

CITOTOXICIDAD IN VITRO DE TRES NUEVAS MOSTAZAS NITROGENADAS SINTETICAS

Ricardo García Cavazos*
Manuel González Diddi**
Ricardo Yáñez Avila***

INTRODUCCION

Los métodos utilizados para evaluar la potencia de los fármacos anticancerosos y tratar de explicar su mecanismo de acción, involucran todas las técnicas modernas de la química y biología.

Uno de los grandes problemas a que se enfrenta la farmacología, es determinar la efectividad de un fármaco, por lo que se han diseñado técnicas en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*⁷ para observar su grado de efectividad, actividad citotóxica, dosis efectiva media, letal media y tóxica.

El arsenal quimioterápico con que se cuenta para el tratamiento de las neoplasias es muy extenso; la razón para continuar el estudio de nuevos productos es que la mayoría de ellos presentan acciones colaterales que lesionan los tejidos normales. Entre los agentes antineoplásicos se encuentran el metrotexate, análogos de las purinas como la 6-mercaptopurina, análogos de la pirimidina como el 5-fluoruracilo y los agentes alquilantes entre los cuales se encuentran las mostazas nitrogenadas como el metil-(bis)-B-cloroetilamino.

Los agentes alquilantes dan efectos de cito-

toxicidad y mutagénesis en un alto grado, debido a su acción sobre los ácidos nucleicos, particularmente sobre el DNA^{1,3,10}

Las mostazas nitrogenadas derivan del llamado gas mostaza o iperita (bis-cloroetil-sulfuro).^{14,15}

En 1935¹⁵ se preparó un compuesto análogo al gas mostaza, substituyendo de la molécula original un grupo sulfuro por un amino, lo que dio lugar al metil-bis-cloroetilamina que se denominó mostaza nitrogenada. Estas fueron administradas por primera vez en 1942, en pacientes con enfermedad de Hoodkin's por Jacobson y más tarde por otros,¹⁸ se demostró que el compuesto era extraordinariamente activo, pero con limitaciones debido a que producía lesiones irreversibles sobre los tejidos lábiles del huésped.² Se ha continuado el estudio de compuestos derivados de las mostazas nitrogenadas que presentan actividad antineoplásica como mecloretamina, clorambucil y ciclofosfamida cuyo uso práctico es ampliamente conocido.

La acción de las mostazas nitrogenadas depende de su funcionalidad química, por lo que se clasifican en monofuncionales y polifuncionales, todas reaccionan con gran número de sustancias celulares.^{11,12,13,17} Las polifuncionales son de mayor actividad por lo que se incluyen en el arsenal quimioterápico, dan efectos similares a los producidos por las radiaciones; por ello se denominan radiomiméticas^{16,21} producen cambios morfológicos y funcionales en las células tanto *in vitro*⁴ como *in vivo*.^{5,23}

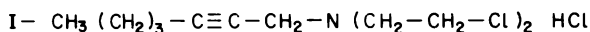
* Departamento de Morfología, Sección de Embriología, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

** Sección de Biología Celular del Departamento de Investigación Científica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional. México, D.F.

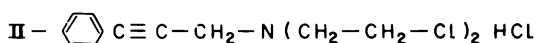
*** Departamento de Farmacología, Sección de Graduados, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

CUADRO I

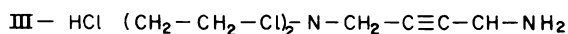
● - FORMULAS DE LAS MOSTAZAS NITROGENADAS



CLORHIDRATO DEL 7 [BIS (2'-CLOROETIL)-AMINO]-5-HEPTINO



CLORHIDRATO DEL 3 [BIS (2'-CLOROETIL)-AMINO]-1-FENIL-1-PROPINO



CLORHIDRATO DEL 4 [BIS (2'-CLOROETIL)-AMINO]-1-AMINO-1-CICLO-

HEXIL-3-BUTINO

Dada la gran variedad de efectos tóxicos producidos por las mostazas nitrogenadas y su gran efectividad antitumoral, el Departamento de Bioquímica y Biofísica de la E.S.M., en colaboración con el Departamento de Investigaciones de Química Orgánica de la E.S.I.Q.I.E., han diseñado y sintetizado nuevas sustancias con probable actividad antineoplásica; el propósito fundamental de este trabajo es lograr un método que permita evaluar rápidamente la citotoxicidad de los nuevos fármacos que se sintetizan y contribuir a conocer su eficacia terapéutica.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

Para este trabajo se utilizaron 2 líneas celulares, una de origen murino, obtenida de tejido areolar laxo por Stanford K.K., y Earle, W.C. en 1948, línea de fibroblastos denominada L 929*²² certificado por la *American Type Tissue Collection*, y la otra de un carcinoma laríngeo humano de tipo epitelial, denominado Hep-2*.

Mostazas nitrogenadas

Fueron utilizadas tres mostazas nitrogena-

das sintéticas polifuncionales cuyos nombres y fórmulas aparecen en el cuadro I.

Técnica utilizada

Cada una de las líneas celulares se cultivó en 52 tubos Leighton de los cuales sólo 14 poseían laminilla de cultivo de tejidos. Se sembraron 6×10^4 células/ml., suspendidas en medio basal de Eagle al que se le agregó 10% de suero de ternera y 100 UI de penicilina. Posteriormente los cultivos fueron incubados a $37^\circ\text{C} \pm 10^\circ$, mantenidos en atmósfera con 95% de aire y 5% de CO_2 para conservar un pH de 7.2; en estas condiciones las células permanecieron durante 24 horas.

Se contaron las células de 4 tubos Leighton sin laminilla tomados al azar del grupo general y se determinó el número de células promedio en cada tubo al iniciar el experimento. La cuenta de células se efectuó en un contador de partículas (Coulter Counter, Modelo B) Hialeah, Flo.

Se prepararon soluciones de las sustancias a probar en concentraciones de 50, 20, 10, 5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de medio; después esta preparación se efectuó al momento en que se iban a agregar a las células en cultivo.

Al resto de los cultivos del grupo general se les cambió el medio y se les agregó a cada uno un mililitro de medio que contenía cada una

* En el momento del experimento se efectuaba el subcultivo No. 15 de ambas líneas.

de las concentraciones antes mencionadas, incluyéndose 4 tubos por cada dosis y 4 más con laminilla, en total 24 tubos; se incubaron por 72 horas en las condiciones antes descritas.

A las 72 horas después de haber añadido las soluciones se efectuaron los siguientes estudios:

- Cuenta de células en el Coulter Counter.
- Prueba de viabilidad celular o prueba de exclusión utilizando los tubos con laminilla.
- Fijación en metanol del resto de tubos con laminilla, tinción con Giemsa para determinar índice mitótico y cambios morfológicos en las células.
- Se siguieron estudios estadísticos de los resultados anteriores para determinar promedio y desviación estándar.

RESULTADOS

Los resultados de los experimentos realizados se resumen en las gráficas 1 y 2. La primera muestra los efectos de las 3 mostazas nitrogenadas sobre las células L-929 y la segunda el efecto de estas mismas sustancias sobre las células Hep-2. Ambas gráficas están expresadas en porcentajes de crecimiento con respecto a su testigo (que corresponde al 100%) que sólo contenía el vehículo.

Los resultados numéricos fueron analizados

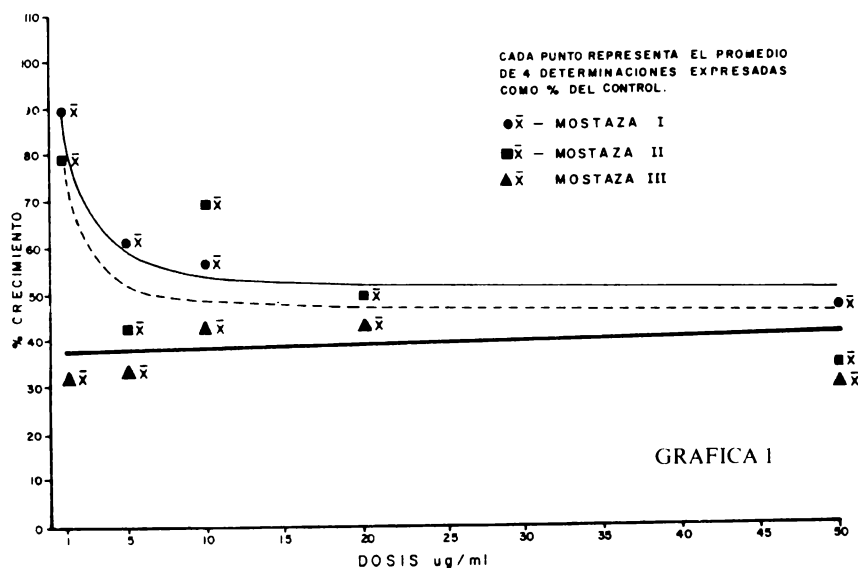
para observar la relación y correlación lineal del % de crecimiento con el inverso de la dosis. En el caso de la línea celular L-929 (gráfica 1), la correlación fue de $p < 0.01$ para las mostazas I y II que presentan una $r=0.77$ y 0.57 respectivamente. En esta gráfica se puede observar que para la mostaza nitrogenada I la DE_{50} se encuentra por encima de $50 \mu\text{g/ml}$ y en la II la DE_{50} está colocada entre 5 y $10 \mu\text{g/ml}$.

En el caso de la mostaza III esta correlación fue de $r=0.22$ no significativa, por lo que en este caso se usó un análisis de varianza para demostrar que el efecto fue el mismo para cualquiera de las dosis probadas de esta mostaza. El modelo para la gráfica surge a partir de la dosis de $1 \mu\text{g}$ y nos da una recta paralela al eje de las abscisas, con ordenada de 37.18. Se muestra así una inhibición del crecimiento de 62.82%.

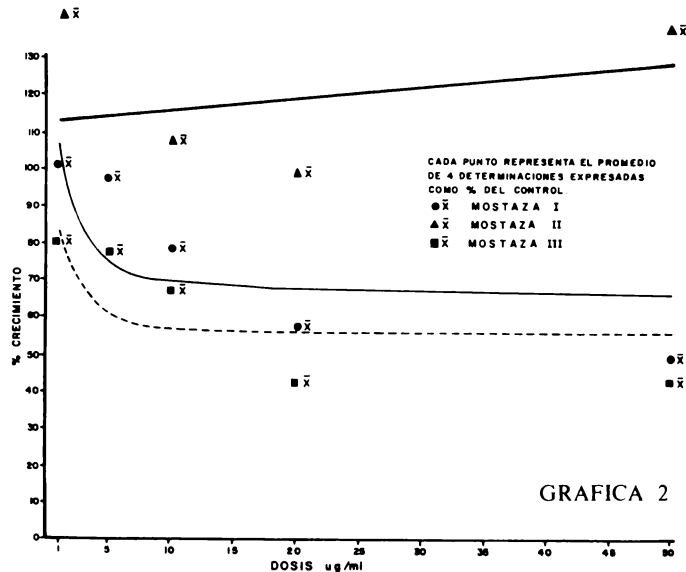
Por otra parte, en las células de carcinoma laríngeo (gráfica 2) se encontró que la correlación lineal del % de crecimiento con el inverso de la dosis fue de $p < 0.01$ para las mostazas I y II con una $r=0.58$ y $r=0.63$ respectivamente.

A su vez las mostazas I y III mostraron actividad inhibitoria del orden de 30 y 45% respectivamente. La correlación no fue buena pa-

EFFECTO DE DIVERSAS MOSTAZAS NITROGENADAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE CELULAS L-929 EN CULTIVO DE TEJIDOS



EFECTO DE DIVERSAS MOSTAZAS NITROGENADAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE CELULAS HEP 2 EN CULTIVO DE TEJIDOS



ra la mostaza II $r = 0.29$ por lo que se efectuó un análisis de varianza con los datos de porcentaje de crecimiento y se obtuvo un promedio de 117.99 con una D.E. de 45.37.

El modelo de graficación surge de la dosis de 1 μg que da una recta paralela al eje de las abscisas con ordenadas de 117.99 y no muestra actividad inhibitoria sobre el crecimiento de estas células, sino un aumento del número de ellas por encima del testigo.

En estas células (Hep-2) en especial con las dosis estudiadas no se encontró la D.E. 50.

Se analizó la frecuencia de poliploidías y de mitosis, en ambas cepas y con las tres mostazas nitrogenadas, los resultados se expresan en la gráfica 3 para las células L-929 y en la 4 para las células Hep-2, dentro de las cuales el primer grupo de columnas corresponde al testigo o control de cada una de las dosis estudiadas; en la línea de las ordenadas se muestra el % de presentación del fenómeno (mitosis o poliploidía) y en la línea de las abscisas la concentración de cada una de las mostazas expresadas en $\mu\text{g/ml}$.

En la gráfica 3, observamos que la mitosis

en el grupo testigo está englobada entre 0.8 a 1.9% mientras las poliploidías en el rango de 0.8 a 0.9%. Con la mostaza I en dosis de 1 μg , se observa una frecuencia menor de mitosis y una frecuencia mayor de poliploidías, mientras que con la II los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de los testigos. Con la mostaza III a la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$, se encuentra disminución de la mitosis y discreta disminución de la poliploidía, con las mostazas I y II, a la dosis de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$, se observa incremento importante en la poliploidía en tanto que con mostaza III las cifras obtenidas se encuentran dentro del rango de los testigos. Analizando las mitosis con estas mismas dosis se observa su disminución en las tres mostazas. Con 50 μg , sólo la mostaza nitrogenada III mostró disminución absoluta de mitosis y poliploidía.

En la gráfica 4 se expresan los resultados en forma similar a la gráfica 3 y el rango de mitosis y poliploidía en esta cepa está entre 0.3 a 1.1% para las mitosis y de 1.3 a 7.0% para las poliploidías. Con las dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ sólo se obtiene disminución discreta de la poliploidía con la mostaza III, no así con las mostazas I

y II que quedaron dentro de los resultados del testigo.

A dosis de 5 y 10 $\mu\text{g/ml.}$, sólo con las mostazas I y II aumenta el número de poliploidías; el índice mitótico se inhibe discretamente con la mostaza II, lo que no ocurre con la I y III.

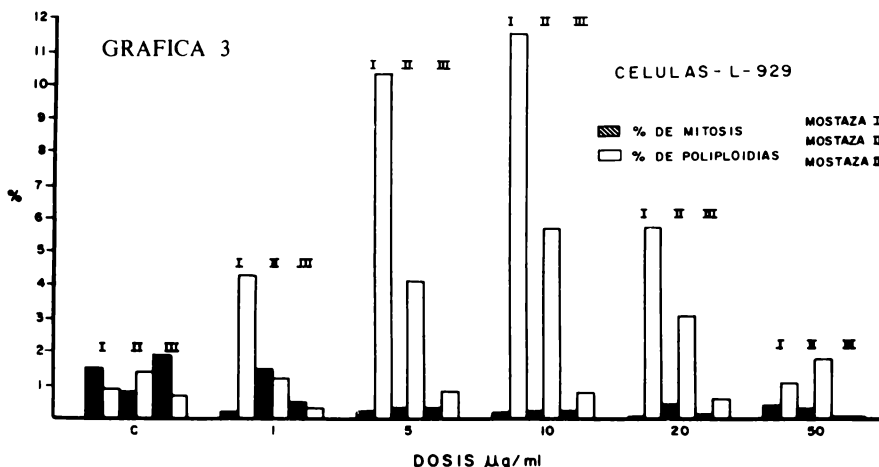
Con dosis de 20 y 50 $\mu\text{g.}$, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de poliploidías con respecto a sus grupos testigo; sin embargo, las mitosis se inhiben con 20 μg con las mostazas II y III, en tanto que con 50 $\mu\text{g.}$, la disminución se observa en todas las mostazas probadas. Los datos numéricos de estas gráficas están expresados en el cuadro II.

DISCUSION

Nuestra discusión analiza los resultados obtenidos para cada una de las mostazas en las dos líneas celulares estudiadas. Cabe mencionar en principio que no se encontró correlación de citotoxicidad entre las mostazas estudiadas y las dos líneas celulares, lo que concuerda con los trabajos de Eagle y colaboradores^{3, 6, 19} según los cuales hay diferencias en la actividad citotóxica de diversos fármacos sobre las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, es un hecho observado por casi todos

los investigadores, que aun cuando existan diferencias de grado no hay diferencias esenciales en la actividad citotóxica de los fármacos. Es posible que un fármaco tenga mayor actividad citotóxica que otro, pero en general cuando la molécula estudiada la tiene, ésta se demuestra con los sistemas *in vivo*.⁷ Hecha esta aclaración, cabe mencionar que con la línea L-929 las tres drogas probadas mostraron actividad citotóxica arriba de la dosis efectiva 50 cuyo índice demostrado por Eagle y col., es de gran importancia para desechar o incorporar al análisis farmacológico posterior los diversos compuestos probados. De estas tres, la que más efectividad presentó fue la mostaza nitrogenada III en la línea L-929, cuya dosis efectiva 50 se encontró por debajo de la dosis probada ya que la dosis mínima que nosotros utilizamos (1 μg) produjo un 62% de inhibición de crecimiento. Es importante mencionar que con las cinco dosis estudiadas el nivel de inhibición fue similar, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.*

Lo anterior significa que estamos en presencia de un fenómeno de actividad del tipo "todo o nada", ya que era de esperarse que de haber una relación proporcional, a mayor dosis obtendríamos mayor inhibición, fenómeno que

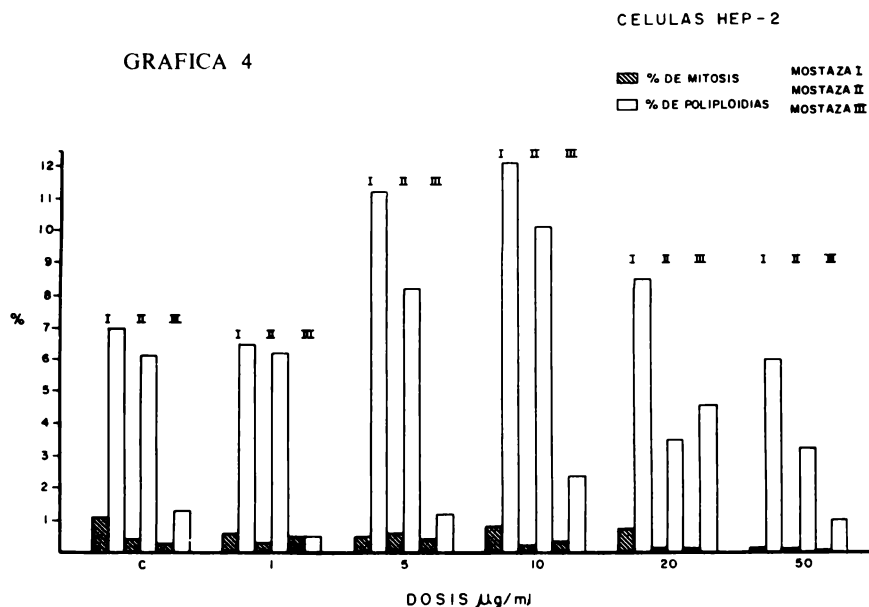


* El análisis estadístico efectuado fue de varianza de un solo factor, con F encontrada a 1.58 con grados de libertad 4/15; la F esperada para niveles significantes para el nivel de 0.05 fue de 2.79.

no se encontró con esta mostaza. Con la mostaza I la dosis efectiva 50 no se logró con $50 \mu\text{g/ml}$, por lo que suponemos que dicha dosis se encuentra por arriba de $50 \mu\text{g}$. La experiencia en cultivo de tejidos para el estudio de drogas citotóxicas ha demostrado que cuando la dosis efectiva 50 es mayor de $50 \mu\text{g}$ por ml no debe continuarse un estudio farmacológico profundo.

citotóxicos es la endorreduplicación del material genético o la fusión de varias células para formar células multinucleares.⁹

Con la mostaza nitrogenada I y II apareció actividad citotóxica pero en menor grado que la observada en las células L-929; esto refuerza la hipótesis previamente mencionada, ya que sabemos que existen diferentes respuestas citotóxicas en las diversas estirpes celulares,²⁰



En la mostaza nitrogenada II se encontró que la dosis efectiva 50 está englobada dentro de los 5 y $10 \mu\text{g}$, por lo cual ésta y la mostaza III serían las adecuadas para continuar el estudio farmacológico con pruebas de toxicidad y de efectividad *in vivo*. Con las células Hep-2 la mostaza nitrogenada II no mostró actividad inhibitoria sobre el crecimiento, sin embargo existen datos indirectos que sugieren la existencia de cierto grado de toxicidad, como es el incremento de la poliploidía observada con ésta en las diversas dosis estudiadas, fundamentalmente entre 5 y $10 \mu\text{g}$. Por trabajos de algunos investigadores es bien sabido que uno de los mecanismos celulares de defensa contra

hecho conocido dentro de la quimioterapia de los tumores,^{3,6} Sin embargo, observando la gráfica 2 se puede justificar el estudio más profundo de las mostazas nitrogenadas I y III por la actividad revelada. En base a este estudio, y al observar los resultados en conjunto, en ambas líneas celulares, notamos que las tres mostazas nitrogenadas tienen actividad citotóxica en mayor o menor grado; sin embargo, se sugiere que la mostaza nitrogenada III podría ser más efectiva en tumores derivados del mesénquima y probablemente tendrá poca eficiencia en las de estirpe epitelial. Por otra parte la mostaza II probablemente no tendrá efecto sobre células tumorales epiteliales.

CUADRO II

PORCENTAJES DE MITOSIS Y POLIPLOIDIAS EN LAS DOS LINEAS CELULARES
BAJO LA ACCION DE LAS TRES MOSTAZAS NITROGENADAS

Dosis ug/ml	L-929						HEP-2						
	% de Mitosis			% de Poliploidias			% de Mitosis			% de Poliploidias			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
Control	1.5	.8	1.9	.9	1.4	.7	Control	1.1	.4	.3	7.0	6.2	1.3
1	.2	1.5	.5	4.3	1.2	.3	1	.6	.3	.5	6.5	6.2	.5
5	.2	.3	.3	10.3	4.1	.8	5	.5	.6	.4	11.2	8.2	1.2
10	.2	.2	.2	11.5	5.7	.8	10	.8	.2	.3	12.1	10.1	2.4
20	0	.4	.1	5.7	3.1	.6	20	.7	.1	.1	8.5	3.5	4.6
50	.4	.3	0	1.1	1.8	0	50	.1	.05	0	6.0	3.2	11.0

CONCLUSIONES

Las tres mostazas nitrogenadas estudiadas muestran actividad citotóxica de mayor o menor grado sobre ambas líneas celulares. Las mostazas II y III demostraron su actividad en la inhibición del crecimiento en la línea celular L-929 mientras la I lo demuestra además con la presencia de mayor cantidad de poliploidía.

Lo anterior permite que las tres drogas experimentadas pasen a un estudio farmacológico más profundo de toxicidad aguda y eficacia anti-tumoral en animales.

Se sugiere que las mostazas nitrogenadas I, II y III pueden ser efectivas en el tratamiento de tumores de origen mesenquimatoso y menos eficaz en los de origen epitelial (mostazas I y III). Probablemente la mostaza II no tenga efecto sobre este tipo de tumores; esto se deduce de los resultados de la actividad de las mostazas sobre la línea Hep-2 (epitelioide).

La dosis DE₅₀ de la mostaza III sobre fibroblastos L-929 puede ser efectiva en el tratamiento de tumores de origen mesenquimatoso aunque menos eficaz en tumores de origen epitelial.

Dado que la DE₅₀ en fibroblastos L-929 para la mostaza III fue de menos de 1 µg/ml; para la mostaza II, mayor de 5 y menor de 10 y para la mostaza I más de 50 µg, por ml; esta última podría mostrar poca actividad citotóxica *in vivo*.

RESUMEN

Tres mostazas nitrogenadas sintéticas¹⁹ cuyos nombres químicos son clorohidrato de 7-bis-(2 cloroetil)-amino 5-heptino, clorohidrato del 3-bis-(2 cloroetil)-amino-1- fenil 1-propino y clorohidrato del 4 bis-(2-cloroetil-amino)-1-ciclohexil-3-butino respectivamente, han sido sometidas a experimentación antitumoral.

Usando el cultivo de tejidos como método inicial para establecer la actividad citotóxica en dos líneas celulares, una fibroblástica de origen murino y otra epitelial de origen humano, se observó que las tres drogas presentan actividad citotóxica revelada por inhibición del crecimiento o por incremento de la poliploidía.

Se sugiere que estas mostazas nitrogenadas pueden ser eficaces en el tratamiento de tumores de origen mesenquimatoso y menos en los de origen epitelial.

Los resultados de este trabajo aconsejan someter a las tres mostazas a estudio farmacológico más profundo para determinar su toxicidad aguda y eficacia antitumoral en animales.

SUMMARY

Three synthetic nitrogenated mustards, whose chemical names are 7-bis-(2-chlorethyl)-amine 5-heptine hydrochloride, 3-bis-(2-chlorethyl)-amine-1-phenyl 1-propine hydrochloride and 4-bis-(2-chlorethyl-amine)-1-cyclo-

hexyle-3-butine hydrochloride, respectively have been subjected to antitumoral experimentation.

Using tissue cultures as an initial method to establish the cytotoxic activity in two cellular lines, one fibroblastic of murine origin and the other epithelial of human origin it was observed that the three present cytotoxic activity shown by growth inhibition or by poly-

ploidic increment.

It is suggested that these nitrogenated mustards could be useful in the treatment of mesenchymatous origin tumors and less in those of epithelial origin.

The results of this work, advises us to submit the three mustards to a more through pharmacological study to determine its acute toxicity and antitumoral activity in animals.

BIBLIOGRAFIA

1. Auerbach y Robson: "Chemical Production of Mutations", *Nature*, Vol. 157, 302, 1946.
2. Bizzozero, G.: "Growth and Regenerations and the Organism", *Brit. Med. J.* Vol. 1: 728, citado por Pérez Tamayo en "Mechanisms of Disease and introduction of Pathology", W. B. Saunders, Co. Philadelphia, 1961. (ref. No. 20).
3. Eagle, H. Foley, E.G.: "The Citotoxic Action of Carcinolyt Agents in Tissue Culture", *Am. J. Med.* 21: 739, 749, 1956.
4. Brookes, P. y Lawley, P.D. "The Reaction of Mono and Di-Functional Alkylating Agents with Nucleic Acids", *Biochem J.* Vol. 80: 496, 503, 1961.
5. Elson, A.L.: "Hematological effects of the alkylating agents", *Ann. New York, Academ. Scie.* 68: 826-833 1958.
6. Foley, G.E., y Epstein, S.S.: "Cell culture and Cancer Chemotherapy", Reprinted from *Advances in Chemotherapy*. Academy Press Inc. N.Y. Vol. 1, 1964.
7. Golder, H.R., Martín Guzmán, G. Jones, J. "Experimental Chemoteraphy Studies, III Properties of DNA from Ascitis Cell Treated *in vitro* with Nitrogen Mustard" *Cancer Research*, Vol. 24: 964-968, July 1964.
8. González Diddi, M. Trujillo, J. M. Drewinko, B. "Viabilidad de células inmuno-competentes en cultivo de tejidos, después de tripsinización", *Boletín de la Asociación Mexicana de Patólogos, A.C.* Vol. VII No. 2 pp. 113, 120, 1969.
9. Harris, M.: "Cell culture and Somatic Variations in Chromosome and resistance to agents extrinsic variation of patterns", *Hohl. Reinschart and Winston*, cap 4 pp. 200-228, y Cap. 6. pp. 306-354, 1964.
10. Harriot, R.M.: "Inactivation of virus and cell by mustard gas", *J. Gen. Physiol.* 32: 22, 1948.
11. Killer, C.P.: "Comparative effects of Alkylating Agents on Cellular Morphology", *Ann. New York, Academ. Scie.* Vol. 68: 783, 799, 1958.
12. Lawder, P.D. y Brooker, P.: "Further Studies on the Alkylation of Nucleic Acids and their constituent nucleotids", *Biochem. J.* Vol. 89: 127-138, 1963.
13. Loveless, A. y Revell Stanley: "New evidence on the mode of action of mitotic poisons", *Nature*, Vol. 164: 938-944, Dic. 1949.
14. Norman, E.J. "Lung Cancer Mortality in World War Veterans with Mustard gas injury". *J. of the Natl. Cancer Institute*, Vol. 54 No. 2, Feb. 1975.
15. Philips, F.S. "Recent Contribution to the Pharmacology of Bis (2-haloethyl) amino and Sulfides", *Pharmacology. Rev.* Vol. 2: pp. 283, 1950.
16. Powers, L.E., Pemero, H.J.: "Comparisons of the Biological effects of ionizing radiations and certain alkylating Agents in cell system", *Ann New York, Academ. Scie.* Vol. 68, pp. 702-720, 1958.
17. Price, Ch.: "Fundamental Mechanism of Alkylation", *Ann New York, Academ. Scie.* Vol. 68: pp. 663-668, 1958.
18. Rhoods, C.P. "Nitrogen mustard in the treatment of neoplastic disease", *J. Amar. Med. Ass.* Vol. 131: 656, 1946.
19. Saldaña, S.E.I. y Yáñez A.R.: "Síntesis de nuevas mostazas nitrogenadas con probable actividad anti-neoplásica", Comunicación al VI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, México, D.F. 1973.
20. Schurmans, D.M., Duncan, D.T. and Olson, B.H.: *Cancer Research*, 21, 773, 1961. "Diferencias en la respuesta de varias líneas celulares, *in vitro*" citado por Foley G.E. "Cell culture and Cancer Chemotherapy", Reprinted from *Advances in Chemotherapy*. Vol. I, 1964.
21. Stacey, A.K., Cobb, M., Coussen, F.S. y Alexander P. "The reactions of the radiomimética Alkylating agents with macromoleculas *in vitro*", *Ann New York Academ. Scie.* Vol. 68: 682-701, 1958.
22. Stanford, K.K., y Earle, W.R.J.: *National Cancer Institute*, p. 229, 1948.
23. Starnberg, S., Philips, S.F., Scholler, J. "Pharmacological and Pathological effects of alkylating agents", *Ann. New York Academ. Scie.* Vol. 68: 881-885, 1958.
24. Stock, J.A.: "Chemoteraphy of Cancer", *Chemical Britain*, 6: 11-16, 1970.