

ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LOS EFECTOS DE LA DOSIS TERAPEUTICA DEL NATULÁN EN RATAS EMBARAZADAS

ELVIRA ESTRADA FLORES

Lab. de Histología y Embriología, Facultad
de Ciencias, UNAM.

RESUMEN

Se realizó el estudio experimental durante tres generaciones de los efectos del agente citostático natulán (Ro 4-6467), administrado oralmente en dosis terapéuticas a ratas Wistar, diariamente durante todo el tiempo de la gestación. La dosis diaria de 4.2 mg/kg de natulán solamente es embriotóxica en la primera generación, los efectos se manifiestan por una disminución en el número de descendientes y gran proporción de decíduomas. Con la dosis empleada no se observaron daños teratogénicos en los fenotipos.

ABSTRACT

An experimental study of the effects of natulán (Ro. 4-6467) cytostatic agent, given orally in therapeutic dose to rats during gestation was performed. The effects were studied through three generations. Doses of 4.2 mg/kg of natulán is embryotoxic in the first generation. The effects proved a diminished number of offsprings and a great proportion of deciduomas. With the doses given, no teratogenic damages were observed in the phenotypes.

INTRODUCCION

Bollag (1963a) y Zeller y colaboradores (1963), utilizaron hidracinas para detener experimentalmente el desarrollo de tumores. Estas son sustancias que muestran actividad quimioterapéutica eficaz así como baja toxicidad. Entre los derivados más activos de la metilhidracina se encuentra la procrabazina Ro-4-6467 o natulán (Mathé *et al.*, 1963; Brunner y Young, 1965).

A este producto lo dieron a conocer Bollag y Grunberg (1963) como NSC 77213 y resaltaron de él su efecto carcinostático.

Según Wegmüller (1942) y Weis (1944), el mecanismo de acción del natulán es semejante al efecto indirecto de las radiaciones ionizantes.

Zeller *et al.* (1963), Bollag y Grunberg (1963), Berneis *et al.* (1963), Weitzel *et al.* (1964) y Sacks *et al.* (1973), consideran que los compuestos con el grupo NH-NH-NH₂ producen efectos citotóxicos notables y sugieren que la acción citotóxica de la metilhidracina puede ser debido a la liberación lenta del peróxido de hidrógeno.

Mathé *et al.* (1963), Weitzel *et al.* (1964) y Goodman y Gilman (1965), consideran que durante el metabolismo del natulán, el formaldehído que se libera en el organismo, actúa como agente alquilante.

En estudios *in vivo*, Weitzel *et al.* (1964) investigaron la oxidación y la liberación del grupo lábil metilo del Ro 4-6467, que interfiere con la metilación normal de las bases (Brooker y Lawley, 1962; Kreis y Yen, 1965; Kreis *et al.*, 1966, 1968) y que causa la sobremetilación, exclusiva de la posición 7 de la guanina (Kreis, 1970), lo que produce desorden en el patrón normal de la metilación del ARN.

Sartorelli y Creasey (1969) demostraron que la droga prolonga la duración de la interfase, fragmenta las cromátidas e inhibe la síntesis del ARN y del ADN y Quiroz *et al.* (1968), encontraron alteraciones cromosómicas consistentes en rupturas a nivel del centrómero.

La despolimerización del ADN producida por el natulán ha sido postulada por Berneis *et al.* (1965), Hidalgo y Montañó (1967) y Estevez *et al.* (1972).

Por otra parte Chaube y Murphy (1964) han atribuido actividad teratogénica al natulán; Tuchmann —Duplessis y Mercier-Parot (1967) y Mercier Parot y Tuchmann-Duplessis (1969) notaron la acción embriotóxica y teratogénica en ratas gestantes de una methilhidracina con propiedades antitumorales.

Teniendo en cuenta que el natulán (Ro 4-6467) es un compuesto con propiedades citostáticas bien conocidas, se decidió estudiarlo experimentalmente, aplicándolo a ratas durante el embarazo y empleando dosis diarias terapéuticas (en proporción a las usadas en humanos), con el propósito de observar alteraciones durante la gestación y en el desarrollo embrionario.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, veinte machos fértiles y sesenta y cuatro hembras primigestas de cinco y tres meses de edad, respectivamente; el peso de las hembras varió entre 150 y 200 grs. Se cruzaron en proporción de tres hembras con un macho y mediante frotis vaginal se determinó el inicio del embarazo.

A las ratas del lote experimental se les administró 4.2 mg/kg de natulán por vía oral (intubación), disuelto en agua bidestilada durante los veintidós días de la gestación. A las ratas del lote testigo se les dio agua bidestilada durante el mismo tiempo y por la misma vías que al lote experimental. De las sesenta y cuatro hembras se separaron cuarenta y dos que resultaron embarazadas y se dividieron en dos grupos: el grupo A, con dieciocho hembras en total, doce experimentales y seis testigo y el grupo B con veinticuatro hembras en total, diecinueve experimentales y cinco testigo.

Las hembras de los grupos A, y B, F₁ se sacrificaron un día antes del parto, con el objeto de conocer *in útero* el número preciso de implantaciones, deciduomas, muertes tardías, hijos vivos, muertos y anormales. El criterio aplicado para la identificación del tipo de implantaciones se refirió al tamaño que presentaron, reconociéndose histológicamente tres tipos:

a. Pequeños crecimientos de 2 a 3mm. de diámetro, formados exclusivamente de tejido materno por lo que se les llaman deciduomas; colocados en el lado opuesto del mesenterio, de color café musgo debido a la necrosis de la decidua.

b. Crecimiento de tamaño intermedio hasta de 1 cm. de diámetro, poseen tejido materno y embriones de escaso desarrollo; se consideran muertas tardías.

c. Las masas más voluminosas corresponden a los embriones a término que pueden estar vivos, muertos o anormales.

A las hembras de los grupos B BF_1 y BF_2 se les dejó que completaran el tiempo de gestación, para que sus hijos nacieran naturalmente y de ellos se obtuvieron la segunda y tercera generaciones, de las cuales se escogió al azar una muestra representativa. (Tabla I)

TABLA I. DIVERSOS GRUPOS DE CRUZAMIENTOS QUE SE REALIZARON

Grupo A_s			
12 hembras experimentales se cruzaron con machos normales.			
6 hembras testigo se cruzaron con machos normales.			
Grupo B	Grupo $B_s F_1$	Grupo BF_1	Grupo BF_2
19 hembras experimentales se cruzaron con machos normales.	5 machos experimentales se cruzaron con hembras normales.	12 machos experimentales se cruzaron con hembras normales.	10 hembras experimentales se cruzaron con 10 machos experimentales.
5 hembras testigo se cruzaron con machos normales.	7 hembras experimentales se cruzaron con machos normales	12 hembras experimentales se cruzaron con machos normales	
A_s y $B_s F_1$ se sacrificaron el vigésimo día del embarazo.			
B BF_1 y BF_2 se dejaron vivir.			

En las tres generaciones obtenidas, se realizaron los estudios de los fenotipos correspondientes.

Se aplicó la prueba de t de Student a los datos para determinar si la diferencia entre la media aritmética del número de los descendientes de los testigos y la de los experimentales era significativa.

RESULTADOS

Al aplicar natulán a las treinta y un ratas experimentales, de los grupos A_s y B durante el tiempo de la gestación, se observó que el número de descen-

dientes fue menor en la primera generación, con respecto a los individuos de la segunda y tercera generaciones y del grupo testigo. (Tabla II).

TABLA II. PROMEDIO ($\bar{x}$) DE DESCENDIENTES DE LAS GENERACIONES F₁ Y F₂ DE LOS GRUPOS A_s Y B CUYAS HEMBRAS FUERON TRATADAS CON 4.2 mg/kg DE NATULAN DURANTE LA GESTACION

Grupos	Número de individuos	Número de hijos normales	$\bar{x}$ de descendientes
A _s Testigo	6	63	10.5
A _s	12	60	5.0
B _s F ₁	12	109	9.0
B Testigo	5	66	13.0
B	19	141	7.4
BF ₁	24	231	9.6
BF ₂	10	97	9.7

El grupo A_s experimental estuvo formado por doce hembras tratadas con 4.2 mg/kg de Natulán diariamente por vía oral durante la gestación, fueron sacrificadas el vigésimo día del embarazo, produjeron ciento cuarenta y cuatro implantaciones de las cuales correspondieron a sesenta hijos vivos, ochenta decíduomas, tres muertes tardías y un hijo muerto.

TABLA III. PRIMERA GENERACION RESULTANTE DEL CRUZAMIENTO DE LAS HEMBRAS DEL GRUPO A_s TESTIGO Y A_s EXPERIMENTAL TRATADO CON 4.2 mg/kg DE NATULAN DURANTE LA GESTACION

Lote	Rata No.	Implan- taciones	Hijos vivos	Decíduomas	Muertes tardías	Hijos muertos
A _s	E	1	9	2	7	
	X	3	13	2	10	1
	P	4	13	4	9	
	E	5	13	3	9	1
	R	9	13	1	12	
	I	10	15	2	11	2
	M	11	14	8	6	
	E	13	9	9		
	N	15	15	11	4	
	T	18	9	8	1	
	A	22	10	2	8	
	L	24	11	8	3	
A _s F ₁ Total	12	144	60	80	3	1
A _s	T					
	F	2	11	11		
	S	7	12	11	1	
	T	16	15	15		
	I	19	3	3		
	G	20	8	8		
A _s F ₁ Total	O	28	14	14		
		6	63	62	1	

El grupo A_s testigo abarcó seis hembras con un número total de sesenta y tres implantaciones que estuvieron representadas por sesenta y dos hijos vivos y un deciduoma.

Al aplicar la prueba de *t* a los datos se obtuvieron diferencias significativas entre los promedios de los descendientes de los testigos y los experimentales con una $P < 0.01$. (Tabla III).

El grupo B experimental estuvo representado por diecinueve ratas hembras tratadas con 4.2 mg/kg de Natulán diariamente por vía oral durante todo el embarazo, se dejaron que nacieran espontáneamente los descendientes y fueron en total ciento cuarenta y un individuos.

El grupo B testigo incorporó cinco hembras de las cuales se obtuvieron sesenta y seis descendientes que nacieron naturalmente al completar el embarazo.

Al aplicar la prueba de *t* a los datos, se obtuvieron diferencias significativas entre los promedios de los descendientes de los testigos y los experimentales con una $P < 0.10$. (Tabla IV).

TABLA IV. PRIMERA GENERACION RESULANTE DEL CRUZAMIENTO DE LAS HEMBRAS DEL GRUPO B TESTIGO Y B EXPERIMENTAL TRATADO CON 4.2 mg/kg DE NATULAN DURANTE LA GESTACION

Lote		Rata No.	Número de hijos que nacieron	Días de duración del embarazo
B		42	4	22
		43	10	22
		44	7	22
	E	45	5	22
	X	47	9	22
	P	48	11	22
	E	49	10	22
	R	51	4	23
	I	52	5	23
	M	53	3	23
	E	54	7	23
	N	55	9	23
	T	56	7	22
	A	58	12	22
	L	59	12	22
		60	4	22
		61	3	24
		62	10	22
		63	9	22
BF ₁ Total		19	141	
B	T			
	E	65	10	22
	S	66	15	22
	T	67	15	23
	I	68	14	22
	G	69	12	23
BF ₁ Total		5	66	

El grupo B_3F_1 estuvo formado por una muestra tomada al azar de doce individuos cinco machos y siete hembras que se cruzaron con individuos normales del sexo opuesto. Las hembras fueron sacrificadas el vigésimo día del embarazo, de las cuales se obtuvieron ciento veinticinco implantaciones que estuvieron representadas por ciento nueve hijos vivos, catorce deciduomas y dos muertes tardías.

Al aplicar la prueba de t a los datos no se encontraron diferencias significativas ($0.1 < P < 0.50$) entre los promedios de los descendientes de los experimentales y los testigos. (Tabla V).

TABLA V. SEGUNDA GENERACION RESULTANTE DE LOS CRUZAMIENTOS DE MACHOS Y HEMBRAS DEL GRUPO B_3F_1 CON HEMBRAS Y MACHOS NORMALES RESPECTIVAMENTE

<i>Lote</i>	<i>Rata No.</i>	<i>Implantaciones</i>	<i>Hijos vivos</i>	<i>Deciduomas</i>	<i>Muertes tardías</i>
H					
E					
M*	12	15	15		
B	14	3		3	
R	10	10	8	2	
A	11	11	9	2	
S	13	10	8	2	
Subtotal	5	49	40	9	
H					
E	1	12	11	1	
M	10	12	11	1	
B	11	9	9		
B_3F_1 R**	16	11	10	1	
A	17	10	6	2	2
S	18	12	12		
	4	10	10		
Subtotal	7	76	69	5	2
B_3F_2 Total	12	125	109	14	2

* Normales cruzadas con machos de la generación F_1 (descendientes de las hembras tratadas).

** Tratadas, cruzadas con machos normales.

El grupo BF_1 estuvo constituido por una muestra tomada al azar de veinticuatro individuos, doce hembras y doce machos, que se cruzaron con individuos normales del sexo opuesto. De las veinticuatro hembras nacieron espontáneamente doscientos treinta y un individuos.

Al aplicar la prueba de t a los datos, no se obtuvieron diferencias significativas ($0.1 < P < 0.80$) entre los promedios del número de descendientes de los animales testigos y los experimentales. (Tabla VI).

TABLA VI. SEGUNDA GENERACION RESULTANTE DE LOS CRUZAMIENTOS DE MACHOS Y HEMBRAS DEL GRUPO BF₁ CON HEMBRAS Y MACHOS NORMALES RESPECTIVAMENTE

<i>Lote</i>	<i>Rata No.</i>	<i>Número de hijos que nacieron</i>	<i>Días de duración del embarazo</i>
	8	12	23
	6	12	21
H	7	13	21
E	4	11	22
M	3	7	22
B	1	5	23
R*	2	6	22
A	5	7	22
S	9	8	22
	15	8	22
	16	8	21
	17	7	23
Subtotal	12	104	
	5	11	22
	6	11	22
H	15	15	22
E	12	11	23
BF ₁ M**	22	12	21
B	9	9	22
R	8	13	22
A	20	10	22
S	19	10	22
	7	7	21
	14	6	22
	3	12	21
Subtotal	12	127	
BF ₂ Total	24	231	

* Normales, cruzada scon machos de la generación F₁ (descendientes de la shembras tratadas).

** Tratadas, cruzadas con machos normales.

El grupo BF₂ estuvo representado por una muestra tomada al azar de veinte especímenes, diez hembras y diez machos, que se cruzaron entre sí, de los cuales nacieron noventa y siete individuos al término de la gestación.

Al aplicar la prueba de t a los datos, las diferencias no fueron significativas ($0.1 < P < 0.80$) entre los promedios del número de descendientes de los animales testigos y experimentales. (Tabla VII).

Mediante la prueba de t de Student aplicada a los datos, se determinó si las diferencias entre los promedios del número de descendientes de los grupos experimentales y testigo eran significativas, tomando como límite el nivel del 90% de confiabilidad ($P = 0.10$), los resultados aparecen en la Tabla VIII.

TABLA VII. TERCERA GENERACION RESULTANTE DEL CRUZAMIENTO DE LOS MACHOS CON LAS HEMBRAS DEL GRUPO BF₂

<i>Rata hembra BF₂</i>	<i>Rata macho BF₂</i>	<i>Número de hijos que nacieron</i>	<i>Días de duración del embarazo</i>
1	1	10	22
2	2	9	22
3	3	13	22
4	4	8	21
5	5	8	21
6	6	13	22
7	7	8	21
8	8	12	22
9	9	7	22
10	10	9	22
BF ₃ Total 10	10	97	

TABLA VIII. PRUEBA DE T APLICADA A LOS GRUPOS DE RATAS TESTIGO Y EXPERIMENTALES

<i>Grupos</i>	<i>$\bar{x}$ de descendientes</i>	<i>T</i>	<i>Po</i>
A ₈	5.0	2.14	P < 0.01
B	7.4	1.09	P < 0.10
B ₈ F ₁	9.0	0.79	0.1 < P < 0.50
BF ₁	9.6	0.33	0.1 < P < 0.80
BF ₂	9.7	0.79	0.1 < P < 0.80

* El nivel de confiabilidad permitido es $\alpha = 0.10$.

Las alteraciones del desarrollo en el grupo A₈ identificadas por medios histológicos (Tabla III) fueron en su mayoría deciduomas (55%). El 41 % correspondió a hijos normales con un total de ciento cuarenta y cuatro implantaciones y el 4%, que representa una proporción pequeña, fueron hijos muertos y muertes tardías.

Al estudiar cuidadosamente las características externas de las tres generaciones, no se apreció ninguna alteración del desarrollo en los grupos correspondientes B₈F₁, BF₁, BF₂ y BF₃.

DISCUSION

Las diferencias significativas, debidas al menor número de descendientes de la primera generación, se pueden atribuir a un efecto de la interferencia con la homeostasis materna (Anónimo, 1973).

De acuerdo con lo expresado por Murphy y Chaube (1960), se considera que el medio uterino es un sistema complejo para la investigación de sustancias químicas que actúan en el crecimiento. La droga, al llegar al embrión, varía en sus propiedades físicas, porque es modificada por el animal embarazado y por su forma de transporte a través de la placenta hasta el embrión. La concentración activa de la droga en el embrión, después de su llegada, depende de la presencia y producción de sustancias protectoras o de procesos de desintoxicación y de dilución, lo cual ocurre en razón directa con el rápido aumento en la masa del embrión.

El Natulán actúa en caminos metabólicos idénticos a los de las células normales (Murphy y Chaube, 1962; Karnofsky y Clarson, 1963); pero con las técnicas empleadas en el presente trabajo no se comprobó el sitio exacto de acción de la droga. Sin embargo, los resultados correspondientes a una alta proporción de decíduomas se podrán explicar mediante dos mecanismos:

1. La toxicidad producida con la dosis terapéutica, se expresa en la formación de decíduomas. Según Bateman (1973), algunos decíduomas o molas contienen tejido trofoblástico, lo que significa que el tejido endometrial es estimulado por el huevo (al implantarse) y muere en etapas precoces sin dejar huella. En éste caso se considera que la formación de decíduomas corresponde a la interferencia que produjo la droga en el desarrollo de tejidos embrionarios tanto mesenquimatosos (Bollag, 1963b) como el resto de los proliferantes (Bollag, 1964; Bollag y Theis, 1964). Estos daños embriotóxicos ya habían sido señalados por Tuchmann-Duplessis y Mercier Parot (1967), quienes usaron el mismo producto. Mathé *et al.* (1963), Bollag y Grunberg (1963), Weitzel *et al.* (1964) y Brunner y Young (1965) comprobaron el efecto citotóxico del Natulán. Bollag y Grunberg (1963), Rutishauser y Bollag (1963), Oliverio y Kelly (1964), Berneis *et al.* (1965), demostraron la inhibición del crecimiento en células neoplásicas que produce la sustancia mencionada.

2. Desde los estudios de Loeb (1908) se ha considerado que, los decíduomas están formados exclusivamente por tejido materno. Estas estructuras, tanto en los roedores como en otros animales de implantación tardía, se forman espontáneamente en condiciones normales y en escasa proporción. Por lo que se supone que la acción de la droga empleada, no solamente se reduce a producir alteraciones en los descendientes, sino que también actúa sobre la hipófisis materna, induciendo la liberación continua de la hormona luteinizante y determinando así la persistencia de la actividad del cuerpo amarillo, cuya hormona ocasiona la producción de numerosos decíduomas (Rothchild y Meyer, 1940).

La aplicación de la droga a partir de la fecundación, eliminó posibilidades de alteraciones genéticas por causa de la misma en los grupos tratados A₀ y B₀, pues el cigoto ya estaba formado y las células sexuales tampoco fueron afectadas durante su formación, por lo que se supone que en los grupos B₀F₁ y BF₁ no se alteró el desarrollo de sus células sexuales en los estados post-meióticos, puesto que no pudieron ser reconocidas en las dos generaciones siguientes, correspondientes a los grupos BF₂ y BF₃.

Las dosis de Natulán aplicadas durante los veintidós días de la gestación, no indujeron alteraciones fenotípicas.

CONCLUSIONES

1. La dosis diaria de 4.2 m/kg de Natulán fue embriotóxica y no produjo daños teratogénicos en los fenotipos.
2. Los efectos producidos por Natulán en ratas embarazadas se manifestaron en una disminución del número de descendientes.
3. La aplicación de dicha droga durante el embarazo produjo una elevada cantidad de decíduomas (55%) en la primera generación.
4. Esta producción elevada de decíduomas puede ser debida a la acción directa de la droga (embriotóxica) o a la estimulación persistente de la hipófisis materna, de acuerdo con los estudios de Rothchild y Mayer (1940).
5. Con la dosis terapéutica aplicada diariamente durante toda la gestación, no se apreciaron alteraciones en los fenotipos de las tres generaciones estudiadas.

LITERATURA

- ANÓNIMO. (1973). The testing of chemicals for carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity. Health and Welfare, Canadá.
- BATEMAN, A. J. (1973). The dominant lethal assay in the mouse. *Agents and actions* 3, 73-76.
- BERNEIS, K., BOLLAG, W., KOFLER, M. y LÜTHY, H. (1965). Sinergism between ionizing radiation and a cytotoxic methylhydrazine derivative: effect on DNA-degradation. *Experientia* 21, 318-320.
- BERNEIS, K., KOFLER, M., BOLLAG, W., KAISER, A. y LANGEMANN, A. (1963). The degradation of deoxyribonucleic acid by new tumour inhibiting compounds: the intermediate formation of hydrogen peroxide. *Experientia* 19, 132-133.
- BOLLAG, W. (1963a). The tumor-inhibitory effects of the methylhydrazine derivative Ro 4-6467/1 (NSC-77213). *Cancer Chemotherapy Rep.* 33, 1-4.
- . (1963b). Suppression of the immunological reaction by methylhydrazines a new class of antitumor agents. *Experientia* 19, 304-305.
- . (1964). Investigations with methylhydrazine derivatives. *Chemotherapy of Cancer*. Pl. A. Plattner. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 191-197.
- BOLLAG, W. y GRUNBERG, E. (1963). Tumour inhibitory effects of a new class of cytotoxic agents, Methylhydrazine derivatives. *Experientia* 19, 130-131.
- BOLLAG, W. y THEISS, E. (1964). Methylhydrazine derivatives. *Chemotherapy of Cancer*. Pl. A. Plattner. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 311-313.
- BROOKES, P. y LAWLEY, P. D. (1962). The methylation of cytosine and cytidine. *J. Chem. Soc.*, 47, 1348-1351.
- BRUNNER, K. W. y YOUNG, C. W. (1965). A Methylhydrazine derivative in Hodgkin's disease and other malignant neoplasms. *Ann. Intern. Med.* 63, 69-86.
- CHAUBE, S. y MURPHY, M. L. (1964). The theratogenic effects of 1-methyl 2-apra (isopropylcarbamoyl) benzilhydrazine HCL (MHI). *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 5, 11.
- ESTÉVEZ, R., ESTÉVEZ, O., CHACÓN, R. D., ARAUJO, C. E., MACHADO, G. G. MORERA, F. (1972). *Quimioterapia antineoplásica*. Edit. Buenos Aires, Argentina, p. 40.

- GOODMAN, L. S. y GILMAN, A. (1965). *The pharmacologic basis of therapeutics*. Mac-Millan, Nueva York. pp. 1345.
- HIDALGO, I. y MONTAÑO, G. (1967). Resultados clínicos de los derivados de la metilhidracina. *Rev. Med. Hosp. Gral.* 30, 349-357.
- KARNOFSKY, D. A. y CLARSON, B. D. (1963). Cellular effects of anticancer drugs. *Ann. Rev. Pharm.* 3, 357.
- KREIS, W. (1970). Metabolism of antineoplastic methylhydrazine derivative in a-P. 815 mouse neoplasm. *Cancer Res.* 30, 82-89.
- KREIS, W. y YEN, W. (1965). An antineoplastic C¹⁴ -labeled methylhydrazine derivative in P815 mouse leukemia. A metabolic study. *Experientia* 21, 284-286.
- KREIS, W., PIEPHO, B. y BERNHARD, H. V. (1966). Studies on the metabolic fate of the C¹⁴ -labeled methyl group of a methylhydrazine derivative in P815 mouse leukemia. *Experientia* 22, 431-433.
- KREIS, W., BURCHENAL, J. H. y HUTCHINSON, D. J. (1968). Influence of a methylhydrazine derivative on the *in vivo* transmethylation of the *s*-methyl group of methionine onto purine and pyrimidine bases of RNA. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 9, 38.
- LOEB, L. (1908). The production of deciduomata and the relation between the ovaries and the formation of the decidua. *J. AM. Med. Ass.* 50, 1897.
- MATHÉ, G., SCHEWEISGUTH, O. y SCHWARZENBERG, L. (1963). Methylhydrazine in the treatment of Hodgkin's disease. *Lancet* 2, 1077-1080.
- MERCIER-PAROT, L. y TUCHMANN-DUPLESSIS, H. (1969). Action embryotoxique et teratogène d'une methylhydrazine chez la souris et le lapin. *Pres. Med.* 77, 446.
- MURPHY, M. L. (1960). Teratogenic effects of tumor-inhibiting chemicals in the foetal rat. *Ciba. Found., Malformations*. Churchill, Londres, pp. 78-114.
- MURPHY, M. L. y CHAUBE, S. (1962). Teratogenic effects of abnormal purines and their ribosides. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 3, 347.
- OLIVERIO, V. T. y KELLY, M. G. (1964). Contributions to the biological and clinical effect of a Methylhydrazine derivative. *Chemotherapy of Cancer*. Pl. A. Plattner. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 221-227.
- QUIROZ, A. G., MONTAÑO, G. I. E HIDALGO, I. N. R. (1968). Observaciones sobre la acción de la metilhidracina en algunos melanomas. II Estudios cromosómicos. *Rev. Med. Hosp. Gral. (Méx.)* 35, 645-651.
- ROTHCHILD, I. y MEYER, R. K. (1940). Maintenance of pregnancy in castrate rats by means of progesterone. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 44, 402-404.
- RUTISHAUSER, A. y BOLLAG, W. (1963). Cytological investigation with a new class of cytotoxic agents. Methylhydrazine derivatives. *Experientia* 19, 131-132.
- SACKS, P., JACOBS, D. LYNCH, S. R. y BOTHWELL, H. (1973). Combination Chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *S. A. Med. J.* 903-907.
- SARTORELLI, A. C. y CREASEY, W. A. (1969). *Cancer Chemotherapy Ann. Rev. Pharm.* 9, 51-72.
- TUCHMANN-DUPLESSIS, M. H. y MERCIER-PEROT, L. (1967). Production chez le rat de malformations oculaires et squelettiques par administration d'une methylhydrazine. *Pres. Med.* 75, 2843.
- WEGMÜLLER, F. (1942). Dissertation Universität Bern. Cit. por Berneis *et al.* (1965).
- WEISS, J. (1944). *Nature* 153. 748. Cit. por Berneis *et al.* (1963).
- WEITZEL, G., SCHNEIDER, F. y FRETZDORFF, A. M. (1964). Cytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. *Experientia* 20, 38-39.
- ZELLER, P., GUTMANN, H. y MÜLLER, M. (1963). Methylhydrazine derivatives, a new class of cytotoxic agents. *Experientia* 19, 129.