

## PREVENCIÓN DE LA PANCREATITIS EXPERIMENTAL CON ACIDO L-AMINOCICLOPENTANO CARBOXILICO<sup>1</sup>

MARIO ALVIZOURI<sup>2</sup>

Este estudio se basa en la hipótesis de que cuando se inhibe la formación de gránulos zimogénicos, el páncreas no puede producir enzimas y por lo tanto no se pueden desarrollar los fenómenos líticos de la pancreatitis. El ACPC con una sola dosis es capaz de inducir degranulación y atrofia de la célula acinar pancreática en la rata, cambios que aparecen en el curso del 1º al 6º día y se prolongan durante más o menos 30 días según la dosis administrada.

El ACPC en la prevención de la pancreatitis de la rata, a dosis de 400 mg/kg, aplicados 24 y 48 horas antes de instituir pancreatitis dio resultados satisfactorios. El mejor resultado se obtuvo con la dosis de 200 mg/kg aplicada seis días antes de inducir pancreatitis. El ACPC fracasó como tratamiento curativo en la pancreatitis de la rata. En el perro no indujo cambios anatómicos ni dio protección alguna en la pancreatitis. Esta substancia no produjo lesiones de los islotes de Langerhans. (GAC. MÉD. MÉX. 100: 184, 1970).

**E**N VARIOS trabajos previos<sup>1, 2, 3</sup> hemos expuesto nuestra hipótesis acerca de la posibilidad de interferir en el proceso pancreático, la cual se puede resumir en los siguientes conceptos:

Considerando que el proceso pancreático tiene como sustrato fisiopatológico la actividad de las enzimas pancreáticas, principalmente el grupo

de las proteolíticas y la lipasa, teóricamente, si el páncreas no tuviera estas enzimas, la hemorragia y la inflamación de este órgano no pasarían de tener simplemente un efecto local, como ocurre en los demás tejidos. En consecuencia, el proceso pancreático no se acompañaría de esteatonecrosis ni de necrosis acinar.

Partiendo de este punto de vista, se podría prevenir o inhibir el proceso pancreático en varias de las etapas de la producción enzimática del páncreas.

<sup>1</sup> Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 30 de julio de 1969.

<sup>2</sup> Académico correspondiente. Hospital Civil, Morelia.

La primera etapa consistiría en impedir la producción de las hormonas estimulantes de la secreción pancreática (secretina, pancreozimina) o bien en inhibir su acción. Hasta el momento, salvo las medidas dietéticas que se recomiendan, como el ayuno, la succión gástrica y otras, no hay ninguna otra forma que sea eficiente para inducir este efecto.

El segundo punto de ataque al proceso pancreático sería impedir la producción de enzimas pancreáticas y el tercero sería la inhibición de estas enzimas.

Con respecto al tercer sitio de ataque al proceso pancreático, gran cantidad de autores han utilizado un inhibidor de tripsina y calicreína (Trasylol®) en el tratamiento de la pancreatitis clínica y experimental con resultados altamente contradictorios. En nuestra experiencia,<sup>4</sup> después de utilizar esta sustancia a dosis masivas en la prevención y tratamiento de la pancreatitis experimental del perro y de la rata los resultados han sido negativos.

El punto más interesante y objeto de este informe es el segundo punto de ataque o sea tratar de evitar la producción enzimática de la célula acinar pancreática.

Es conocido que los gránulos zimogénicos juegan papel primordial en la elaboración de las enzimas, por lo que es de esperarse que aquellas drogas que provoquen disminución o desaparición de dichos gránulos sean capaces de disminuir en forma importante la secreción enzimática. Esta hipótesis fue probada por nosotros en un trabajo previo<sup>3</sup>

publicado en 1967 en el cual mediante la utilización de la d-l etionina fue posible evitar los fenómenos líticos de la pancreatitis induciendo previamente diversos grados de atrofia acinar pancreática. Esta sustancia tiene el inconveniente de ser muy tóxica.

La sustancia denominada ácido-1-aminociclopentano carboxílico (ACPC) es un aminoácido alicíclico simple que fue sintetizado desde 1912 por Zelinskii y Stadnikou.<sup>5</sup> En 1964 Dunnigan y cols.,<sup>6</sup> reportaron por primera vez la acción del ACPC sobre el páncreas de la rata, consistente en degranulación, disminución del RNA, atrofia acinar y pérdida de la actividad proteolítica.

En 1968, Chenard y Auger,<sup>7</sup> en estudios de microscopía electrónica demostraron en ratas que 24, 36 y 72 horas después de recibir una dosis de ACPC de 375 mg/Kg de peso corporal presentaban cambios en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi y en los gránulos citoplásmicos, quedando las células acinares casi sin gránulos, fenómenos que fueron interpretados por dichos autores como un "defecto en la primera parte de los eventos de la síntesis proteica del citoplasma". Otros autores han informado resultados similares.<sup>6, 12, 13, 14</sup>

Ante esta serie de hechos, se pensó que consecuentemente, esta sustancia debería inhibir la producción de enzimas pancreáticas y por lo tanto ser capaz de inhibir el proceso pancreático.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Para estos experimentos se utilizaron ratas y perros.

**Ratas.** Se utilizó un total de 190 ratas adultas, de ambos sexos, con peso variable de 210 a 320 g las que fueron divididas en tres grupos, en los que se hicieron los siguientes estudios:

Grupo I. Efecto del ACPC en el parénquima pancreático, sin inducción de pancreatitis.

Se subdividió en tres partes: I-A. Constituida por 28 ratas que recibieron ACPC en dosis única intraperitoneal de 400 mg/Kg. I-B. Diez ratas con dosis de 300 mg/Kg. I-C. Diecisiete ratas que recibieron dosis intraperitoneal de 200 mg/Kg. Las ratas de I-A y I-B fueron sacrificadas a diversos intervalos hasta el 60º día, mientras que las I-C fueron sacrificadas en los mismos intervalos hasta el 30º día.

Grupo II. Tratamiento preventivo de la pancreatitis con ACPC (48 ratas).

Se subdividió en tres grupos: II-A, con dosis de 400 mg/Kg (18 ratas). II-B, 8 ratas con dosis de 300 mg/Kg y II-C con dosis de 200 mg/Kg (22 ratas). El ACPC fue aplicado en dosis única intraperitoneal 12, 24 y 48 horas antes de la inducción de pancreatitis, con excepción del grupo de 200 mg en el cual la droga se administró 6 días antes de dicha inducción.

Grupo III. El ACPC en el tratamiento curativo de la pancreatitis, 8 ratas. El ACPC fue inyectado por vía peritoneal *inmediatamente después* de la inducción de pancreatitis a dosis única de 400 mg/Kg.

En todos los experimentos el ACPC se diluyó en agua destilada, conteniendo 20 mg/ml.

Grupo IV. Testigo. Los animales

en número de 75 no recibieron ACPC, sólo se les indujo pancreatitis.

La pancreatitis en la rata se indujo mediante laparotomía, punción del duodeno, canalización del conducto colédoco, en el cual desembocan los conductillos pancreáticos. El colédoco se pinzó temporalmente para evitar que la substancia utilizada pasara al hígado y a continuación se instiló solución de taurocolato de sodio al 2% y azul de metilo al 0.5% en agua destilada, en volumen de 0.1 ml/100 g de peso corporal. El azul de metilo sirve para observar la distribución de la solución instilada, pero por sí mismo, en nuestra experiencia, no induce pancreatitis.

**Perros.** Se utilizaron 7 perros de ambos sexos con peso de 8 a 15 Kg, a los que se administró ACPC por vía endovenosa a dosis única de 400 mg/Kg en 250 ml de suero fisiológico y 72 horas después se les indujo pancreatitis. Durante el proceso quirúrgico, antes de inducir pancreatitis, se tomó una biopsia del proceso uncinado del páncreas. Los perros que no murieron fueron sacrificados al quinto día de inducida la pancreatitis.

La pancreatitis en el perro fue inducida mediante laparotomía, duodenotomía, canalización del conducto pancreático e instilación de taurocolato de sodio al 5% y azul de metilo al 0.5% en agua destilada. El volumen instilado fue de 1 ml/Kg a presión constante de 100 ml de agua.

Para juzgar el efecto del ACPC sobre la pancreatitis tanto en la rata como en el perro se utilizaron como parámetros la supervivencia, el grado de estea-

tonecrosis, el grado de necrosis acinar y la ascitis. A la defunción se hizo autopsia y estudio histológico del páncreas, tiñéndolo con hematoxilina y eosina y para observar gránulos zimogénicos se utilizó el método tricrómico

de Mallory, modificado con Churg y Prado.

## RESULTADOS

*Ratas.* Según se puede ver en la tabla 1, correspondiente al grupo I, con

TABLA 1

## GRUPO I. EFECTO DEL ACPC EN EL PANCREAS DE LA RATA

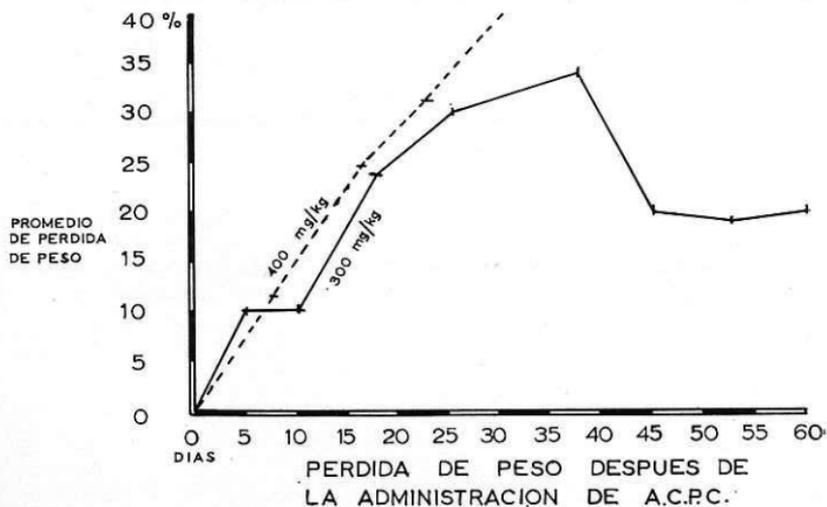
Tiempo	Dosis mg/Kg	Degranulación	Retrac. celular
24 hs.	400	+ a ++	++
	300	+	+
	200		
48 hs.	400	+++ a +++++	+ a ++
	300	++	++
	200		
72 hs.	400	++++	++
	300	0 a +++	0 a +++
	200		
4º día	400	++++	+++
	300	+++ a +++++	+++.
	200		
6º día	400	++++	+++
	300	+++ a +++++	++++
	200	++++	
8º día	400	++++	---
	300	++++	---
	200	++++	+++
10º día	400	++++	---
	300	++++	---
	200	----	---
15º día	400	----	---
	300	++++	---
	200	----	---
20º día	400	----	---
	300	++++	---
	200	----	---
30º día	400	++++	---
	300	++++	---
	200	Normal	---
60º día	400	Normal	---
	300	Normal	---
	200	Normal	---

las tres dosis utilizadas se alcanzó, a partir del cuarto día el mismo grado de degranulación acinar (+++), variando en la velocidad de aparición y de recuperación de acuerdo con la dosis. Mientras más alta fue la dosis, la degranulación acinar apareció más rápido, ya que con 400 mg/Kg, la degranulación era intensa (++++) a las 48 horas, mientras que con la dosis de 200 mg/Kg la degranulación intensa (++++) se hizo manifiesta hasta el cuarto día.

La duración de la lesión fue también variable, de acuerdo con la dosis, puesto que con 400 y 300 mg/Kg se mantuvo con intensidad de ++++ en animales observados al 30º día, los que mostraron recuperación hasta el 60º día. Con la dosis de 200 mg la recuperación del páncreas se observó en animales sacrificados en el 30º día.

A juzgar por el estado general de los animales el ACPC tiene una acción bastante tóxica en relación directa a la dosis utilizada. Con dosis de 400 mg/Kg las ratas a partir de las 24 hs mostraron depresión intensa, pérdida del apetito y gran pérdida de peso, según se puede observar en la figura única, pérdida que alcanzó en promedio 12% a los 7 días, 24% a los 17 y hasta de 40% a los 30 días. Con dosis de 300 mg la pérdida de peso fue prácticamente la misma, sólo que el estado general y el apetito se mantuvieron en mucho mejor condición. Con la dosis de 200 mg el estado general mostró poca alteración aunque el peso se registró sólo durante la primera semana, durante la cual la pérdida media fue de 6.6%.

La mortalidad no se pudo estudiar con estos experimentos, ya que los ani-



males fueron sacrificados a intervalos cortos. Sin embargo, en el grupo de 400 mg formado por 28 animales, hubo 9 que murieron por posible efecto de la droga entre el 6º y 30º día, mientras que con las otras dosis no hubo muerte, aparte de los animales que fueron sacrificados.

En el grupo de las ratas que recibieron ACPC ninguna presentó lesiones de los islotes de Langerhans.

Grupo II. Tratamiento preventivo de la pancreatitis.

Como se puede observar en la tabla 2, la diferencia entre los animales del grupo II y los testigos sin tratamiento con ACPC fue muy notable, tanto en mortalidad como en esteatonecrosis, necrosis acinar, y presencia de ascitis. En los controles la mortalidad en las primeras 48 horas después de inducida la pancreatitis fue de 22 en 75 animales (30%) mientras que en los experimentales fue nula en los grupos de 400 mg/Kg y de 300 mg/Kg.

En el grupo de 200 mg/Kg, en las ratas en que el período de prevención fue de 12 y 48 horas, de 13 ratas murieron tres en el curso de las primeras 24 horas después de inducida la pancreatitis mostrando esteatonecrosis ++ lo cual indica que esta dosis aplicada seis días antes de inducir pancreatitis, la protección fue prácticamente completa, ya que de nueve ratas en que se indujo pancreatitis seis no tuvieron absolutamente ningún signo de esteatonecrosis y tres mostraron apenas huellas que consistían en la presencia de 2 a 4 puntillos de esteatonecrosis peritoneal, tan pequeños que se

prestaban a duda. Por otra parte el estado general de estos animales fue muy bueno, prácticamente normal.

El grupo de ratas que recibió 200 mg/Kg con anticipación de seis días a la inducción de pancreatitis fue el que tuvo en forma definitiva mayor protección que ningún otro en contra de los fenómenos líticos de la pancreatitis.

Estos grupos de animales permitieron establecer una buena correlación entre el grado de degranulación acinar y el desarrollo de esteatonecrosis como manifestación de pancreatitis, a mayor degranulación menor grado de esteatonecrosis. En los testigos sin ACPC en los cuales no hubo degranulación acinar la esteatonecrosis fue de +++ a ++++, mientras que en los animales con degranulación acinar intensa la esteatonecrosis fue nula o si acaso hubo huellas (+).

El edema y el infiltrado inflamatorio fueron comparativamente iguales en los animales experimentales y en los controles.

La ascitis en los testigos sin ACPC (Grupo IV) apareció en todos los casos en volumen variable de 3 a 9 ml, en tanto que en el grupo II, de tratamiento preventivo, no había ascitis más que en aquellos animales que murieron en las primeras 24 horas y que presentaron signos histológicos y macroscópicos de pancreatitis, pertenecientes a la dosis de 200 mg aplicada a 12 y 48 horas antes de la inducción.

Grupo III. Tratamiento curativo.

De ocho ratas utilizadas, tres murieron en el curso de las primeras 24 hs y las restantes, que se encontraban en

GRUPO II. TRATAMIENTO PREVENTIVO DE LA PANCREATITIS

ACPC Dosis mg/Kg	No. de ratas	Tpo. de Ad. del ACPC previo a pancreatitis	Defun. desp. de panc.	Sacrif. 48 hs.	Ascitis	Esteato- necrosis	Necrosis acinar
II-A 400 mg	8	48	0	8	0 ml	0 a +	+ a ++
400 mg	10	24	0	10	0 ml	0 a ++	+ a ++
II-B 300 mg	8	48	0	8	0 ml	+ + a + + +	+ + a + + +
II-C 200 mg	6	48	3	—	3-5 ml	+ a + +	+ + a + + +
200 mg	7	12	0	7	0 ml	0 a + +	+ + a + + +
200 mg	9	6 días	0	9	0 ml	0 a +	+ a + +
Grupo IV Control sin ACPC	75		22	53	3-10 ml	+ + + a + + + +	+ + + a + + + +

mal estado general, fueron sacrificadas a las 48 horas, de acuerdo con el programa inicial. En dos no se encontró ascitis pero en las demás se encontró ascitis desde 1 ml hasta 17 ml coincidiendo con esteatonecrosis peritoneal muy extensa. Las dos que no tenían ascitis presentaron grado mínimo de esteatonecrosis.

La necrosis acinar y la esteatonecrosis fueron muy extensas, tanto como en los testigos.

*Perros.* De los siete perros sujetos al experimento cinco murieron dentro de los primeros cinco días y dos que se encontraban en aparente buen estado, fueron sacrificados al 5º día. En los siete perros, se encontraron lesiones de pancreatitis intensa, con esteatonecrosis extensa, hemorragias abundantes del páncreas y zonas extensas de necrosis localizadas al cuerpo y cola, que es donde se distribuye la solución instilada. En ninguno se observó acción protectora del ACPC en contra de la pancreatitis. En la biopsia tomada antes de inducir pancreatitis, o sea a las 72 horas de administrado el ACPC no se observó efecto alguno sobre el tejido pancreático, el cual era normal.

#### DISCUSIÓN

Dunnigan y cols.<sup>6, 8</sup> al hacer estudio histológico del páncreas en ratas sometidas al efecto del ACPC, además de confirmar las lesiones descritas por otros autores, hicieron ensayos sobre la actividad tríplica del páncreas y pudieron establecer una correlación entre la lesión histológica y la disminución

de la actividad tríplica. En ratas sacrificadas cuatro días después de administrar el ACPC a dosis de 375 mg/Kg, pudieron demostrar ausencia de la actividad proteolítica a la vez que el páncreas mostraba reducción intensa de peso y volumen, una gran disminución del tamaño de la célula acinar y desaparición casi completa de los gránulos zimogénicos.

Nuestro estudio comprueba, por segunda vez, la hipótesis objeto de nuestro trabajo, ya que la mayoría de las ratas con tratamiento preventivo mostró ausencia o grado mínimo de esteatonecrosis y de necrosis acinar, lo que indica que hay una buena protección, aunque no completa, en contra del proceso pancreatítico. Los otros parámetros usados también hablan en favor de la acción protectora del ACPC, ya que la mortalidad en 48 horas después de inducida la pancreatitis fue prácticamente nula con las dosis de 400 a 300 mg/Kg y con la de 200 mg cuando se aplicó con 6 días de anticipación a la pancreatitis, mientras que en los animales testigo fue de 30%. La dosis de 20 mg aplicada con seis días de anticipación fue la más eficiente ya que dio protección prácticamente completa y además los signos de toxicidad fueron mínimos, bien soportados por los animales y la recuperación ocurrió en el curso de un mes.

En referencia al otro parámetro usado, la ascitis, en trabajo reciente, aún no publicado,<sup>9</sup> pudimos demostrar que en la rata existe bastante correlación entre el desarrollo de ascitis y la severidad de la pancreatitis, ya que a las

48 horas de inducida la pancreatitis, la ascitis alcanza volúmenes de 3 a 8 ml. En el grupo experimental sólo hubo ascitis en tres ratas, mismas que desarrollaron más signos de pancreatitis que el resto, mientras que las demás, con signos nulos o mínimos de pancreatitis, no presentaron ascitis.

La reacción inflamatoria no fue influenciada por el ACPC. Al juzgar esta circunstancia habría que revisar el concepto de pancreatitis. Si para designar una lesión como pancreatitis es suficiente la presencia de edema e inflamación entonces habría que admitir que el ACPC no tiene ningún efecto protector. Pero si además se requiere el desarrollo de necrosis acinar y de esteatonecrosis entonces sí podemos asegurar que el ACPC en dosis adecuadas es capaz de proteger en contra del proceso lítico de la pancreatitis.

Por otra parte, el ACPC como tratamiento curativo en la rata fue un fracaso. La explicación ante este resultado es que la acción del ACPC sobre la célula pancreática no es inmediata, sino que se establece después de algunas horas o días, como pudo observarse en las ratas del Grupo I en las que la degranulación y la atrofia empezaron a aparecer a las 24 horas, fueron más intensas a las 48 horas y definitivas a partir del 4o. día con las tres dosis utilizadas.

Llama la atención la falta de protección en el perro, lo cual indica una variación de los sistemas enzimáticos en las diferentes especies.

Al respecto Sherman y cols.<sup>10</sup> demostraron diferencias entre el ratón y el

perro, consistentes en que en los páncreas del ratón se almacena ACPC en proporción mayor que en ningún otro tejido, mientras que en el perro la concentración del ACPC en el páncreas es igual a la de los otros tejidos.

La biopsia de páncreas en el perro efectuada a las 72 horas ya permitió predecir que no habría protección en contra de la pancreatitis, puesto que las células acinares no mostraron atrofia ni disminución de los gránulos zimogénicos.

Berlinguet y cols.<sup>11</sup> han aportado datos muy interesantes referentes al mecanismo de acción del ACPC, a su toxicidad, distribución tisular<sup>12, 13</sup> y sus efectos sobre la respiración tisular y metabolismo de los aminoácidos.<sup>14</sup>

Los datos más importantes en relación al presente estudio<sup>15</sup> son que la acción del ACPC inhibe la incorporación de valina-C<sub>14</sub> en las proteínas plasmáticas en una proporción de 40 y 50%, suprimiendo la síntesis proteica, a pesar de que no se han demostrado cantidades significativas del ACPC incorporadas a las proteínas. La respiración tisular bajo la acción del ACPC se ha encontrado normal a la vez que este aminoácido no es descarboxilado, ni transaminado, ni oxidado y su molécula permanece intacta dentro de la célula, sin que se hayan demostrado productos metabólicos.<sup>14</sup> La toxicidad del ACPC es mayor cuando se da en dosis fraccionadas que cuando se da una sola dosis equivalente a la suma de las fracciones.<sup>8, 12</sup>

Usando ACPC radiactivo se ha encontrado que su concentración en los

tejidos es muy amplia pero su concentración mayor se ha observado en el páncreas, en la medula ósea del ratón,<sup>6, 13</sup> y en las células malignas del tumor de Ehrlich en el ratón.<sup>13</sup>

Finalmente, hay que hacer notar que el efecto del ACPC en la rata, a dosis de 400 mg/Kg es muy prolongado, ya que los animales sacrificados a los 30 días aún presentaban la lesión pancreática, desapareciendo en los que sobrevivieron 60 días. La duración de la lesión está en relación con la dosis utilizada a juzgar por el grupo de 200 mg/Kg en el cual hubo recuperación completa del páncreas en menos de 30 días.

En vista de que no hay suficientes estudios en la especie humana, cabe preguntarse si el páncreas humano reaccionaría como el de la rata, el del perro, o en forma diferente a ambos.

#### REFERENCIAS

- Alvizouri, M.: *Inhibidores de la secreción pancreática. Concepto general.* Rev. Gastro. Méx. 28: 477, 1963.
- Alvizouri, M. y Borunda, B. L.: *El inactivador de tripsina y calicreína en la pancreatitis experimental.* Rev. Gastro. Méx. 30: 275, 1965.
- Alvizouri, M. y Borunda, B. L.: *D-1 ethionine in prevention of experimental pancreatitis in the rat.* Am. J. Digest. Dis. 12: 1017, 1967.
- Alvizouri, M.: *El trasylyol en la pancreatitis experimental del perro.* Envíapara su publicación a Rev. Gastro. Méx.
- Zelinskii, N. y Stadnikou, G.: *Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's* 57: 350, 1912.
- Dunnigan, J.; Gagnon, P. M. y Berlinguet, L.: *Selective effect of l-amino cyclopentane carboxylic acid on pancreatic acinar tissue and its protease activity.* Biochem. Pharmac. 13: 517, 1964.
- Chenard, J. y Auger, C.: *Cytoplasmic changes in pancreatic acinar cells of the rat caused by l-aminocyclopentane carboxylic acid (ACPC).* Am. J. Path. 52: 825, 1968.
- Dunnigan, J. y Berlinguet, L.: *Comparative study of the toxicity of ACPC with two closely-related structural analogs.* Rev. Canad. Biol. 24: 219, 1965.
- Alvizouri, M. y Macouzet, J.: *Amilasa peritoneal en la pancreatitis experimental.* Rev. Gastr. Méx. 34: 367, 1969.
- Sherman, F. C.; Paredes, A. M.; Chambers, D. A. y Nardi, G. L.: *Species differences and pancreatic localization of l-amino cyclopentane C14 carboxylic acid.* Canad. J. Biochem. 43: 1243, 1965.
- Berlinguet, L.; Bégin, N. y Sarkar, N. K.: *Mechanism of anti-tumor action of l-amino-cyclopentane carboxylic acid.* Nature 194: 1082, 1962.
- Berlinguet, L.; Bégin, N.; Babineau, L. M.; Martel, F.; Vallee, R. y Laferté, R. O.: *Biochemical studies of an unnatural and antitumor amino acid: l-aminocyclopentane carboxylic acid. I. Toxicity and tissue distribution.* Canada J. Biochem. Physiol. 40: 425, 1962.
- Berlinguet, L.; Bégin, N. y Babineau, L. M.: *Autoradiographic studies of the distribution of l-aminocyclopentane carboxylic acid in normal and cancerous mice.* Canad. J. Biochem. Physiol. 40: 1111, 1962.
- Berlinguet, L.; Bégin, N.; Babineau, L. M. y Laferté, R. O.: *Biochemical studies of an unnatural and antitumor amino acid: l-aminocyclopentane carboxylic acid. II. Effects of cellular respiration and amino acid metabolism.* Canad. J. Biochem. Physiol. 40: 433, 1962.
- Sterling, W.; Henderson, J. F.; Mandel, H. G. y Smith, P. K.: *Summary of studies on the metabolism of l-amino cyclopentane carboxylic acid (NSC-1026).* Cancer Chemot. Report, 15: 1, 1961.