculas de ADN de los procariontes.

En las células de los eucariontes, las moléculas de ADN se encuentran combinadas con las proteínas y se hallan organizadas en las fibras de cromatina en el interior del núcleo.

Las funciones del ADN son: almacenar la información genética completa necesaria para especificar la estructura de todas las proteínas y cada una de las clases de ARN del organismo; programar en el tiempo y en el espacio la biosíntesis ordenada de los componentes de la célula y de los tejidos; determinar las actividades de un organismo a lo largo de su ciclo vital y finalmente definir la individualidad de un organismo dado (Davidson, 1976).

Los ácidos ribonucleicos constan de largas cadenas de ribonucleótidos, y aunque son mucho más cortos que los ADNs, son mucho más abundantes en la mayoría de las células. Tanto en las células procarióticas como en las eucarióticas, las tres clases principales de ARN son: el ARN mensajero (mARN), el ARN ribosomal (rARN) y el ARN de transferencia (tARN). Cada uno de ellos posee un peso molecular, una secuencia nucleotídica y una función biológica característica (Mainwaring, 1982).



y la guanina (G). Los ARNs también contienen dos pirimidinas principales: la citosina (C) y el uracilo (U) además de dos bases púricas principales: la adenina (A) y la guanina (G).

El uracilo es una pirimidina principal en los ARNs y sólo se encuentra en raras ocasiones en los ADNs como se observa a continuación.

TABLA III

PRINCIPALES BASES PURICAS Y PIRIMIDICAS DEL ADN Y ARN

---

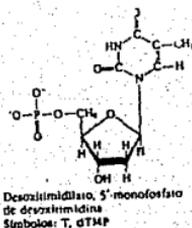
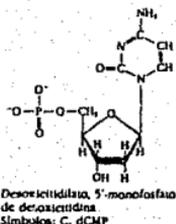
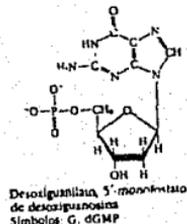
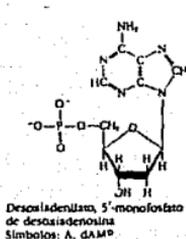
	ADN	ARN
PURINAS	ADENINA GUANINA	ADENINA GUANINA
PIRIMIDINAS	CITOSINA TIMINA	CITOSINA URACILO

---

Las unidades desoxirribonucleotídicas del ADN en forma libre a un pH de 7.0, se simbolizan habitualmente por A, G, T y C o en algunas ocasiones por dA, dG, dT, y dC cuando forman parte

de la molécula de ADN. Estos nucleótidos cuando se encuentran en forma libre se abrevian normalmente como: dAMP, dGMP, dTMP y dCMP. La figura 5 muestra la configuración química de dichas moléculas (Lehninger, 1983).

FIGURA 5



Unidades desoxirribonucleotídicas del ADN en forma libre a un pH= 7,0.

## I.6      PRIMEROS ESTUDIOS REALIZADOS

La motivación para realizar experimentos con compuestos anticancerígenos surgió del estudio de los efectos en los campos eléctricos de las células.

Para esto se trabajó con Escherichia coli incubándosele en un medio químico definido que contenía cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, una cámara provista de dos electrodos a los cuales se les aplicó un voltaje definido, alternando los electrodos de manera cruzada (Rosemberg, 1978), y se observó que la densidad de la bacteria disminuía con el tiempo, y al a pagar el voltaje había una recuperación en la densidad bacterial. El proceso se repitió varias veces.

Separando la cámara bacterial de los electrodos del platino que contienen una cámara en un medio nutriente se observó el mismo efecto, significando que los compuestos químicos con larga duración fueron producidos por electrólisis en los electrodos de platino, causando la filamentación de la bacteria. Después de dos años de trabajo, se determinó que estos compuestos químicos son el Cisplatino y/o Platino IV, esta substancia química fue sintetizada en 1845 y reconocida como "Cloruro de Peyrone".

Werner, citado por Huheey en 1981 realizó una serie de contribuciones para establecer una base firme en la coordinación de su química, es por esto que el Cisplatino es uno de

los compuestos de coordinación de mayor importancia.

Rosemberg et al., en 1967a y 1967b, estudiaron otros efectos para los complejos del platino en bacterias, concluyendo que las especies en solución son bactericidas potentes, así como especies neutrales (Cisplatino), que inhiben la división celular sin ocasionar grandes efectos en la tasa de crecimiento, además de ser efectivas en la represión viral latente en las bacterias lisogénicas (Reslova, 1972).

Al término de estos estudios, se pensó que estos compuestos químicos podrían en virtud de su acción en células bacteriales, inhibir la división celular en las células cancerígenas.

Para comprobar dicha hipótesis, primero se determinaron las dosis no tóxicas toleradas en ratones ( $L d_{50} \approx 13 \text{ mg/ Kg}$ ); en donde el Cisplatino y análogos inhibieron completamente el desarrollo del tumor al administrarse un día después de la inoculación, siendo probados estos resultados en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica para la Leucemia 1210 en BDF<sub>1</sub> (ratones), los cuales fueron publicados por Rosemberg et al. en 1969. Dicha droga ha sido probada sucesivamente y se ha observado que es activa entre una gran variedad de sistemas en tumores de animales, los resultados de estos estudios se muestran en la TABLA IV.

TABLA IV

ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA DEL CISPLATINO /  
DIFERENTES TIPOS DE CANCER

TUMOR	ANIMAL	RESULTADOS
Sarcoma 180 (sólido)	Ratón blanco suizo	T/C= 2-10% <sup>a</sup>
Sarcoma 180 (sólido avanzado)	Ratón blanco suizo	100% curados
Sarcoma 180	Ratón blanco suizo	100% curados
Leucemia L 1210	BDF <sub>1</sub> ratones	%ILS= 379%
Carcinoma Lewis primario (pulmón)	BDF <sub>1</sub> ratones	inhibido 100%
Carcinoma Erlich	BALB/c ratones	%ILS= 300%
Carcinosarcoma Walter 256 (avanzado)	Fisher 344 ratas	100% curados: T.I. 50 <sup>c</sup>
Leucemia Dunning (avanzada)	Fisher 344 ratas	100% curados
P388 Leucemia linfocítica	BDF <sub>1</sub> ratones	%ILS= 534% <sup>b</sup> ; 7/10 curados
Sarcoma en cel. reticular	c+ ratones	%ILS= 141% <sup>b</sup>
B-16 Melanocarcinoma	BDF <sub>1</sub> ratones	%ILS= 268% <sup>b</sup> ; 8/10 curados
ADJ/PC6	BALB/c ratones	100%; T.I.=8 <sup>c</sup>
AK Leucemia (linfoma)	AKR/LW ratones	%ILS= 225% <sup>b</sup> ; 3/10 curados
Ependimoblastoma	C57Bl/6 ratones	%ILS= 169% <sup>b</sup> ; 1/6 curados
Sarcoma Rous (avanzado)	15-I pollos	65% curados
DMBA-carcinoma mamario	ratas	77% de regresiones <sup>d</sup>

ICI 42, 464 Leucemia mieloide y limfocítica	ratas	%ILS= 400% <sup>b</sup>
AK Leucemia	AKR/Lw ratones	%ILS= 163; 3/10 curados
CD8F <sub>1</sub> mamario	CD8F <sub>1</sub> ratones	T/C= 0%; 10/10 curados
Colon 26 (C6)	CDF <sub>1</sub> ratones	%ILS= 257%; 9/10 curados
Colon 38 (CB)	BDF <sub>1</sub> ratones	T/C= 11%; %ILS= 299; 5/10 curados
M5076 Carcinoma ovárico	BDF <sub>1</sub> ratones	T/C= 0% %ILS= 321; 6/10 curados
Osteogenicosarcoma Ridgeway	AKD <sub>2</sub> F <sub>1</sub> ratones	%ILS=297;2/10 curados
LX <sub>1</sub> Pulmón	ratones	T/C= 0%
Colon 06-A	CDF <sub>1</sub> ratones	%ILS= 150; 2/10 curados

<sup>a</sup>T/C= Masa tumoral en animales en tratamiento/ Masa tumoral en animales controlados X 100.

<sup>b</sup>%ILS= % incremento en el tiempo de vida de los animales, controlados, en tratamiento.

<sup>c</sup>T.I.= Indicador terapéutico (LD<sub>50</sub>/ ED<sub>90</sub>); ED<sub>90</sub>= dosis efectiva para inhibir los tumores en un 90%.

<sup>d</sup>3/9 libre de todos los tumores.

De los resultados anteriores se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- La droga es activa entre la gran variedad de tumores en animales.
- 2.- Es capaz de producir una remisión significativa y curar a las ratas en un número de sistemas tumorales sensibles a las drogas.
- 3.- No es especie-específico en su acción.
- 4.- Es activa entre el virus inducido y el carcinoma químico inducido, como el cáncer transplantable.
- 5.- Es activa en la diseminación (Leucemia) y también como sólido (Sarcoma)

Ante estos resultados el Instituto Nacional de Cáncer y el Instituto Wadley de Medicina Molecular de los Estados Unidos Norteamericanos establecieron pruebas preclínicas en cuanto a la farmacología y toxicidad; e introdujeron la droga a la fase clínica I en 1971-1972, denotándose un avance en el cáncer testicular y ovárico (Higby et al., 1974).

A pesar de que el Cisplatino muestra diferentes espectros de toxicidad, Cvitkovic et al. en 1977 del Instituto Sloan de los Estados Unidos de Norteamérica determinaron un "truco" de farmacología, el cual consiste en hidratar al paciente a priori durante y después de la administración del Cisplatino, e incrementan

do la dosis de la droga a un régimen más alto ( $\sim 120 \text{ mg/m}^2$ ). Sin embargo otros investigadores creen que la náusea y el vómito son factores de la dosis límite en la administración de la droga, por lo que actualmente se están buscando agentes que puedan aminorar dichos efectos.

En el mismo período, los químicos realizaron síntesis de estructuras análogas, las cuales fueron probadas para la actividad anticancerígena, para el estudio del Platino II hubieron algunos compuestos con correlaciones simples entre la estructura y la actividad emitida, concluyendo los siguientes puntos:

- 1.- Estos complejos pueden cambiar algunos ligantes rápidamente en reacciones con moléculas biológicas.
- 2.- Los complejos pueden ser eléctricamente neutros, a pesar de que la forma activa puede cargarse.
- 3.- Se requieren grupos libres como dos Cis monodentados o bi en uno bidentado. (El correspondiente isómero Trans es inactivo).
- 4.- Las tasas de cambio para estas ligaduras pueden caer en una zona restringida llamada "Ventana de Labilidad".
- 5.- Los grupos con ligaduras no cambiantes que cruzan la molécula de los grupos libres pueden ser preferencialmente unidos, relativamente a sistemas inertes de aminas.

Los complejos de coordinación de metales además del Platii

no han sido insuficientes en su estudio, pero representan un á  
rea futura para la investigación de nuevos agentes anticancerí  
genos.

C A P I T U L O I I

QUIMICA ESTRUCTURAL DE LOS COMPLEJOS DEL PLATINO EN  
INTERACCION CON EL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

## II.1 ANTECEDENTES

Los complejos que incluyen metales de transición han sido utilizados como agentes metaloterapéuticos tanto en Biología \_ como en Bioquímica, a pesar de que aún falta por conocer más a cerca de su química estructural y sus interacciones con diversas sustancias biológicas a nivel molecular.

Considerando que el Cis-DDP y las reacciones en las bases químicas del tumor se encuentran poco elucidadas, el tema es \_ motivo de constantes investigaciones en todo el mundo.

Por recientes estudios se ha determinado que la química \_ de los complejos hechos a base de estos metales designan mejor a los agentes indicadores en las macromoléculas biológicas, en contrando que las drogas antitumorales del Platino se unan al \_ blanco celular (ADN), ayudando a diseñar de una manera más e--fectiva las drogas y observando los efectos tóxicos que limi--tan la eficacia clínica del Cis-DDP.

En éste capítulo se recopilan algunas investigaciones recientes obtenidas en laboratorios donde el problema principal \_ es analizar la química estructural de los complejos del Platino en interacción con el ADN, y la naturaleza de los compues--tos del Platino que afectan profundamente la estructura del \_ complejo Platino-ADN resultante.

## II.2 NIVELES EN LA ESTRUCTURA DEL ADN

Como base para el entendimiento de la interacción de complejos de Platino-ADN, primero se describirá lo más importante con respecto a la estructura del ADN.

La molécula de ADN posee diferentes niveles estructurales, siendo estos:

- 1) Estructura primaria.
- 2) Secuencia de bases en la estructura secundaria expuesta por Watson-Crick.
- 3) La doble hélice de la estructura terciaria resultante por la articulación de la doble hélice.

La superactivación de la doble hélice aparentemente es necesaria en muchos procesos celulares (Cozzarelli, 1980), además se ha encontrado que el ADN es articulado en organismos simples como los procariontes, así como en las células de organismos superiores.

En células eucariontes, la doble hélice del ADN se encuentra envuelta en superhélices alrededor de complejos con ocho histonas, esta unidad estructural está dada en términos del nucleosoma (Mc Ghee y Felsenfeld, 1980). Esto se repite a lo largo de la cadena del ADN para formar lo que se conoce como "Cuentas en un Cordon" (Olins y Olins, 1974), observadas en micro-

graffas electrónicas de cromatina.

Para los procariontes como E. coli es mucho más simple articular sus moléculas de ADN por medio de plásmidos (Novick, 1980), los cuales consisten en miles de bases apareadas de ADN puestas en un círculo cerrado.

La doble hélice de las moléculas circulares es superarticulada por sí misma para formar una estructura condensada llamada "Forma 1". Los constituyentes topológicos resultan ser inherentes en cuanto a su estructura, resultado de la unión de la superhélice que se encuentra en constante movimiento a la doble hélice de Watson-Crick (Bauer, 1978). Por ejemplo, una droga administrada en diferentes períodos de tiempo provoca que la doble hélice del ADN se separe en cuanto la droga se une por medio de la inserción entre las bases apareadas.

El bromuro de etidio, que comúnmente se utiliza como intercalador, desdobra la hélice del ADN 26° por molécula de droga (Wang, 1974). Por lo tanto, si una molécula se une a una molécula circular que se encuentre cercana, entonces se activará el ADN y el desdoblamiento local de la doble hélice será negativo con respecto a la vuelta superhelical, de esta manera se mantiene el mismo número total en el ADN.

Si el ADN circular cercano se rompe en una de sus cadenas, entonces no habrá articulaciones y la molécula se encontrará relajada, abriéndose en forma circular denominándosele a esta estructura con el término de "Forma 2". La ventaja que se obtie

ne del estudio de las uniones en los complejos del Platino con moléculas plásmicas es que se pueden observar cambios en la movilidad del ADN (en geles electroforéticos), añadiendo cambios estructurales que se dan cuando las uniones del Platino son repetidas varias veces en eventos experimentales observados.

### II.3 UNION PLATINO-ADN

Algunas de las interrogantes que se han venido planteando por mucho tiempo son:

- 1.- ¿Cómo es que los complejos simples del Platino se unen al ADN?
- 2.- ¿Cuáles son los efectos en las estructuras primarias, secundarias y terciarias del ADN con respecto a su unión?

Howe-Grant et al. en 1976, han hecho importantes observaciones acerca del Cis-DDP (la droga antitumoral), y han concluido que ésta se une covalentemente y no por intercalación al ADN.

Para determinar la interacción de los complejos del Platino con el ADN de organismos superiores, se han enfocado los estudios a las uniones de las drogas antitumorales activas con el Cis-DDP y los estereoisómeros Trans, que resultan ser inactivos a la partícula del nucleosoma (Lippard y Hoeschele, \_\_\_\_\_ 1979).

Con el fin de comprender en qué parte los complejos del Platino se pueden unir al ADN, proteínas o ambos y el núcleo de la partícula, se observó que el Cis-DDP a baja concentración con respecto al radio del nucleótido ( $r_b$ ) interactúa exclusivamente con el ADN nucleosomal, así mismo, el Trans-DDP forma específicamente histona-histona y ADN-histona en sus puentes de unión. Este experimento fue uno de los primeros que demostraron claramente la diferencia cualitativa en la manera en que dos complejos del Platino se unen en un sistema in vitro.

En los efectos de los complejos del Platino en una conformación covalentemente cerrada, circular, activada al ADN y utilizando un gel electroforético hecho a base de agarosa, se observó que el Cis-DDP y el Trans-DDP desenrollan la doble hélice resultando un movimiento negativo de activación para el ADN obteniendo un ángulo de  $22^\circ$  de desdoblamiento por unión. Con pSM1 (Cohen et al., 1979) y pBR 322 (Ushay et al., 1981), los plásmidos que interactúan con el Cis-DDP y el Trans-DDP mueven todas las articulaciones resultantes en una molécula cerrada de ADN.

En contraste a los resultados de Scovell y Kroos en 1982 se observó que en cantidades equivalentes de unión, tanto el Cis como el Trans-DDP causan cambios notables en la conformación del ADN. Por ejemplo: Para una molécula de Platino circular como el pBR 322 el ( $r_b$ ) fue de  $\pm 0.050$  para ambos isóme-

ros (Ushay et al., 1981), además del enrollamiento positivo y el incremento en la motilidad del ADN (encontrándose en forma de gel). Los niveles de unión en el Platino se engrandecen tanto que resulta necesario inducir la comigración cerrada y relajar al ADN circular.

Un segundo efecto para la "Platinación" fue observado por medio de la movilidad electroforética en el ADN circular relajado, incrementándose la movilidad en las uniones del Platino, a su vez se opone al decremento inicial y al incremento subsecuente.

Desde la primera descripción de las propiedades biológicas en los complejos del Platino, a habido un esfuerzo considerable para entender la base molecular de sus acciones.

La clara demostración en la utilidad del Cisplatino para tratamientos con tumores humanos ha añadido ímpetu a este trabajo, por lo que el entendimiento en el mecanismo de la acción de la droga puede proveer una base más racional en la investigación de nuevos farmacos. Existe la evidencia de que las drogas a base de Platino promueven los efectos de citotoxicidad con respecto a la interacción con el ADN, puesto que es el mejor blanco para el accionar de la droga.

#### II.4 INTERACCION DE LOS COMPUESTOS DEL PLATINO CON EL ADN

Existen varias hipótesis propuestas para la mejor compren

si3n del mecanismo de acci3n en los compuestos del Platino \_\_\_\_ (Rosemberg, 1975; Tisdale y Phillips en 1975), en donde la m1s aceptada propone que el ADN da1ado y la sntesis del ADN en un sitio tambi3n da1ado es directamente responsable de la actividad citot3xica de las drogas del Platino. Asf mismo, las drogas antitumorales son bifuncionales y reaccionan con las especies electrof3licas de las macromol3culas celulares. En un \_\_\_\_ par de bases moleculares, el ADN es un solo blanco que va a lo largo de una o m1s reacciones por mol3cula de dosis farmacol3gicas; no obstante, las c3lulas poseen varios grados de capacidad para cortar el patr3n da1ado y generar otro ADN, adem1s de variar su capacidad para sintetizarlo.

De las observaciones anteriormente hechas en la reparaci3n del ADN, lesiones y citotoxicidad se considerar1 las reacciones de la droga con los 1cidos nucleicos debido a la gran importancia que esto representa.

## II.5 REACCIONES DE LOS COMPLEJOS DEL PLATINO EN ESTADO NEUTRAL, CON LOS COMPONENTES DE LOS ACIDOS NUCLEICOS IN-VITRO.

Los cambios notables en los espectros de absorci3n ultravioleta del ADN en el esperma de salm3n (Salmo gairdneri, Richardson) despu3s de reaccionar con el Cis o el Trans-DDP, proveen la evidencia de que ambos compuestos se unen a las bases

orgánicas del ADN.

Por estudios espectrofotométricos se confirma que las tres bases: guanina, adenina y citosina, pueden reaccionar con ambos isómeros, y la velocidad en la reacción con la guanina resulta ser más rápida que en las otras dos bases (Stone et al., 1974). Se han observado varios sitios posibles de unión en las bases de purina por medio de la metilación y la protonación. Para esto Mansy et al. en 1973, definieron los sitios que pueden envolver a la reacción con el Cis y Trans-DDP, y concluyen que el isómero Cis forma un quelato bidentado con el 6-NH<sub>2</sub> y N-7 ó los 6-NH<sub>2</sub> y N-1 de la adenina, además del 4-NH<sub>2</sub> y N-3 de la citosina como se indica en la Figura 6.

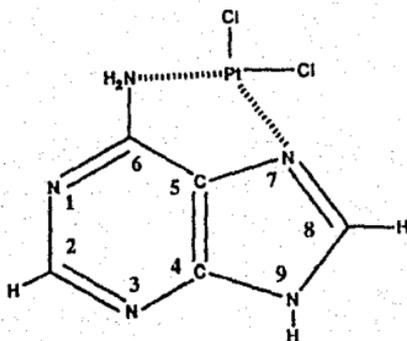


Figura 6.- Complejo cuadrado plano formado por la interacción de la adenina (6-NH<sub>2</sub> y N-7) y el *cis*-DDP

Por otro lado, el isómero Trans interactúa monofuncionalmente con el N-7 y N-1 de la adenina y el N-3 de la citosina. Ambos isómeros reaccionan monofuncionalmente con el N-7 de la guanina y la hipoxantina, como se observa en la Figura 7.

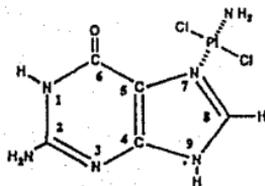


Figura 7a.- Isómero *trans* del DDP unido a la guanina en la posición N-7.

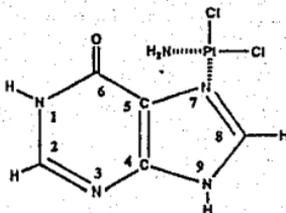


Figura 7b.- Isómero *cis* del DDP unido a la hipoxantina en la posición N-7.

Estudios hechos por medio de difracción de rayos X en los complejos formados por el Cis Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> y varias bases, han confirmado las conclusiones propuestas por Mansy *et al.* en 1973. El producto de la reacción entre la inosina y el Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>I<sub>2</sub>, consiste en dos anillos de hipoxantina unidos al ión de Platino en la posición N-7 (Goodgame *et al.*, 1975), una estructura similar resulta de la interrelación del Pt Cl<sub>2</sub> con

la guanina (Gellert y Bau, 1975) y la posición N-7 volverá a ser ocupada por un metal, vease Figura 8.

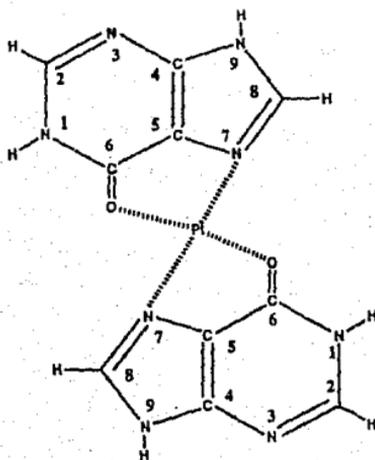


Figura 8.- Platino unido a dos anillos de hipoxantina en la posición N-7 y C-6.

Otros átomos que han demostrado cierta afinidad con respecto al Platino provocan la deprotonación de las posiciones N(1) y N(3) en la guanina y timina, respectivamente, así como la deprotonación del grupo  $\text{NH}_2$  de la citosina (Bau, 1981).

En estudios cristalográficos, aún no existe la evidencia de que la posición 0-6 de la guanina, en el grupo 6-NH<sub>2</sub> de la adenina y que el grupo 4-NH<sub>2</sub> de la citosina podrían estar ocupados por iones de Platino (Bau, 1981). La unión bidentada en la reacción entre el N-7 y la posición 0-6 de la guanina existe para el Cis pero no para el Trans-DDP, resultando ser una posibilidad atractiva para comprobar la diferencia entre la efectividad biológica de los dos isómeros. No obstante, la unión bidentada a una sola base no se ha podido determinar con certeza, como se muestra en la Figura 9.

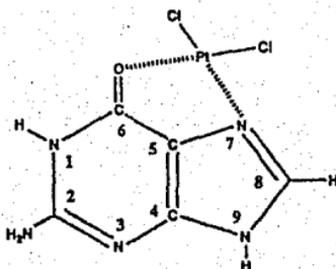
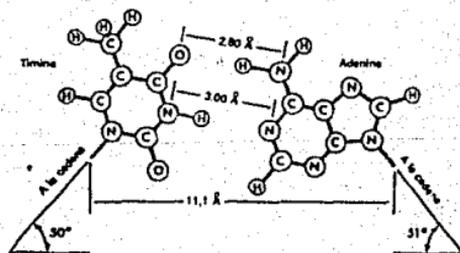


Figura 9. Unión de la guanina con el cis DDP en la posición C-6 y N-7

Los compuestos del Cis-platino pueden inducir la formación de los puentes de unión en el ADN aislado (Pascoe y Roberts, 1974), o en el ADN de todas las células (Roberts y Pascoe, 1972). Hasta ahora no existe una evidencia directa que indique cuál de todos los sitios de unión discutidos hasta ahora se encuentran envueltos en la reacción aunque existe una posibilidad sugerida por medio de la examinación del modelo de ADN, en donde se propone que el puente de unión podría ocurrir entre el grupo 6-amino en la adenina; en oposición a la secuencia dA-dT del ADN, obteniendo de  $3\text{Å}$  a  $3.5\text{Å}$  de separación.

FIGURA 10

Bases apareadas mediante enlaces de hidrógeno en el ADN. La adenina siempre se une a la timina mediante dos enlaces de hidrógeno.



Además existe la evidencia que indica que el Cis-DDP puede articular a dos grupos de esta manera en un simple nucleótido (Roos et al., 1974). Alternativamente los grupos amino de las guaninas o de las citosinas en cadenas opuestas en el ADN en una secuencia de dC-dG son teóricamente capaces de formar un puente de unión. El puente de unión interno en el ADN rico en guanina y citosina fue reconocido mediante estudios de renaturalización en los puentes de unión del ADN con diferentes contenidos de G-C (Ganguli y Theophanides, 1979).

La frecuencia presentada en los puentes de unión fue originalmente estimada por la unión en cantidades medidas de platino a las células HeLa, obteniendo también que los puentes de unión en las moléculas del ADN son de un tamaño previsible (Basolo y Pearson, 1967), se ha demostrado que este hecho relativamente fuera de lo común tiene un mínimo del 1% del número total de reacciones con el ADN celular. En recientes estudios cuantitativos se trabajó con los puentes de unión en células de ADN del Hamster Chino, utilizando gran variedad de técnicas que confirmaron la rareza en los puentes de unión de todas las células en el tiempo de su máximo desarrollo.

La clara evidencia existente para la formación de los puentes de unión en el ADN, ADN aislado y en el ADN de todas las células, indica una formación semejante en los puentes de unión entre las bases adyacentes del ADN por medio de los compuestos del Platino. No obstante, la importancia de esta reac

ción como un evento inactivable en un bacteriófago fue observado primero por Shooter et al. en 1972, para el bacteriófago 17\_ y más adelante por Filipiski et al. en 1982 para el fago alfa. Para que los puentes de unión se establezcan, debe de haber una perturbación local en la doble hélice, y algunos cambios espectrales en las observaciones con fotoelectrones de rayos X, o \_\_\_ cambios espectrales CD (Tamburio et al., 1977).

Tamburio et al. en 1977, realizaron una modificación en el espectro CD del ADN observándose un bajo nivel de reacción e incrementándose con más contenido de G-C para diferentes ADN. La unión del Platino a la posición N-7 de la guanina puede romper a la unión G-C del hidrógeno unido, el cual se forma en la posición N-1 de la guanina disponible para la reacción (Kelman et al., 1977). Las uniones covalentes del Cis y del Trans-DDP en un ADN PM2 circular altera el grado de enrollamiento y corta al ADN como se revela en el microscopio electrónico, probablemente por el enrollamiento del complejo (Cohen et al., \_\_\_ 1979).

En algunos experimentos recientes hechos por Cohen et al. en 1980, se establece que el Cis-DDP forma los puentes de unión entre las guaninas adyacentes en una secuencia dGn dCn (n=4) en el circular pSM1 a bajos niveles de Pt/p.

## II.6 REACCION DEL ADN CON CELULAS EN CULTIVO

Existen varios estudios en células cultivadas que indican la relevancia del Platino/ADN unido a la citotoxicidad, destacando el de Pascoe y Roberts en 1974, quienes estudiaron la interreacción de diferentes compuestos de Platino con macromoléculas en diferentes medidas de células muertas.

Para comprobar la importancia del ADN, ARN y proteínas como blancos primarios para compuestos hechos a base de Pt (II) [cuyos datos se expresan en moles/g<sup>-1</sup>], las macromoléculas son utilizadas para construir pedazos de las curvas contra la cuenta de la droga que se encuentra unida a cadenas de tipo macromolécula. Los resultados de las gráficas son caracterizados de manera similar a aquellos pedazos de células sobrevivientes a la dosis de droga dada a las células.

La anchura en las curvas tiene un valor Bq mientras que las líneas rectas son denominadas Bo. Para los isómeros Cis y Trans-DDP, los coeficientes de unión resultan ser más altos para el ARN que para el ADN. Así mismo, el verdadero significado de estos coeficientes de unión sólo serían apreciados si la cuenta se tomara con los pesos moleculares de las moléculas que conciernen. Si una molécula no asume selectividad en la unión a un ARN o molécula de proteína en particular, es posible calcular el número de moléculas de Platino unidas a cada macromolécula en una dosis tóxica.

Los resultados de dicho cálculo, en cuanto a la concentra-

ción del Cis-DDP, el cual reduce la fracción sobreviviente de células HeLa de  $f=0$  a  $f=0.37$  (esto es teóricamente la concentración a la cual un evento inactivante ocurre, en el promedio de cada célula), muestra el número de moléculas unidas al ADN, siendo impresionantemente mayor con respecto al ARN o a las proteínas, claramente se observa que el ADN es el blanco celular más susceptible para el Cis-DDP.

Los datos indican que esta concentración de Cis-DDP aproximadamente en una sola molécula de proteínas o en 1500 moléculas se puede recibir una reacción con el Platino. Sin embargo, el nivel de reacción con el rARN, tARN ó mARN no se esperaría en la ausencia de cualquier reacción de selectividad a inactivar todas las moléculas y guiarlas para interferir con la síntesis de proteínas.

La unión entre el ADN y las células sobrevivientes ha sido estudiada en las células en cultivo del Hamster Chino con otros compuestos del Platino que han demostrado tener una valiosa actividad con tumores de animales (Roberts y Fraval, 1978). Se han encontrado diferentes concentraciones molares en estos agentes los cuales producen efectos equitóxicos en las células cultivadas permaneciendo una hora en incubación.

Por otro lado, los niveles de reacción en el ADN a dosis equitóxicas (valor  $B_0$ ) fueron para más compuestos del mismo orden sólo por unos cuantos dobles, como se observa en la TABLA V.

TABLA V

Toxicidad comparada entre algunos complejos hechos a base de Pt/células en cultivo del Hamster Chino V79 379A y células tumorales in vivo del plasmacitoma ADJ/PC6 en relación al ADN unido (Roberts y Friedlos, 1981).

COMPUESTO	ADJ/PC6A		HAMSTER CHINO	
	PLASMACITOMA DE		CELULAS V79 379A	
	RATON			
	LD	ID	D	B
	50	90	0	0
	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(M/1 h)	(nmoles/gm)
<u>cis</u> -Pt (II) Cl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	13	1.6	15	8.5
<u>cis</u> -Pt (IV) Cl <sub>2</sub> (iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	54	4.2	48	2.5
<u>cis</u> -Pt (II) (1,1-CBDA)(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	180	14.5	120	3.0
<u>cis</u> -(II) (mal)(1,2-dac)	N.D.	N.D.	23	2.5
<u>cis</u> -Pt (II) (SO <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> O(1,2-dac)	14	0.4	65	17.5
<u>cis</u> -Pt (II)Cl <sub>2</sub> (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	480	2.4	120	N.D.

N.D. No determinado

CBDA Acido ciclobutanodicarboxílico; dac, 1,2-diaminociclohexano

## II.7 REACCION DEL CIS-DDP SOBRE EL ADN EN CELULAS IN VIVO

Es esencial para el entendimiento del mecanismo de la inhibición tumoral de compuestos hechos a base de Platino el establecer que la sensibilidad de las células tumorales in vivo es similar a la reacción del Platino con su ADN para células tratadas in vitro. En estudios preliminares se trabajó con ratones a los que se les administró ADJ/PC6 plasmacitoma, tratándose con Cis-DDP y otros dos compuestos activos del Platino y Cis-diamino (1:1 ciclobutanodicarboxilato) Platino II a dosis que tiene efectos inhibitorios iguales en el tumor (ID<sub>90</sub>) (Roberts, 1982). La diferencia en cantidades iguales de los materiales administrados a los ratones, es que las dosis no difieren por más de un factor o dos cuando se expresa en términos de concentraciones molares.

Es interesante remarcar que las cantidades de drogas del Platino unidas al ADN del tumor a estas concentraciones equitativas son todas muy similares.

Para et al. en 1982, estudiaron la reacción del Cisplatino y el hidroximalonato diamino platino II con el B16 melanoma y la médula ósea en C57 B1 de ratones. La inhibición en el crecimiento tumoral y la formación de colonias para las células de la médula ósea fueron utilizadas para cuantificar la toxicidad e indicar la selectividad antitumoral.

Por otro lado, el Pt [OH mal (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (hidroximalonato diamino platino II) produce una gran selectividad en la inhibi---

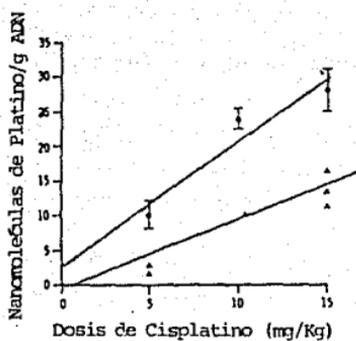
ción del crecimiento tumoral y más selectividad en la células del tumor muertas comparándose con el Cisplatino.

En el caso del Cisplatino, la unión del Platino al ADN medido en niveles de sobrevivencia in vivo fue similar a valores previamente observados en células cultivadas, encontrándose fuertes argumentos que conciernen al mecanismo de acción de las drogas basadas en trabajos in vitro. La gran selectividad en la toxicidad del Pt [OH mal (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] con respecto al B16 melanoma fue asociado con un incremento en la unión del Platino al ADN del tumor con la médula.

El incremento en la especificidad del nuevo congénere que probablemente resulta de los factores farmacológicos que intensifican deliberadamente la activación de la droga a las células tumorales. Como se observa en las Gráficas 1 y 2 y en la Tabla IV.

GRAFICA 1

UNION DEL PLATINO AL ADN DE LOS HÚESOS UTILIZANDO EL CIS-DDP

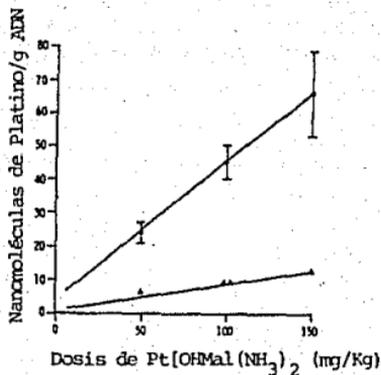


Platino unido al ADN del B16 melanoma (●)

Platino unido al ADN de los huesos, en el tratamiento aplicado a los ratones C567B16 (▲)

GRAFICA 2

UNION DEL PLATINO AL ADN DE LOS HUESOS UTILIZANDO EL  
(Pt[OH Mal (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>])



Platino unido al ADN del B16 melanoma (●)

Platino unido al ADN de los huesos, en el tratamiento aplicado  
a los ratones C57B16 (▲)

TABLA VI

Cantidad de Platino unido al ADN tumoral de los ratones C57BL \_ con dosis de Cisplatino o  $(Pt[OH\ Mal\ (NH_3)_2])$ , produciendo el \_\_\_ 37% de sobrevivencia en células (CFU-S huesos o células de pulmón B16 (LCFC).

	<u>CFU-S</u>		<u>B16</u> <u>LCFC</u>	
	D <sub>37</sub>	cantidad unida	D <sub>37</sub>	cantidad unida
Cisplatino	5 mg/Kg	4nmol/g	11 mg/Kg	22nmol/g
Pt[OHMal(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	40 mg/Kg	5nmol/g	20mg/Kg	12.5nmol/g

## II.8 EFECTOS BIOQUIMICOS EN LA INTERACCION DROGAS-ADN

La interacción de los compuestos del Platino con el ADN celular es bien conocida a partir de estudios realizados en los efectos de las drogas en la síntesis macromolecular. El Cis-DDP aplicándose selectiva y sistemáticamente inhibe la tasa en la síntesis del ADN en comparación a los efectos en la síntesis del ARN y proteínas de las células en cultivo (Harder y Rosenberg, 1970; Van der Berg y Roberts, 1976; Fraval y Roberts, 1978a; Fraval y Roberts, 1978b) y las células in vivo (Howle y Gale, 1970; Taylor et al., 1976).

De la similitud en las bases para este efecto bioquímico selectivo en la síntesis de ADN, resultó la siguiente observación:

La inhibición en la síntesis de ADN fue persistente y progresiva a un tiempo determinado después de haber eliminado la droga.

Cabe hacer notar que particularmente por la comparación de los efectos análogos producidos por agentes reactivos directos, como las mostazas gaseosas, ambos efectos son consistentes tomando en cuenta que la lesión química primaria se efectúa en el ADN de la célula, la cual es inhibida en su replicación. Agregando estas modificaciones al ADN se podría obstaculizar la replicación sin afectar la transcripción o la traducción.

En condiciones donde existen pocas células muertas, la inhibición selectiva por medio de compuestos hechos a base de Plati-

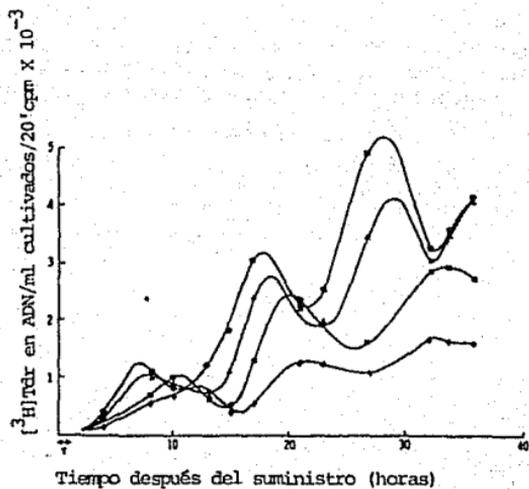
no en la síntesis de ADN pero no en la síntesis de ARN o proteínas, conducen la formación de células gigantes; un rasgo observado en las células tratadas con una variedad de agentes que se sabe que también forman la replicación del ADN selectivamente.

Estudios en las células del Hamster Chino V79, las cuales fueron tratadas con el Cisplatino muestran la depresión en la síntesis de ADN, en éstas células se observó como resultado el decremento en la tasa del ADN sintético, entrando a la fase S, la cual resultó ser muy prolongada en éstas células. Gráfica 3.

Siguiendo el tratamiento  $G_1$  con el Cisplatino en las células Hela sincronizadas, también se observó un decremento en la cantidad de timidina incorporada al ADN en la fase S, aunque el efecto no se manifestó inmediatamente en dichas células (Fraval y Roberts, 1978b) Gráfica 4.

GRAFICA 3

EFFECTOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS CELULAS DEL HAMSTER CHINO V79  
CON EL CIS-DDP EN LA FASE G1 DE LA SINTESIS DEL ADN



CONCENTRACIONES:

0 = ●

1.0  $\mu\text{M}$  = ▲

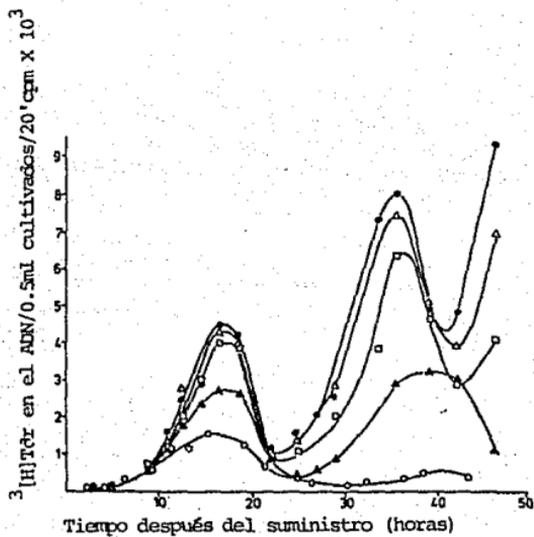
5.0  $\mu\text{M}$  = ■

10.0  $\mu\text{M}$  = ◆

T = tiempo de duración del tratamiento

GRAFICA 4

EFFECTOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS CELULAS HELA CON EL CIS-DDP  
EN LA FASE G1 DE LA SINTESIS DE ADN



CONCENTRACIONES:

0 = ●

0.1  $\mu\text{M}$  = △

0.25  $\mu\text{M}$  = □

1.0  $\mu\text{M}$  = ▲

2.0  $\mu\text{M}$  = ○

Si la síntesis de ADN ha sido dañada ésta sería la responsable de la toxicidad. Las células que encargan de reparar al ADN en la fase S en cuya división celular muestra menos toxicidad que las células que entran al ciclo proliferativo al seguir inmediatamente el tratamiento.

En un estudio inicial Fraval y Roberts en 1979, trataron las células del Hamster Chino V79 con el Cisplatino y midieron la toxicidad y la interacción del Platino-ADN después de varios periodos en un estado de "no división". Las células se impusieron lentamente al Platino y la eficiencia se incrementó. Existe una relación similar entre la cantidad del Platino unido al ADN y la sobrevivencia de la célula en donde el primero comparado con el segundo inmediatamente siguiendo el tratamiento con severas dosis de droga variando así los periodos de recuperación; así mismo, las células utilizadas en estos estudios iniciales, las del Hamster Chino V79, no toleraron el estado de "no división", observándose más adelante que no se recuperaban de la toxicidad que causa el Cisplatino en algunas condiciones.

Más adelante, éste experimento fue repetido pero ahora utilizando fibroblastos (Pera et al., 1981), y bajo esta nueva condición hubo una síntesis mínima de ADN ocurrida. Estas células resultaron estar saludables en la condición de "no división". Los fibroblastos se recuperaron de la toxicidad del Cisplatino, y se impusieron a las lesiones en el ADN por medio de un proceso cuya vida media es de 2.5 días. (Gráficas 5 y 6)

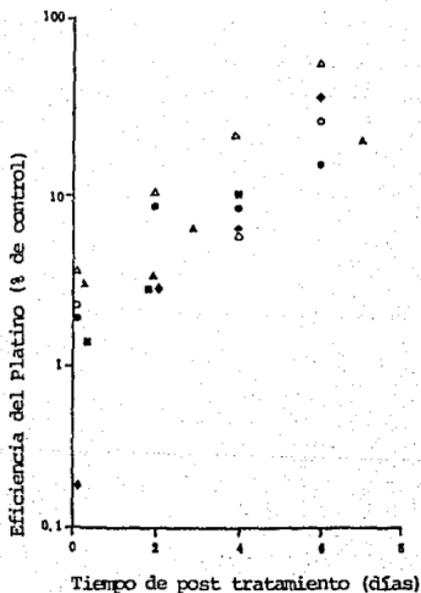
Al medir los puentes de unión entre el ADN-ADN por medio de una solución alcalina y por la estimación del ADN en las células, se encontró que estos son separados en un promedio de, 36 horas. (Gráfica 7)

Estos resultados proponen con firmeza la siguiente hipótesis:

Si el daño es presentado en el ADN al mismo tiempo en que se presentan sus ciclos proliferativos, entonces es responsable de la toxicidad celular.

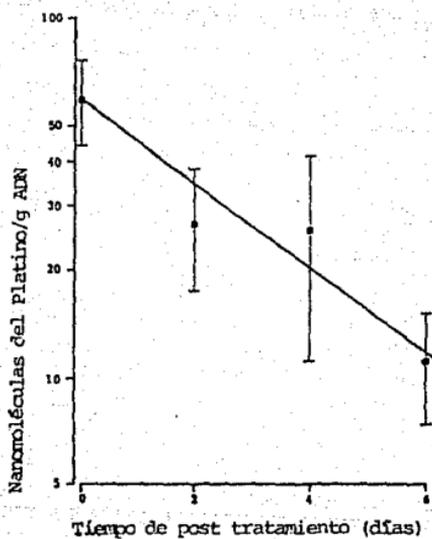
GRAFICA 5

Aplicación de la toxicidad del Cis-DDP en los fibroblastos humanos "no divididos" en la fase estacionaria. Estos fueron tratados con el Cis-DDP ( $\Delta$   $O=32 \mu M$ ; y  $\blacklozenge$   $\blacktriangle$   $\blacksquare$   $\bullet=40 \mu M$ ) y platinados inmediatamente en el estado de "no división" por varios periodos recubriéndoseles con la toxicidad de la droga.



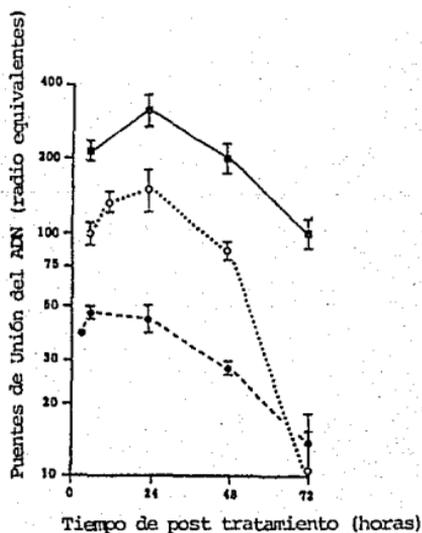
GRAFICA 6

La línea trazada perpendicularmente muestra las pérdidas en los productos de la reacción con el Platino.



## GRAFICA 7

Reparación del Cis-DDP-inducido; puentes de unión entre el ADN-proteínas y los puentes de unión en los fibroblastos humanos en un estado de "no división". Los cultivos estacionarios fueron tratados con  $40 \mu\text{mol}$  de Cis-DDP, y después de varios períodos de duración sin dividirse, los puentes de unión fueron medidos por medio de soluciones alcalinas.



### SIMBOLOGIA:

Puentes de unión entre el ADN/proteínas = ■

Puentes de unión que forma el ADN = ○

Puentes de unión entre el ADN renovado y las células = ●

C A P I T U L O   I I I

ADMINISTRACION DEL CIS-DICLORO AMINO PLATINO II  
Y SUS CONSECUENCIAS

### III.1 FARMACOLOGIA

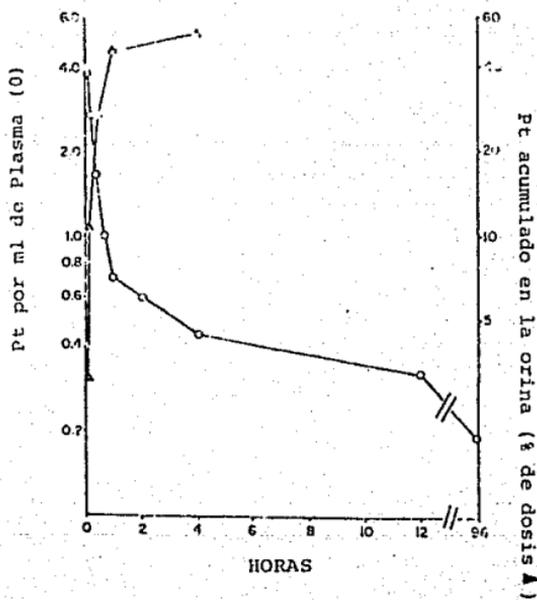
En estudios previos farmacocinéticos se trataron a animales con el Cisplatino, indicándose que este compuesto actúa en la sangre de una manera bifásica, notándose que la tasa media alfa ( $t_{1/2\alpha}$ ) fue menor en una hora y la tasa media ( $t_{1/2}$ ) fue de 4-5 días para los perros (Gráfica 8) y dos días en las ratas (Litterst et al., 1976). Administrando diuréticos intravenosos aplicados a animales, esto antes de que se administrara el Cisplatino, se observó que no hay alteración en la farmacocinética de esta droga aunque decreció significativamente la concentración de Platino en la orina (Cvitkovic et al., 1977). Este método de administración reduce el potencial nefrotóxico del Cisplatino y sirve a las bases para reducir la nefrotoxicidad del compuesto inducida a los pacientes (Prestayko et al., 1979).

La vida media beta ( $t_{1/2\beta}$ ) para la eliminación del plasma en humanos va de 58 a 73 horas (Gráfica 8).

El Cisplatino puede reaccionar con moléculas de agua en el plasma para formar especies mono y diacuosas que reaccionan, a su vez, con varios nucleófilos. Esto aparentemente mide el Platino total por espectrometría de absorción atómica, siendo esta inadecuada para describir la farmacología del Cisplatino.

GRAFICA 8

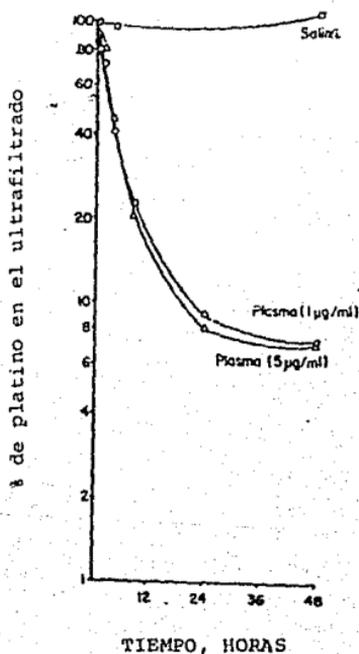
Concentración del plasma y excreción urinaria en los perros a los que se les aplicó el Cisplatino.



GRAFICA 9

Porcentaje del platino en plasma de perros (ultrafiltrado) en función de tiempo a la incubación del Cisplatino con el plasma a dos concentraciones: 5 g/ml ( $\Delta$ ) y 1 g/ml (o).

Representa el porcentaje de platino en una solución salina con Cisplatino, obteniéndose por medio de ultrafiltración.



Recientemente se ha descrito un método que mide los niveles de plasma del platino como las drogas libres -filtrables-, y como la proteína unida a la droga -no filtrable- (Barnister et al., 1977).

El refinamiento de éste método ha hecho posible la medida en la concentración del plasma de las primeras drogas y otras especies como los metabolitos y productos de desecho por cromatografía líquida de alta presión (Chang et al., 1978). Estos resultados y otros estudios hechos por Patton et al. en 1978, indican que después de una inyección los niveles de plasma en especies que contienen platino filtrable declinan de un modo aparentemente bifásico con una  $t_{1/2}$  de 32-53.5 minutos.

La  $t_{1/2}$  del plasma con el platino ha sido observada por De Conti et al. en 1973, obteniendo que después de 3 horas de haber administrado el Cisplatino, aproximadamente el 90% del platino en el plasma fue proteína unida y no filtrable.

Estudios realizados in vitro en uniones proteínas-Cisplatino (Le Roy et al., 1979), demostraron que la cuenta del platino filtrable decreció linealmente con un tiempo de incubación durante las primeras 10-12 horas de incubación.

De la gráfica 9 se puede deducir que la farmacología del Cisplatino resulta ser compleja, puesto que la disociación del cloruro del Cisplatino permite a cierto número de compuestos reactivos formar complejos con moléculas pequeñas y nucleófilos, además la unión de las proteínas del suero mediante los grupos amonio complican más el análisis farmacocinético.

El clarificar los productos de esta reacción con los componentes sanguíneos aguarda el desarrollo de métodos analíticos para su detección.

### III.2 NEFROTOXICIDAD

La nefrotoxicidad al parejo que el Cisplatino ha sido reportada por un gran número de investigadores en estudios clínicos (Madias y Harrington, 1978), quienes utilizan comúnmente la luz del microscopio y/o vías bioquímicas para determinar la lesión primaria, observando que en todos los casos se encuentra próxima a la necrosis tubular.

Se han realizado varios intentos para combatir ésta, mediante la utilización de diuréticos como la furosamida o el manitol; infusiones intravenosas de soluciones salinas; superóxido dismutasa, probándose únicamente en animales (Piel y Pertia, 1975). Así mismo, el mecanismo exacto de la toxicidad, y su aminoración utilizando diuréticos aún no se encuentra perfectamente determinado por lo que los científicos siguen investigando al respecto.

### III.3 LABORATORIOS QUE MANUFACTURAN AL CIS-DDP

El Cis-DDP es manufacturado por los Laboratorios Bristol en Syracuse, Nueva York y el Ara-C por los Laboratorios Upjohn

en Kalamazzo, Michigan para las investigaciones anteriormente descritas.

Este compuesto fue donado por la División del Tratamiento contra el Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica; mientras que el Trans-DDP directamente de los Laboratorios Bristol a través de la cortesía del Dr. A.W. Prestayko; la timidina por la Compañía Calbiochem en la Jolla, California y la citosina, citidina, uracilo, uridina y la cafeína por la Compañía Química Sigma en Saint Louis Missouri; el ara C (con una actividad específica de 19 Ci/mmole), por el Centro Nacional de la Quimioterapia del Cáncer y del Instituto Nacional de Cáncer en Bethesda, Maryland en los Estados Unidos de Norteamérica. Obteniendo que la pureza radioquímica superaba el 97%, determinándose a través de técnicas cromatográficas y radioquímicas.

Todas las drogas, con la excepción del Trans-DDP deben de ser disueltas en agua destilada inmediatamente antes de utilizarse.

#### III.4 TERAPIA POR RADIACION SENSIBILIZADORA

Se ha demostrado que los tumores pobremente vascularizados contienen una fracción de células con una difusión de oxígeno que administre a los capilares. Hace algunos años, se propuso que las células eran resistentes a la radiación, es por esto que se utilizó la radioterapia para la cura de los tumores malignos (Gray et al., 1953). Han sido estimadas fracciones de células en una gran variedad de sistemas sólidos tu-

morales y pueden encontrarse en un intervalo de 10 a 30% de la población total (Rockwell y Kallman, 1973). La importancia en la resistencia de la radiación sobre las células marca la pauta en la realización de la terapia por radiación y la radiación biológica en estos tiempos.

Al pasar de los años hubieron varios ensayos para medir la resistencia de las células tumorales en una fracción. La radiación sensibilizadora es definida como cualquier sustancia que intensifica el efecto de la radiación en un sistema cuando la letalidad de las células se expone a la radiación ionizante. En ésta se juega una pequeña parte de la toxicidad en su propio medio aerobio, el cual se puede referir a la clásica radiación sensibilizadora. Así pues, el efecto del oxígeno ha sido bien estudiado y caracterizado a través de los años por un gran número de investigadores (Powers y Tallentire, 1968).

La radiación que sensibiliza a las células por medio del oxígeno típicamente resulta en un radio definido.

El disciplinado aprovechamiento del estudio de la radiación celular sensibilizadora y el efecto del oxígeno empezó en los años 60's con la determinación del N-etilmalamida y la benzozenona, ya que estos compuestos sensibilizaban a las células de Serratia marcescens para inactivarlas con radiaciones (Adams 1973). El mecanismo propuesto subssecuentemente para causar estos efectos de sensibilidad postulaban que la acción directa de la radiación con el blanco biológico es sumamente importan-

te, ya que crea una ionización localizada y los productos resultantes son inestables, además de ser bi-radicales. La sensibilidad se encuentra en relación a la vecindad de su pasaje a birradicalidad, pudiendo este evento constituir el daño potencial (Adams y Cooke, 1969).

Una mejor consideración al respecto de este modelo es que los sensibilizadores son los mejores aceptores de electrones. En el caso de la benzofenona, sensibiliza a las esporas bacteriales a baja concentración, pero en el caso de que la concentración aumente el proceso se verá invertido (Tallentire et al., 1968). Con el óxido nitroso, cuya acción es convertir los electrones hidratados a radicales hidroxilo en una solución acuosa irradiada, resulta ser también un excelente sensibilizante en las esporas bacteriales (Powers y Cross, 1970).

Existe otro mecanismo en donde el electrón hidratado ( $e^-_{aq}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) son considerados potencialmente importantes ya que son consecuencias biológicas de la irradiación. Se asume que el radical hidroxilo es el que causa el daño a la célula, y el electrón es protegido, o bien tiene consecuencias mínimas. En la ausencia del electrón afín durante la irradiación una pequeña cantidad de  $OH^\cdot$ 's dañados son incurridos por la célula y algunos de los  $OH^\cdot$ 's son duramente removidos como el ión hidroxilo, esto es siguiendo la reacción con  $e^-_{aq}$ .

La primera indicación que el Cisplatino interactúa con las radiaciones ionizantes en los sistemas biológicos fue descrita por Zak y Drobnik en 1971, quienes indican en sus resultados que las inyecciones del Cisplatino afectan la sobrevivencia de los ratones sanos después de una sola radiación por cuerpo. La primera evidencia de la potencialización terapéutica por medio del Cisplatino se originó mediante un tumor originado, realizado por Wodinsky et al., en 1974, quienes reportan que una sola radiación en combinación con el Cisplatino prolonga la vida del ratón habiéndole provocado anteriormente la Leucemia linfocítica P388, comparando los efectos obtenidos y utilizando cada modalidad por separado.

La potencialización terapéutica se utiliza para tratamientos del MTG-B implantados en ratones en tumores cerebrales de ratas (RBT) con el Cisplatino y la radiación (Douple et al., 1977). La combinación de estos tratamientos produce una marcada inhibición en el crecimiento del MTG-B así como el incremento en el tiempo de sobrevivencia del tumor de los animales comparado con el MTG-B en sus tasas de crecimiento y tiempo de sobrevivencia obtenidos con cualquiera de los tratamientos por separado.

El método de ensayo propuesto por Clifton y Draper en 1963, mide la sobrevivencia de las células tratadas in situ por medio de la evaluación en la latencia tumoral de las células, las cuales son diluidas y transplantadas a los ratones.

Más adelante, se han realizado una serie de trabajos en \_ donde se observa un efecto mayor para la combinación radia---- ción-Trans-DDP que para el Cisplatino-radiación que en estu--- dios hechos in vitro (administrándose grandes cantidades de \_\_\_ Trans-DDP).

### III.5 EFECTOS SECUNDARIOS CAUSADOS POR EL CISPLATINO

El Cisplatino es claramente activo en el Cáncer testicu-- lar, ovárico, de cabeza y cuello (Prestayko et al., 1979), e-- xiste la evidencia de una posible actividad en el sarcoma os-- teogénico, cáncer en el pulmón, tiroides y en la córvis. La \_ dosis más utilizada se encuentra entre 50 a 120 mg/m<sup>2</sup> (del tu-- mor) en una sola inyección cada 3 semanas, o bien, 15 a 20 mg/ m<sup>2</sup>/dX5 cada 3 semanas, habiendo fuertes evidencias en la supe-- rioridad de una dosis sobre otra.

Por otro lado, el Cisplatino provoca la acumulación de to-- xicidad renal entre una de sus toxicidades a causa de la dosis lfmite.

En estudios recientes (Prestayko et al., 1979), se ha ob-- servado que antes de la hidratación y la diuresis que son ruti-- nariamente utilizadas junto con la droga, había suero de crea-- tinina en el 26% al 36% de 298 pacientes, además de cambios pa-- tológicos 5 a 6 meses después de la última terapia con el Cis-- platino, con esta prueba se demuestran los perjuicios que pue--

den ser causados por la droga.

Por otro lado, han sido utilizados varios métodos para reducir la toxicidad renal, entre éstos se incluyen las bajas infusiones intravenosas de la droga y la hidratación salina por vía intravenosa con o sin furosamida. En el Hospital Sloan Kettering de los Estados Unidos de Norteamérica, son suministradas altas dosis de Cisplatino (3-5 mg/kg) con 2 litros de glucosa al 5% en medio litro de solución salina normal y 12.5 gr. de manitol inmediatamente antes (10-15 min) de la infusión de la droga, seguido por una infusión continua de 10/gr de manitol con medio de solución salina durante las siguientes 6 hr con este aprovechamiento ningún paciente desarrollo suero de creatinina mayor a 3.0 mg/100 ml y sólo 3 pacientes de 20 desarrollaron entre 2.0 y 3.0 mg/100 ml.

La nausea y el vómito van al parejo del Cisplatino, éstos síntomas comienzan después de 1 a 2 hrs, de la administración de la droga y tiene una duración de 1 a 2 días, aunque algunos pacientes las sufren arriba de una semana después de la terapia.

El Cisplatino causa entre otros efectos, la mielosupresión pero a dosis bajas esta resulta ser moderada, cuando se administran dosis altas (3 mg/kg), entonces se origina una severa mielosupresión. En el Hospital ya mencionado anteriormente 13 de 16 pacientes fueron tratados con dosis altas desarrollando menos de 50,000 plaquetas/mm<sup>3</sup> por lo que 6 de estos

pacientes requirieron transfusiones. No obstante lo mejor es administrarla en dosis bajas y combinar al Cis-DDP con otras drogas mielosupresivas.

Cuando el Cisplatino ha sido administrado en periodos largos la neurotoxicidad resulta ser un problema muy serio. Esta neurotoxicidad es caracterizada por neuropatías periféricas incluyendo la parestesia en las extremidades superiores e inferiores, pérdida del gusto y fuertes dolores de cabeza ocurriendo todo esto después de 4 a 7 meses de tratamiento cuando se ha administrado de 500 mg a 1470 mg en la suma total de todas las dosis.

Para evitar y prevenir todos estos malestares se han establecido 5 dosis clínicas en la aplicación de cualquier droga antitumoral:

1) Dosis no tóxicas	50 mg/m <sup>2</sup>
2) Dosis tóxica mínima	80 mg/m <sup>2</sup>
3) Dosis tóxica significativa	100 mg/m <sup>2</sup>
4) Dosis máxima tolerada	120 mg/m <sup>2</sup>
5) Dosis letal	+120 mg/m <sup>2</sup>

Tomado de Kovack et al., 1973.

Al realizarse estudios en el Hospital Sloan Kettering de los Estados Unidos de Norteamérica (Hayes et al., 1974), se

observó que existe actividad antitumoral al utilizar la máxima dosis tolerada ( $120 \text{ mg/m}^2$ ), aunque la duración de la respuesta es relativamente corta, además del suministro de distintos compuestos para diferentes tipos de Cáncer; todo esto con el fin de evitar la náusea, el vómito, la toxicidad renal y en algunos casos la neurotoxicidad que presentan los pacientes después del suministro de la droga.

Por ser de los más frecuentes, en la Tabla VII se observan el Cáncer en dos órganos diferentes y los compuestos necesarios para contrarrestar los efectos secundarios.

TABLA VII

COMPUESTOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DEL  
CANCER TESTICULAR Y OVARICO

---

CANCER TESTICULAR	VINBLASTINA, BLEOMICINA Y CISPLATINO SOLAS O COMBINADAS (VBP)
CANCER OVARICO	ADRIAMICINA, CITOXAN Y CISPLATINO (ACC)

---

Todas estas condiciones anteriormente descritas hacen que el Cisplatino sea la droga antitumoral más utilizada para el tratamiento contra el Cáncer, por lo que quedan más mecanismos

de acción por esclarecer.

## CONCLUSIONES

El cis-Dicloroaminoplatino II es uno de los compuestos de coordinación que ha sido empleado de manera sistemática como una nueva clase de droga anticancerígena de alta efectividad, a diferencia de otros compuestos de coordinación que incluyen otros metales de transición tales como: rodio, paladio, cobre, cobalto y el iridio los cuales muestran menor actividad en los tratamientos de diferentes tipos de cáncer. La mayor actividad farmacológica de los compuestos del platino se debe a que estos pueden formar fácilmente puentes de unión con el ADN, ob- teniendo de esta manera la estabilidad adecuada con una gran variedad de disoluciones intravenosas a diferentes temperaturas ya que no es afectado por la exposición normal de la luz fluorescente.

Todas estas características hacen que esta droga sea utilizada con mayor frecuencia en el área farmacológica, no solo para combatir tumores sino también por la actividad bactericida que posee.

Sin embargo, como se había mencionado previamente, la selectividad farmacológica de este compuesto no es completa por lo que recientemente con el fin de hacerla totalmente selectiva en cuanto a la destrucción de células cancerosas exclusivamente se ha comenzado a aplicarla en combinación con otras sus

tancias consideradas como quimiorientadoras\* con resultados altamente satisfactorios, de tal forma que el cis-Dicloroaminoplatino II es activo en una gran variedad de tumores en animales; es especie-específico en su acción; es activo en virus inducidos y el carcinoma químico inducido como el Cáncer Transplantable, Leucemias y Sarcomas.

Todas estas ventajas se presentan debido a que pueden cambiar algunos ligantes rápidamente en reacciones con moléculas biológicas, por lo que es necesario el bromuro de etidio, ya que este compuesto desdobra la hélice del ADN 26° por molécula de droga.

No obstante, no todos los compuestos hechos a base de platino son eficientes para el tratamiento del Cáncer ya que el Dicloroaminoplatino II en la posición trans no es activo, esto es debido a que no forma la unión bidentada en la reacción entre el N-7 y la posición O-6 de la guanina. Esta característica es la responsable de que el compuesto cis-Dicloroaminoplatino II sea la droga antitumoral más eficiente hasta ahora conocida, además de que se sigue experimentando con nuevos compuestos de platino tomando como base los experimentos previamente descritos.

\*Hacker, M; E. Douple y H. Krakoff (1988) Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, Developments in Oncology Martinus Nishoff Publishing. Boston 359-376.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, G. and M. Cooke (1969) Int. J. Radiat. Biol. 15, 457-471.

Adams, G. (1973) Br. Med. Bull. 29, 48-53.

Balo, J. and I. Banga (1957) Acta. Unio. Int. Contra. Cancr. 13, 463.

Bannister, L.; A. Repta and G. James (1977) Clin. Chem. 23, 2258-2262.

Basolo, F. and R. Pearson (1967) Mechanism of Inorganic Reactions. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley and Sons. New York. 359.

Bau, R. (1981) "International Conference on the Chemistry of Platinum Group Metals". Royal Society of Chemistry, Bristol. 5.

Bauer, W. (1978) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7, 287-313.

Clifton, K. and N. Draper (1963) Int. J. Radiat. Biol. 7, 515-535.

Cohen, G.; W. Bauer; J. Barton and S. Lippard (1979) Science 203, 1014-1016.

Cohen, G.; J. Ledner; W. Bauer; H. Ushay; C. Caravana and S. Lippard (1980) J. Amer. Chem. Soc. 102, 2487.

Collier, W. and F. Krauss (1931) Krebsforsch 34, 526.

Cozzarelli, N. (1980) Science 207, 953-960.

Cvitkovic, E.; J. Spaulding; V. Bethune; J. Martin and W. Whitmore (1977) Cancer 39, 1357-1361.

Chang, Y.; L. Sternson and A. Repta (1978) Analytical Letters 11, 449-460.

Chatt, J. (1950) Nature 165, 637.

Davidson, J. (1976) The Biochemistry of the Nucleic Acids Academic Press. New York. 45-51.

De Conti, R.; B. Toftness; R. Lange and W. Creasey (1973) Cancer Res. 33, 1310-1315.

Double, B. (1984) Pharmacol. Ther. 25, 297-299.

Double, E.; R. Richmond and M. Logan (1977) J. Clin. Hematol Oncol. 7, 585-603.

Filipski, J.; K. Kohn and W. Bonner (1980) Chem. Biol. Interact. 32, 321.

Fraval, H. and J. Roberts (1978a) Chem. Biol. Interact. 23, 99.

Fraval, H. and J. Roberts (1978b) Chem. Biol. Interact. 23, 111.

Fraval, H. and J. Roberts (1979) Cancer Res. 39, 1793.

Furst, A. and C. Thomas (1963) The Chemistry of Chelation in Cancer. Springfield. 3, 46.

Ganguli, P and T. Theophanides (1979) Eur. J. Biochem. 101, 377.

Gellert, R. and R. Bau (1975) J. Amer. Chem. Soc. 97, 7379.

Goddgame, D.; I. Jeeves; F. Phillips and A. Skapski (1975) Biochem. Biophys. Acta 378, 153.

Gray, L.; A. Conger; M. Ebert; S. Hornsey and O. Scott (1953) Brit. J. Radiol. 26, 638-648.

Harder, H. and B. Rosemberg (1970) Int. J. Cancer 6, 207.

Hayes, T.; J. Wittes; R. Wittes and W. Knapper (1979) Proc. Amer. Assoc. Cancer in Res. 20, 304.

Higby, D.; J. Wallace; D. Albert and J. Holland (1974) The J. Urol. 112, 100-104.

Howe-Grant, M.; K. Wu, W. Bauer and S. Lippard (1976) Biochemistry. 15, 4339-4346.

Howle, J. and G. Gale (1970) Biochem. Pharmacol. 19, 2757.

Huheey, J. (1981) Química Inorgánica (2<sup>a</sup> Ed) Harper & Row. Latinoamericana. Mex. 121, 143, 358.

Kelman, A. H. Peresie and P. Stone (1977) J. Clin. Hematol. and Oncology 7, 440.

Kovach, J.; D. Moertel; A. Schutt R. Reitemerier and R. Hahn (1973) Cancer Chemother. Rep. 57, 357-359.

Lehninger, A. (1983) Biocufmica (2<sup>a</sup> Ed) Ed. Omega Barcelo  
na Esp. 793-821.

Le Roy, A.; R. Lutz; R. Dredrick; C. Litterst and A. Guarino  
(1979) Cancer Treat. Rep. 63, 59-71.

Lippard, S. and J. Hoeschele (1979) Proc. Natl. Acad. Sci.  
76, 6091-6095.

Litterst, C.; R. Dredrick; A. Le Roy and A. Guarino (1976) Cancer Res. 36, 2340-2344.

Macquet, J. and T. Theophanides (1976) Inorgan. Chem. Acta.  
18, 189.

Madias, N. and J. Harrington (1978) Amer. J. Med. 65, 307-  
314.

Magat, M. and F. Tarashchanskaya (1974) Patol. 9, 56.

Mainwaring, W. (1982) Nucleic Acid Biochemistry and Molecu--  
lar Biology. Black Well Cientific. Oxford. 23-34.

Mansy, S.; B. Rosemberg and A. Thomson (1973) J. Amer. Soc.  
95, 1633.

Mc. Ghee, J. and G. Felsenfeld (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 1115-1156.

Novick, R. (1980) Sci. Amer. 243, 102-127.

Olins, A and D. Olins (1974) Science 183, 330-332.

Pascoe, J. and J. Roberts (1974) Biochem. Pharmacol. 23, 1345.

Patton, T.; K. Himmelstein; R. Belt; S. Bannister; L. Sterson and A. Repta (1978) Cancer Treat. Rep. 62, 1359-1362.

Pera, M.; C. Rawlings; J. Roberts (1981) Chem. Biol. Interact. 37, 245.

Pera, M. D. Sessford and J. Roberts (1982) Biochem. Pharmacol. (in press)

Piel, J. and C. Pertia (1975) Cancer Chemother. Rep. 59, 995-999.

Powers, E. and M. Cross (1970) Int. J. Radiat. Biol. 17, 501-514.

Powers, E. and A. Tallentine (1968) In "Actions Chimiques et Biologiques des Radiations". 12, 3-67.

Prestayko, A.; W. Bradner; J. Huftalen; W. Rose; J. Schuring; M. Cleare; P. Hydes and S. Crooke (1979a) Cancer Treat. Rev. 63, 1503-1507.

Prestayko, A.; C. D'Acoust; B. Issell and S. Crooke (1979b) Cancer. Treat. Rev. 6, 17-39.

Reslova, S. (1972) Chem. Biol. Interact. 4, 66-70.

Roberts, J. (1982) In "Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents". Academic Press. New York. 17.

- Roberts, J. and H. Fraval (1987) Biochimie 60, 869.
- Roberts, J. and F. Friedlos (1981) Biochem. Biophys. Acta 655, 146.
- Roberts, J. and J. Pascoe (1972) Nature 235, 282.
- Rockwell, S. and R. Kallman (1973) Radiat. Res. 53, 281---294.
- Ross, I.; A. Thomson and S. Mansy (1974) J. Amer. Chem. Soc. 96, 6484.
- Rosenberg, B. (1975) Cancer Chemother. Rep. 59, 589.
- Rosenberg, B. (1978) Interdisciplinary Sci. Rev. 3, 134-147.
- Rosenberg, B.; E. Renshaw; L. Van Camp; J. Hartwick and J. Drobnik (1967a) J. Biol. Chem. 242, 1347-1352.
- Rosenberg, B.; L. Van Camp; E. Grimley and A. Thomson (1967b) J. Biol. Chem. 242, 1347-1352.
- Rosenberg, B.; J. Van Camp; J. Trosko and V. Mansour (1969) Nature 222, 385-386.
- Scovell, W. and L. Kroos (1982) Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 1597-1603.
- Shooter, K.; R. Howse; R. Merrifield and A. Robbins (1972) Chem. Biol. Interact. 5, 289.
- Stone, P.; A. Kelman and F. Sinex (1974) Nature 251, 736.

Tallentire, A.; N. Schiller and E. Powers (1968) Int. J. Radiat. Biol. 14, 397-402.

Tamburio, A.; L. Celotti; D. Furcan and V. Guantieri (1977) Chem. Biol. Interact. 16, 1.

Taylor, D.; K. Tew and J. Jones (1976) Eur. J. Cancer 12, 249.

Tisdale, M. and B. Phillips (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 1271.

Ushay, H.; T. Tullius and S. Lippard (1981) Biochemistry 20, 3744-3748.

Van Der Berg, H. and J. Roberts (1976) Chem. Biol. Interact. 12, 375.

Waizel, B. (1979) Cultivo, Aislamiento y Variación de Principios Activos de Tres Especies de Plantas con Propiedades Anticancerígenas. Tesis Doctoral. Colegio de Ciencias y Humanidades. U.N.A.M. México, D.F. 1-2.

Wang, J. (1974) J. Mol. Biol. 89, 783-801.

Wodinsky, I.; J. Swimiarski; C. Kensler and J. Venditti (1974) Cancer Treat. Rep. 4, 73.

Zak, M. and J. Drobnik (1971) Strahlentherapie 142, 112-115.