An. Real Acad. Farm. 1992, 58: 207-231

Estudio de las actividades farmacológicas duales (antitripanosómicas y antitumorales) de los nuevos complejos neutros del Osmio (III), del Osmio (IV), y de los nuevos complejos anionicos del Rutenio (III)

D.G. CRACIUNESCU*, C. MOLINA, E. PARRONDO-IGLESIAS, M.P. ALONSO, J.C. DOADRIO-VILLAREJO, M.T. GUTIERREZ RIOS, M.I. DE FRUTOS

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

E. GASTON DE IRIARTE

Departamento de Urología. Facultad de Medicina. UM. Madrid.

G. CETARD FOMBONA

Facultad de Medicina, UCV. Caracas (Venezuela)

N. ERCOLI

Instituto de Zoología Tropical, UCV, Caracas (Venezuela)

Resumen

En este trabajo se presentan las actividades farmacológicas duales"in vivo" (antitripanosómicas y antitumorales) desplegadas por los complejos neutros del Os (III) de formulación general $(Os^{III}(L)_3)^o$, donde L = derivados de ditiocarbamato y/o xantantos y neutros del Os (IV) de estructura general $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^o$, así como de los complejos aniónicos del Ru (III) de estructura general $(Ru^{III}(Cl)_4(L)_2)^-(LH)^+$, donde L = medicamento antimalárico clásico (derivados de aminoquinoleina o acridina). Los veinte (20) complejos han sido ensayados frente a ratas portadoras de tumores ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz, ascíticos S-180, leucémicos P-388, así como frente a las ratas portadoras de las siguientes infecciones tripanosómicas: T. evansi (venezuelensi), T. evansi (India), T. equiperdum, T. congolense, T. rhodesiense. Los 20 nuevos compejos neutros del Os (III), Os (IV) y aniónicos del Ru (III) han sido caracterizados a través de datos del análisis químico

* Autor al que debe enviarse toda la correspondencia

y de sus espectros I.R. Su perfil toxicológico ha sido hallado mediante la determinación de los contenidos % mg urea, % mg creatinina, niveles enzimáticos "GOT" y "SGIT" cociente L/N (L = Linfocitos y N = Neutrófilos) en la sangre de las ratas de la cepa "Swiss white mice" que recibieron por vía i.p. 1/2 LD50 de cada complejo (a las 192 h.). Se ha realizado también un estudio de Microscopía óptica de los cortes semifinos de los riñones de las ratas tratadas (a las 192 horas y a las 360 horas) con el complejo más activo $(Ru^{III}(Cl)_4(L)_2)^-(LH)^+$, donde L = Primaquina.

Palabras clave: Complejos neutros del Os (III) y del Os(IV).- Complejos aniónicos del Ru (III).- Actividades antitripanosómicas.- Actividades antitumorales.- Toxicidad.- Histopatología renal.

SUMMARY

Dual pharmacological activities (trypanocidal and antitumour) dissplayed by the new neutral Osmium (III) and Osmium (IV) complexes and by the new anionic Ruthenium (III) complexes.

In this paper we report the "in vivo" dual pharmacological effects dissplayed by 20 new Os (III) and Os(IV) neutral complexes, $(Os^{III}(L)_3)^\circ$ and $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^\circ$, where L = dithiocarbamate or xanthate derivates, as well as of the new anionic Ru (III) complexes $(Ru^{III}(Cl)_4(L)_2)^-(LH)^+$, classical antimarial drugs (derivates of aminoquinoline or acridina). The new complexes were assayed against rats infected with T. evansi (venezuelensi), T. evansi (India), T. equiperdum, T. congolense and T. rhodesiense, as well as against the rats carrying the followings tumours: Ehrlich ascitic, Landschutz ascitic, S-180 ascitic and P-388 leukemic tumours. The 20 new complexes were characterized by the study of their I.R. spectra and through the cehmical analysis.

The toxicological potential of the 20 new neutral Os(III), Os(IV) and anionic Ru(III) complexes was monitored in the blood of the rats ("Swiss white mice") wich received (at 192 hours) 1/2 LD50 of each complexe (via i.p.) thus the % mg urea, % mg creatinine, enzimatica levels "GOT" and "SGOT" as well as the L/N ratio (L = Limphocytes, N = Neutrophils) were reported. We performed also and optical microscopy examination of the kidneys of the rats which received complexe that is $(Ru^{III}(Cl)_4(L)_2)^-(LH)^+$ where L = Primaquine.

Key words: New neutral Os (III) and Os(IV) complexes. New Ru(III) anionic complexes.- Antitrypanocidal effects.- Antitumour effects.- Toxicities.- Renal histopatology.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, Craciunescu y colaboradores han puesto de manifiesto las interesentes actividades farmacológicas duales (antitumorales y antitripanosómicas) "in vivo" desplegadas por amplias series de complejos del grupo del platino, frente a muy variadas líneas de tumores y líneas de infección parasitarias (tripanosómicas), realizando así un detallado estudio estructura-actividad farmacológica de más de 250 complejos del Pt(II), Pt(IV), Rh(III), Rh(II), Rh(I), Ir(I), Ir(III), Ir(II), Ru(III), Ru(II), Os(III) y Os(II) (1-15) partiendo de las investigaciones realizadas en Brasil (año 1984) por N. Farrell y colaboradores (16-18) que, no obstante, *quedaban limitadas a los complejos del Pt(II), Pt(IV), Ru(II) y Rh(II) frente a, exclusivamente, las infecciones parasitarias producidas por T. rhodesiense y/o T. cruzi.*

En cuanto a los complejos neutros del Os(III) y del Os(IV), en la literatura se mencionan muy de pasada los bajos efectos antitumorales y/o antitripanosómicos "in vivo" desplegadas por los complejos neutros $(Os^{III}(L)_3)^\circ$ y $(Os^{II}(L)_2)^\circ$, donde L = derivado de ditiocarbamato y/o xantato, así como de las sales complejos del Osmio (IV) pertenecientes a las estructuras generales $(Os^{IV}X_6)(LH_2)$, donde X = Cl^- o Br^- y L = derivado de piperacina (14,19), quedando sin estudiar los complejos neutros del Os(IV).

Los complejos aniónicos y octaédricos del Rutenio (III) sintetizados por Keppler (20) de estructura general $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$ donde L = aminas heterocíclicas,presentaban según este autor bajas toxicidades "in vivo" y, a la vez, efectos antitumorales muy potentes; *Si bien no se había estudiado todavía su actividad antitripanosómica "in vivo".*

Hemos sintetizado nuevos complejos neutros del Os(III) y del Os(IV) de estructura presumiblemente octaédrica $(Os^{III}(L)_3)^\circ$ y $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^\circ$ donde L = dereivado de ditiocarbamatos y/o xantatos, tomando en cuenta las excelentes actividades anti-leishmaniásicas y/o antitripanosómicas que presentaban varios complejos neutros del Ir(III) y del Rh(III) -de estructura neutra y octaédrica y de formulación general $(Ir^{III}(L)_3)^\circ$, $(Rh^{III}(L)_3)^\circ$, donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos (21, 22), así como el hecho de que la complejación de los ditiocarbamatos (L^-K^+) por iones metálicos del grupo del platino,permite actuar a nivel mitocondrial (de los distintos parásitos) a los ligandos (L) que, como se sabe son excelentes moduladores de la "SOD" (superóxido dismutasa); obteniéndose así unas importantes lesiones en el aparato mitocondrial de los parásitos (Leishmania donovani, T. cruzi) (8-9).

Se han empleado -en la síntesis de los nuevos complejos neutros y presumiblemente octaédricos del Os(III) y del Os(IV)- los siguientes ligandos (L) en forma de sales de K^+: 2-aminotiazol ditiocarbamato; 2-amino-4-feniltiazol ditiocarbamato; 2-amino-4-metiltiazol ditiocarbamato; 2-aminoimidazol ditiocarbamato; 2-amino-4-bromotiazol ditiocarbamato; 2,4,5-trimetilanilin ditiocarbamato; 2,4-metilanilin ditiocarbamato; 5-nitroimidazol ditiocarbamato; Isobutil xantato.

También se han sintetizado nuevos complejos aniónicos de estructura octaédrica del Rutenio (III), de formulación general $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)(LH)^+$, donde L = medicamentos clásicos antimaláricos (derivados de aminoquinoleina y/o acridina), es decir: "Mepacrina", "Primaquina", "Amodiaquina", "Lepidina").

Los nuevos complejos del Os(III), Os(IV), Ru(III) han sido caracterizados a través de datos del análisis químico y de sus espectros I.R. Han sido ensayados frente a las ratas portadoras de las siguientes líneas de infección tripanosómicas: T. evansi (venezueliense); T. evansi (Indica); T. congolense; T. equiperdum y T. rhodesiense. Su efecto anticanceroso ha sido medido frente a las ratas (de la cepa "Swiss white mice") portadoras de tumores ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz, ascíticos S-180 y leucémicos P-388. El perfil toxicológico de los nuevos complejos se ha medido (a las 192 horas después de administrar 1/2 de su LD50) en la sangre de las ratas de la cepa "Swiss white mice" midiendo los parámetros siguientes: % mg urea, % mg creatinina, niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT", cociente L/N (L= Linfocitos, N = Neutrófilos).

También hemos realizado un estudio de histopatología renal (a las 192 horas y a las 360 horas), después de administrar a las ratas (por vía i.p.) 1/2 de la Ld50 del complejo más activo, es decir $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$ donde L = "Primaquina".

PARTE EXPERIMENTAL

1. *Síntesis de los nuevos complejos $(Os^{III}(L)_3)^o$*

1 g de $K_3(Os^{III}Cl_6)$ o 1 g de $Na_3(Os^{III}Cl_6)$ se disuelve en caliente, bajo fuerte agitación (80° C) en 150 cm^3 de agua. Se le añade la cantidad correspondiente del ligando L (en forma de sal potásica L^-K^+) disuelto en

300 cm^3 de mezcla caliente (ebullición) de etanol-agua (2:1). la mezcla total de reacción se calienta (reflujo), bajo fuerte agitación, hasta que alcance 1/5-1/6 de su volumen inicial. Se deja reposar 2 horas y se filtra el precipitado microcristalino de color anaranjado-rojizo, sobre crisoles G4. Se lava con 100 cm^3 etanol absoluto y con 200 cm^3 éter etílico. Los complejos han sido guardados en un desecador sobre $CaCl_2$.

Se ha trabajado siempre respetando la esteoquiometría Os(III): L = 1:3

Los ligandos (L), empleados en forma de sales potásicas (L^-K^+) han sido descritos en el capítulo I (Introducción); fueron sintetizados en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia (UCM). Las sales $K_3(Os^{III}Cl_6)$ y $Na_3(Os^{III}Cl_6)$ son productos puros de la casa "Jonhson Matthey Ltd" (Inglaterra). Los nuevos complejos $(Os^{III}(L)_3)^o$ son poco solubles en el agua, alcoholes, $CHCl_3$, CH_2Cl_2, THF, pero bastante solubles en DMSO, y/o DMF. Los complejos son estables a la exposición del aire y a la luz. Los rendimientos de obtención rondaron siempre el 60-68% de los rendimientos teóricos.

2. *Síntesis de los complejos $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^o$*

1 g de $K_2(Os^{IV}Cl_6)$ o bien 1 g de $Na_2(Os^{IV}Cl_6)$ se disuelven en 200 cm^3 agua caliente (80° C) bajo fuerte agitación. Se le añadió la cantidad correspondiente del ligando L (en forma de sal potásica L^-K^+) disuelta en mezcla hirviente (ebullición) (2:1) de etanol-agua (unos 300 cm^3). La mezcla total de reacción se calienta a reflujo, bajo fuerte agitación, y hasta que alcance 1/5-1/6 de su volumen inicial. Se deja reposar 24 horas, y se filtra el precipitado microcristalino de color amarillo o bien amarillo anaranjado, sobre crisol G4. Se lava con 50 cm^3 etanol absoluto y con 200 cm^3 eter etílico. Se guarda en un desecador sobre $CaCl_2$.

Se ha trabajado siempre respetando la esteoquiometría Os(IV): L = 1:2.

Los ligando L, empleados en forma de sales potásicas (L^-K^+), son los que aparecen detallados en el capítulo I (Introducción), y han sido sintetizados en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia, UCM. Los rendimientos de obtención de los nuevos complejos $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^o$ rondan el 60-63% de los valores teóricos. Estos comple-

jos neutros del Os(IV) son algo solubles en etanol, metanol y agua (0,01-0,03 mg/ml), pero son muy poco solubles en $CHCl_3$, CH_2Cl_2, piridina, CCl_4. Son bastantes solubles (0,3-0,1 mg/ml) en DMSO y en DMF. Son estables a la exposición de la luz.

3. *Síntesis de los complejos* $(Ru^{III}\ Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$

1 g $RuCl_3.6H_2O$ se disuelve en 250 cm^3 HCl concentrado (12 N) y se mantiene al reflujo, bajo fuerte agitación durante 2 horas. Se le añade la cantidad correspondiente del ligando L (en forma de sal; sulfato o fosfato) disuelto en mezcla caliente 3:1 etanol absoluto-HCl concentrado (12 N) -volumen total 300 cm^3-.

La mezcla total de reacción se calienta al reflujo, bajo fuerte agitación, hasta que alcance 1/5-1/6 de su volumen inicial. Se deja enfriar a la temperatura ambiente y se filtra el precipitado microcristalino de color rojo, sobre crisoles G4. Se lava con 50 cm^3 etanol absoluto y con 200 cm^3 éter etílico. Se deja secar en un desecador sobre $CaCl_2$.

Se ha trabajado siempre respetando la esteoquimetría Ru(III): L = 1:2.

Los ligando L empleados (en forma de sales -fosfatos o sulfatos-) son productos p.a. de las casas "Bayer" y "Roche". Se trata de los siguientes medicamentos antimalaricos clásicos (derivados de aminoquinoleina, derivados de aminoacridina): "Mepacrina", "Amodiaquina", "Primaquina" y "Lepidina" (WR 2602), este último producto siendo proporcionado por el "Water Reed Institute" (USA).

Los complejos del Ru(III) se obtienen con unos rendimientos que rondan el 75-78% de los rendimientos teóricos. Son bastantes solubles en alcoholes, piridina, DMF y muy solubles en DMSO. También son bastante solubles en el agua, en la que se hidrolizan lentamente. Son estables a la exposición de la luz. La sal $RuCl_3.6H_2O$ es un producto de la casa "Johnson Matthey Ltd" (Inglaterra).

4. *Análisis químico de los nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III)*

Los nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III) han sido atacados en caliente con "agua regia", y el contenido en Os % y Ru % hallado por espectroscopía atómica de absorción, con la ayuda de un aparato AA60 Techtron. Los contenidos en N % de los complejos han sido hallados por el método de Kjeldhal.

Los contenidos en S %, C %, H %,Cl % han sido hallados por métodos normalizados de microcombustión. Todos estos análisis han sido realizados en el Departamento de química Inorgánica de la Facultad de Farmacia UCM y en colaboración con "Pascher Laboratoires" (Bonn, Alemania).

Los contenidos hallados en Os %, Ru %, N %, S %, Cl %, C %, H %, no difieren en ± 1% de los valores teóricos calculados para unas estructuras neutras y presumiblemente octaédricas $(Os^{III}(L)_3)^o$ y $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^o$ así como para el caso de unas estructuras aniónicas y octaédricas del Rutenio (III) de -tipo "sales complejas"- y formulación general $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$.

5. *Espectros I.R.*

Los espectros I.R. de los nuevos complejos $(Os^{III}(L)_3)^o$,$(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^o$ y $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, así como de los correspondientes ligandos puros ditiocarbamatos y xantatos en forma de sales potásicas (L^-K^+) y de los ligandos L (medicamentos clásicos antimaláricos en forma de sulfatos o fosfatos), han sido hallados con la ayuda de un espectrofotómetro I.R. Perkin Elmer 457 (4000-250 cm^{-1}) y/o con la ayuda de un espectrofotómetro I.R. Zeiss Jena UR-10 (4000-600 cm^{-1}) en pastillas de KCl.

6. *Ensayos antitumorales "in vivo"*

Los nuevos complejos neutros del Os(III) y del Os(IV) han sido administrados por vía i.p. como suspensiones en "Tween" a las ratas de la cepa "Swiss white mice" portadoras de tumores ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz, S-180 ascíticos, P-388 leucémicos. Los complejos aniónicos del Ru(III) han sido administrados -para evitar su hidrólisis- por vía i.p. como suspensiones en aceite de cacahuete, a las ratas portadoras de los mismos tipos de tumores. El implante de los tumores se ha realizado el día 0, y los complejos han sido administrados los días 1, 5, 9 (la dosis total en mg/Kg es la que aparece en la Tabla I). Para cada

dosis de cada complejo se ha empleado un lote de 6 ratas de la cepa "Swiss white mice" -véase la Tabla I-.

TABLA I

Ensayos antitumorales "in vivo" con los nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III).

Complejos	Tumores	Dosis (mg/Kg)	T/C %
$(Os^{III}(L_1)_3)^o$	Ascíticos de Ehrlich y	200	173
	Ascíticos de Landschutz	200	189
$(Os^{III}(L_1)_3)^o$	P-388	400	130
		200	127
$(Os^{III}(L_1)_3)^o$	S-180	200	165
$(Os^{III}(L_2)_3)^o$	Ascítico de Ehrlich	200	155
		100	150
$(Os^{III}(L_3)_3)^o$	Ascítico de Landschutz	400	172
		200	153
		100	150
$(Os^{III}(L_6)_3)^o$	"	400	170
		200	160
		100	158
$(Os^{III}(L_7)_3)^o$	"	400	155
		200	152
$(Os^{III}(L_9)_3)^o$	Ascítico de Ehrlich	400	157
		200	155
		100	150
$(Os^{III}(L_1)_2)(Cl)_2)^o$	Ascítico de Landschutz	400	199
		200	190
$(Os^{III}(L_2)_2)(Cl)_2)^o$	"	400	195
		200	190
		100	187

$(Os^{IV}(L_5)_2)(Cl)_2)^o$	Ascítico de Ehrlich	400	200
	Ascítico de Landschutz	400	225
	S-180	400	155
$(Os^{IV}(L_6)_2)(Cl)_2)^o$	Ascítico de Ehrlich	400	210
	Ascítico de Landschutz	400	235
	S-180	400	150
$(Ru^{III}Cl_4(L_{10})_2)^-(L_{10}H)^+$	Ascítico de Landschutz	200	242
	Ascítico de Ehrlich	200	237
	"	400	290
	S-180	400	175
	P-388	200	135
$(Ru^{III}Cl_4(L_{11})_2)^-(L_{11}H)^+$	Ascítico de Ehrlich	400	200
	Ascítico de Landschutz	400	225
		200	215
$(Ru^{III}Cl_4(L_{11})_2)^-(L_{11}H)^+$	S-180	400	175
		200	170
	P-388	400	150
		200	132
$(Ru^{III}Cl_4(L_{12})_2)^-(L_{12}H)^+$	Ascítico de Landschutz	400	182
		200	175
		100	171

Las claves de los ligandos (L) son los siguientes: L_1 = 2-aminotiazol ditiocarbamato; L_2 = 2-amino-4-feniltiazol ditiocarbamato; L_3 = 2-aminotiazol-4-metil ditiocarbamato; L_4 = 2-aminoindazol ditiocarbamato; L_5 = 2-amino-4-bromotiazol ditiocarbamato; L_6 = 2,4,5-trimetilanilin ditiocarbamato; L_7 = 2,4-metilanilin ditiocarbamato; L_8 = 5-nitroimidazol ditiocarbamato; L_9 = Isobutil xantato; L_{10} = "Mepacrina"; L_{11} = "Primaquina", L_{12} = "Amodiaquina"; L_{13} = "Lepidina". Los complejos que no aparecen en la tabla han resultado totalmente inactivos frente a las 4 líneas tumorales, si se indica una sola línea tumoral esto significa que se detectó actividad anticancerosa únicamente para esta línea tumoral, siendo el complejo inactivo respecto a las tres líneas tumorales restantes (dosis totales de 400, 200, 100 mg/Kg).

Como criterio de actividad anticancerosa "in vivo" se ha tomado el parámetro T/C % (T = tiempo de sobrevivencia de animales "Tratados" y C = Tiempo de sobrevivencia de animales "Control").

En el caso de los tumores ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz, S-180 ascítico, T/C ≥ 150 %, indica actividad antitumoral bien definida. Valores T/C % comprendidos entre 120% y 150% indican actividad antitumoral marginal, y T/C % = 125 % indican falta de actividad anticancerosa.

En el caso de los tumores leucémicos P-388, valores T/C % ≥ 125% indican actividad antitumoral bien definida; Valores T/C % comprendidas entre 100-125 % indican actividad antitumoral marginal; T/C % = 100 % indica falta de actividad antitumoral (véase la Tabla I). Todos estos ensayos, anticancerosos "in vivo", se ha realizado en colaboración con el "National Cancer Institute" (USA) y/o con otros Institutos anticancerosos con los que colaboramos.

7. *Ensayos antitripanosómicos "in vivo"*

Los complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III) han sido administrados por vía s.c. como suspensiones en aceite de cacahuete, a las ratas de la cepa "Swiss white mice" portadoras de las siguientes líneas de infección parasitaria: T. evansi (venezuelense); T. evansi (India); T. equiperdum; T.congolense; T. rhodesiense. Las ratas fueron inoculadas (por vía i.p.) con 10^5 parásitos, y los complejos fueron administrados en una dosis única (vía s.c. como suspensiones en aceite), dos horas después de realizar la inoculación -véase la Tabla II-.

TABLA II

Ensayos antitripanosómicos "in vivo" con los nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III)

Complejos	Parásitos	Dosis (mg/kg)	Claves actividad
$(Ru^{III}Cl_4(L_{11})_2)^-(L_{11}H)^+$	T. rhodesiense	400	Muy activo
		200	"
"	T. evansi (Venezuelensi)	200	Moderadamente activo
		100	
"	T. evansi (India)	400	"
		200	"
"	T. congolense	400	Marginalmente activo
"	T. equiperdum	600	"
		400	"
$(Ru^{III}Cl_4(L_{12})_2)^-(L_{12}H)^+$	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Marginalmente activo
		100	
		50	"
$(Ru^{III}Cl_4(L_{10})_2)^-(L_{10}H)^+$	"	400	Activo
		200	"
		100	Marginalmente activo
$(Ru^{III}Cl_4(L_{13})_2)^-(L_{13}H)^+$	"	400	Muy activo
$(Ru^{III}Cl_4(L_{12})_2)^-(L_{12}H)^+$	T. evansi (venezuelensi)	600	Activo
		400	Marginalmente activo
$(Ru^{III}Cl_4(L_{10})_2)^-(L_{10}H)^+$	"	600	Activo
		400	"
$(Os^{III}(L_1)_3)^\circ$	T. rhodesiense	800	Marginalmente activo
		600	"
		400	Inactivo
$(Os^{III}(L_6)_3)^\circ$	"	800	Marginalmente activo
		600	"
		400	Inactivo
$(Os^{III}(L_2)_3)^\circ$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo
$(Os^{III}(L_1)_3)^\circ$	T. evansi (venezuelensi)	600	"
$(Os^{IV}(L_1)_2(Cl)_2)^\circ$	T. rhodesiense	600	Activo
		400	Marginalmente activo

$(Os^{IV}(L_2)_2(Cl)_2)^o$	T. rhodesiense	600	Moderadamente activo
		400	"
$(Os^{IV}(L_9)_2(Cl)_2)^o$	"	600	Moderadamente activo
		400	"
$(Os^{IV}(L_3)_2(Cl)_2)^o$	"	600	Moderadamente activo
		400	"
$(Os^{IV}(L_4)_2(Cl)_2)^o$	"	600	Moderadamente activo
		400	"

Las claves de los ligandos (L_1-L_{13}) son las que aparecen en la tabla I. Los complejos que no aparecen en esta Tabla, han sido totalmente inactivos (dosis únicas de 400, 200 ó 100 mg/Kg) frente a todas las líneas de infección parasitarias empleadas.

Los criterios para medir la actividad antitripanosómica han sido el tiempo de sobrevivencia y la parasitomia medida el día 8 y, eventualmente el día 30. Los resultados se indican como: 2T - Actividad moderada; 2T + 8 - "Activo" (ningún parásito el día 8); T + 4 - Marginalmente activo; T + 1 - Inactivo; 2T + 20 -"Curativo" o "Muy activo" (ningún parásito detectable el día 30); T - Tiempo (en días) de sobrevivencia de los animales infectados y no tratados (en días); T ≈ 5 días para los controles.

8. *Valoración de la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y hematotoxicidad de los nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III)*

Se ha administrado 1/2 LD50 de cada complejo por vía i.p. como suspensión en "Tween" (para los complejos del Os(III) y del Os(IV)) y como suspensión en aceite de cacahuete (para los complejos del Ru(III)) a un lote de 6 ratas de la cepa "Swiss white mice" y los contenidos en la sangre de las ratas (% mg urea, % mg creatinina, niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT", así como el cociente L/N) han sido hallados a las 192 horas después de la administración de los complejos -véase la Tabla III-.

TABLA III

Toxicología de los nuevos complejos del Os(III), Os(IV), Ru(III) (a las 192 horas, administración i.p. de 1/2 LD50).

Complejo	% mg urea	% mg creatinina	GOT	SGOT	L/N
Controles	42,6	0,62	51,2	17,9	6,1
$(Ru^{III}Cl_4(L_{10})_2)^-(L_{10}H)^+$	54,2	0,71	51,6	18,2	6,1
$(Ru^{III}Cl_4(L_{11})_2)^-(L_{11}H)^+$	54,1	0,83	52,0	18,3	5,9
$(Ru^{III}Cl_4(L_{12})_2)^-(L_{12}H)^+$	54,8	0,81	52,5	18,6	5,8
$(Ru^{III}Cl_4(L_{13})_2)^-(L_{13}H)^+$	48,9	0,87	51,9	18,0	5,9
$(Os^{III}(L_1)_3)^o$	44,2	0,67	70,2	27,8	6,1
$(Os^{III}(L_2)_3)^o$	43,1	0,66	71,2	28,1	6,1
$(Os^{III}(L_3)_3)^o$	45,1	0,68	71,6	28,4	5,9
$(Os^{III}(L_6)_3)^o$	45,8	0,68	69,3	27,9	5,8
$(Os^{III}(L_7)_3)^o$	44,7	0,67	68,4	27,3	5,8
$(Os^{III}(L_5)_3)^o$	44,9	0,67	71,5	28,4	5,9
$(Os^{III}(L_8)_3)^o$	44,3	0,66	71,2	28,6	5,9
$(Os^{IV}(L_1)_2(Cl)_2)^o$	45,1	0,69	71,1	27,2	6,0
$(Os^{IV}(L_2)_2(Cl)_2)^o$	45,6	0,68	71,2	28,3	6,0
$(Os^{IV}(L_3)_2(Cl)_2)^o$	45,2	0,68	69,6	27,5	6,0
$(Os^{IV}(L_4)_2(Cl)_2)^o$	44,8	0,68	68,5	27,9	5,9
$(Os^{IV}(L_6)_2(Cl)_2)^o$	44,6	0,67	80,2	27,3	5,9

Las claves de los ligandos L_1-L_{13} son las que aparecen en la Tabla I.

Los valores LD50 de los complejos neutros del Os (III) oscilan en el rango de 2300-2650 mg/kg; para el caso de los complejos neutros del Os(IV) los valores LD50 están comprendidos en el rango de 1000-

1150 mg/kg. Los complejos aniónicos del Ru(III) presentan unos valores LD50 aproximados, en el rango de 300-480 mg/kg.

9. *Valoración histopatológica de la nefrotoxicidad del complejo* $(Rh^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, *donde L = "Primaquina"*

El complejo más interesante, $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, donde L = "Primaquina" y cuya LD50 aproximada es de 375 mg/Kg (administración vía i.p. como suspensión en aceite de cacahuete), ha sido valorada por técnicas de microscopía óptica en cortes semifinos de los riñones de las ratas a las que se administró 1/2 de su LD50 (a las 192 horas y a las 360 horas) -véase la figura 1 (que comprende las microfotografías 1-0, 1-1, 1-2, 1-3) y la figura 2 (que comprende las microfotografías 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9)-. Se han empleado las técnicas y medios de tinción de los cortes semifinos de los riñones, descritos en otros trabajos nuestros (1, 5, 14) y se ha trabajado con lotes de 6 ratas de la cepa "Swiss white mice".

Figura 1.- (Comprende las microfotografías 1-0, 1-1, 1-2, 1-3). Histopatología renal del complejo $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, donde L = "Primaquina" (a las 192 horas, administración 1/2 LD50 vía i.p.

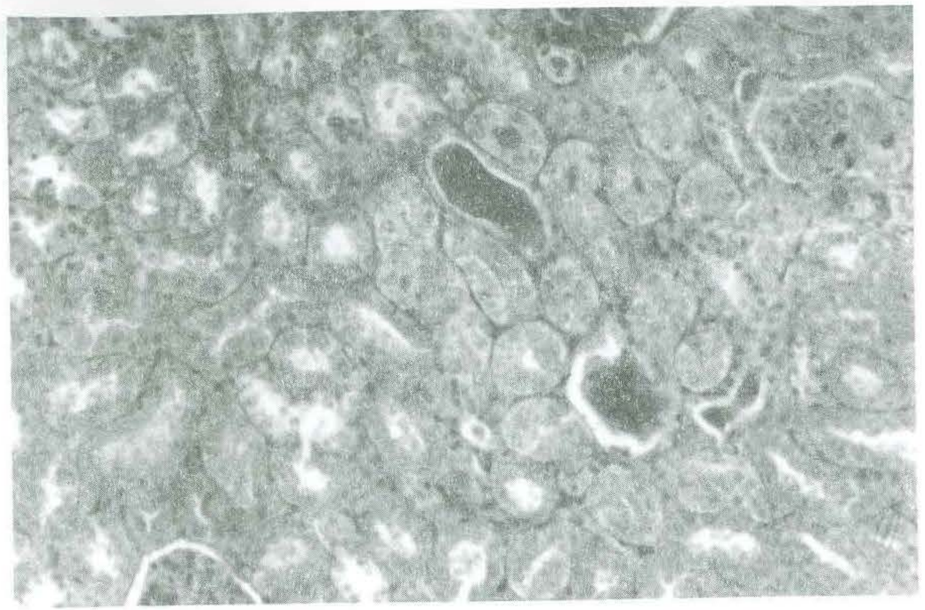


Figura 1.- (Continuación)

Fig. 1.- (Continuación)

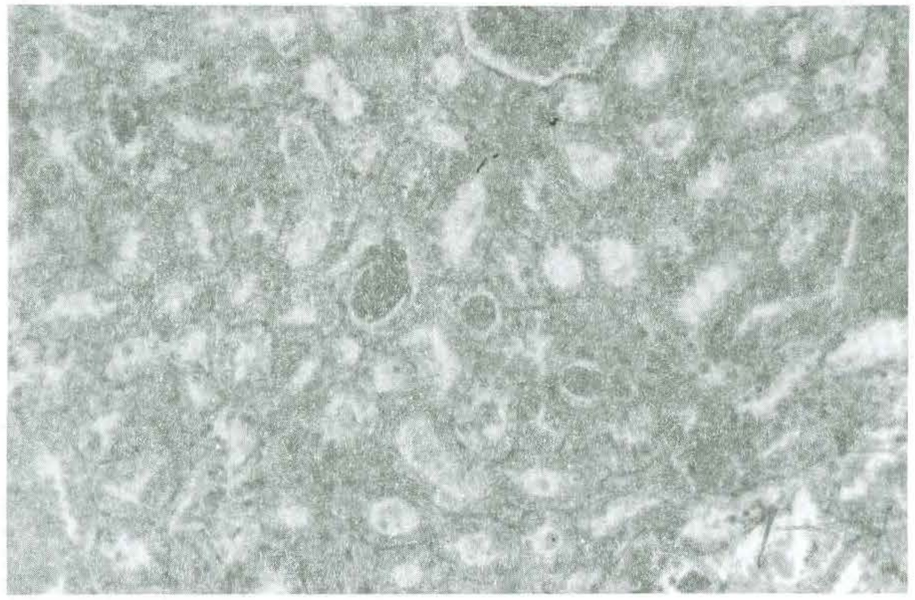
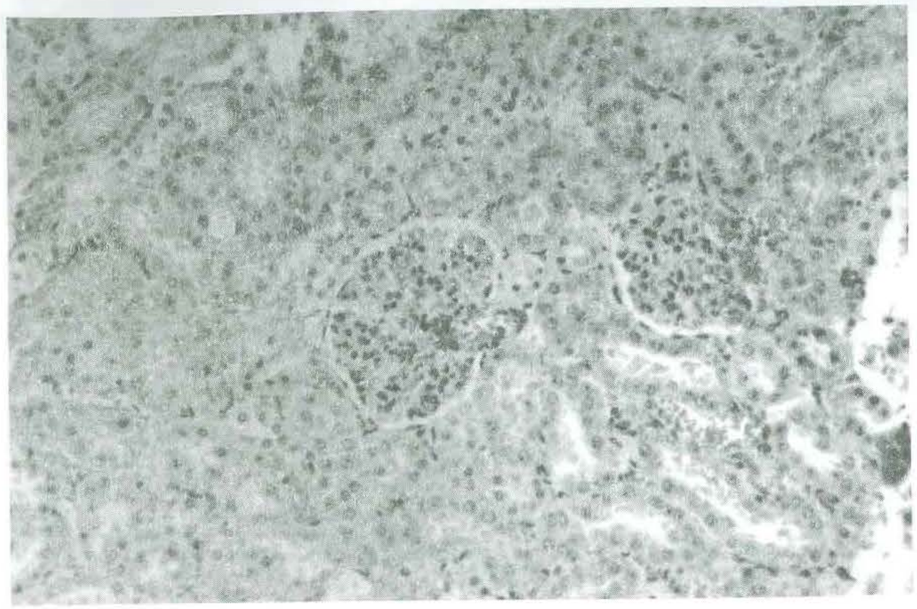


Figura 2.- (Microfotografías 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8 y 1-9). Histopatología renal del complejo $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, donde L = "Primaquina" (a las 360 horas, administración i.p. de 1/2 LD50).



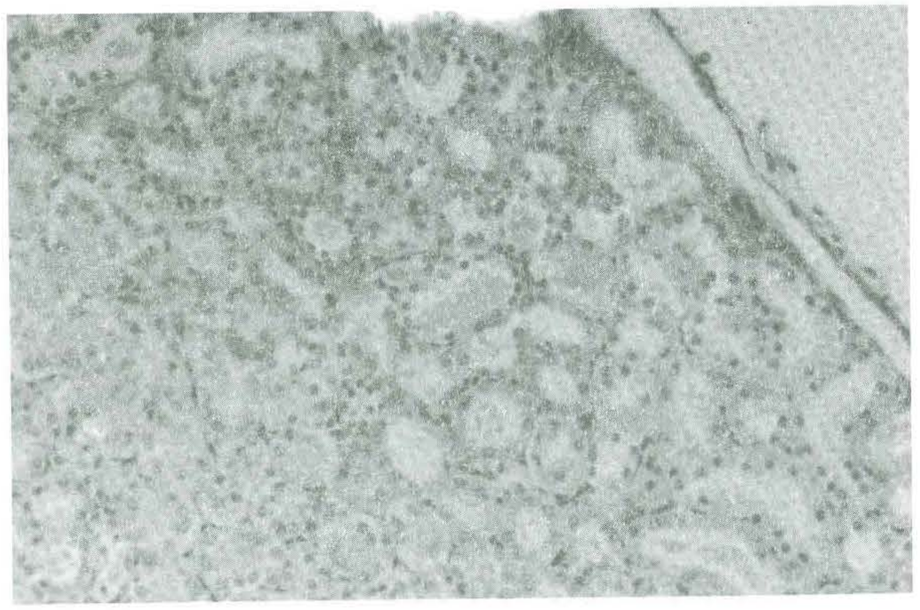
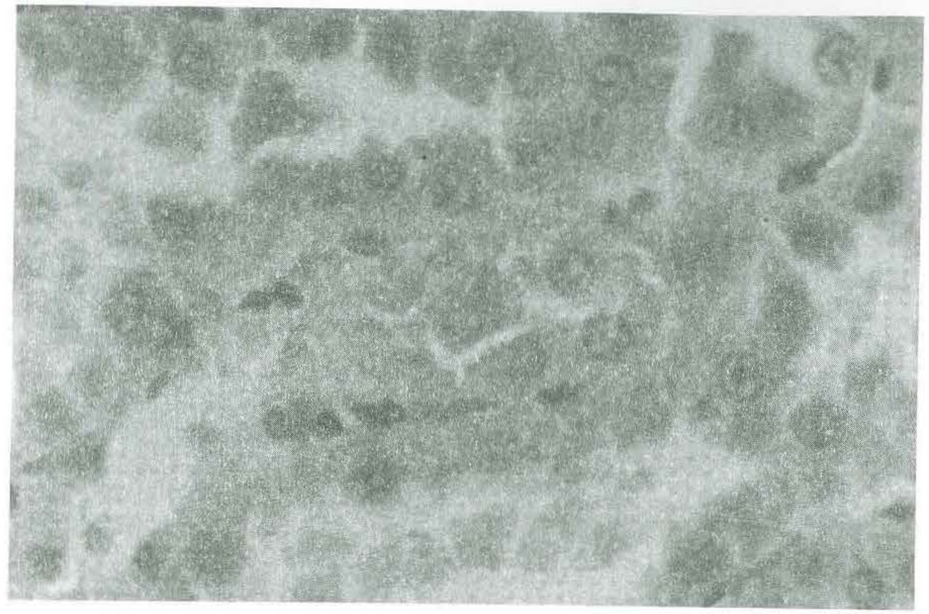


Figura 2.- (Continuación)



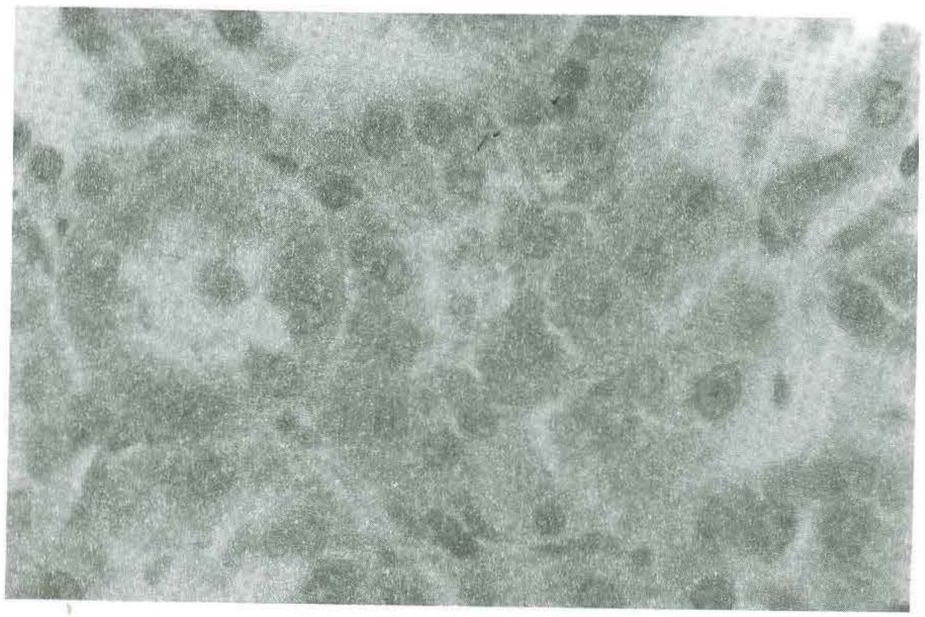


Figura 2.- (Continuación)

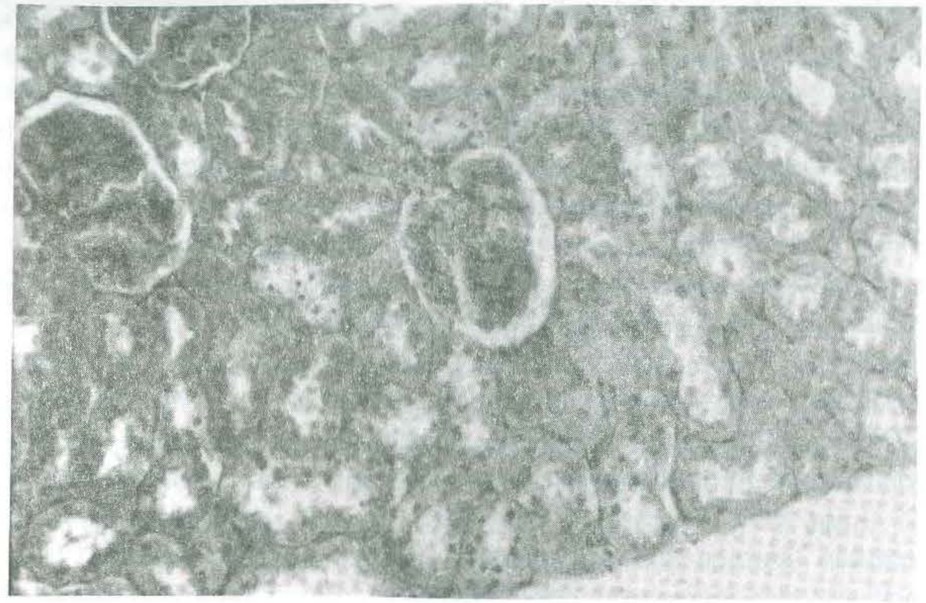


Fig. 2.- (Continuación)

III. Resultados y Discusión

Los resultados de los análisis químicos, confirman las estructuras propuestas, es decir $(Os^{III}(L)_3)^\circ$, $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^\circ$ y $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, puesto que los contenidos hallados en Os %, Ru %, N %, C %, S %, Cl % no difieren en ± 1% de los valores teóricos calculados para estas estructuras octaédricas y neutras del Os(III) y del Os(IV), así como para unas estructuras aniónicas y octaédricas del Ru(III) -véase apartado 4 de la Sección I del presente trabajo-.

Los espectros de rutina al I.R. de los complejos neutros del Os(III), es decir $(Os^{III}(L)_3)^\circ$, apuntan hacia la actuación coordinadora de los ligandos L (derivados de ditiocarbamato y/o xantatos) en la forma resonante

la existencia de una deslocalización π electrónica sobre las "pinzas CS_2^-, ya que en los espectros I.R. de estos complejos $(Os^{III}(L)_3)^\circ$ aparece una única banda de tensión νC-S (rango 1100-1150 cm^{-1}). Según Fabretti (23) y Craciunescu (14, 21, 27) si los ligandos (L) hubieran coordinado hacia el Os(III) en las formas resonantes que no poseen deslocalización π electrónica sobre las "pinzas" CS_2^-, hubiéramos observado dos bandas de tensión C-S, correspondientes a los órdenes distintos de enlace (C=S y C-S). No se observa ninguna banda de absorción νOs-Cl (rango 250-330 cm^{-1}) en el espectro I.R. de estos complejos, lo que indica que no existen enlaces Os-Cl en dichas esctructuras. Además, en el caso de los complejos del Os(III), los resultados del análisis químico indican un contenido 0 % en Cl, con lo cual su postulación estructural como complejo neutro y de simetría presumiblemente octaédrica $(Os^{III}(L)_3)^\circ$ nos parece correcta.

En el caso de los complejos del Os(IV) sus espectros I.R. presentan también una única banda de tensión νC-S, (rango 1100-1150 cm^{-1}), lo que indica que los ligandos xantatos o ditiocarbamatos (L) coordinan hacia el Os (IV) en la forma resonante que implica deslocalización π electrónica sobre sus "pinzas" CS_2^- es decir en la forma catiónica

Los complejos neutros del Os(IV), formulados como complejos neutros y octaédricos $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^\circ$ presentan también unas bandas de absorción de intensidad moderada en la zona de bajas frecuencias (270-330 cm^{-1}) asignadas a las vibraciones de tensión ν Os-Cl . Efectivamente, estos complejos del Os(IV) sí presentan enlaces Os-Cl, ya que también los resultados de los análisis químicos indican que poseen dos átomos de cloro.

Tanto los complejos neutros del Os(III) como los complejos neutros del Os(IV) presentan en sus espectros I.R. en la región de 410-460 cm^{-1} una única banda de intensidad moderada (y ausente en el espectro I.R. de los ligandos puros L^-K^+), que asignamos a las vibraciones de tensión ν Os-S, pertenecientes a los enlaces covalentes Os-S. Estas bandas de tensión ν Os-S están, evidentemente, ausentes en los espectros I.R. de los ligandos L^-K^+ puros (ditiocarbamatos y/o xantatos potásicos). En

cuanto a los espectros I.R. rutinarios de los complejos del Rutenio (III), es decir $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$ donde L = "Primaquina", "Amodiaquina", "Lepidina", se pueden observar los siguientes aspectos generales:

a) Los complejos presentan unas bandas únicas, de intensidad moderada en el rango de frecuencias 350-390 cm^{-1} y asignadas a las vibraciones de tensión ν Ru-Cl. Estas bandas están ausentes en los espectros I.R. de los ligandos puros (L).
b) Los complejos también presentan una única banda de absorción de intensidad moderada, en el rango de frecuencias 410-440 cm^{-1} asignada a las vibraciones ν Ru-N.
c) Los complejos del Ru(III) presentan un desplazamiento general de las bandas de tensión ν C=N, correspondientes a los enlaces C=N de los ligandos, hacia menores frecuencias (rango 1570-1580 cm^{-1}), lo que parece indicar que los ligandos (L) coordinan hacia el catión Ru(III) a través de sus átomos N heterocíclicos, exclusivamente, quedando no implicados en los procesos de coordinación los grupos $-NH_2$ o -NHR exocíclicos.

Estos datos parecen por lo tanto confirmar la estructura octaédrica y aniónica de los complejos del Ru(III), como $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, en los que los ligandos (L) actúan como ligandos monodentados. Estamos actualmente realizando un estudio detallado I.R. y de difractogramas de rayos X de algunos de estos nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III), que serán publicados próximamente.

Respecto a las actividades anticancerosas "in vivo" de estos nuevos complejos (véase la Tabla I), podríamos sacar las siguientes observaciones generales:

1) Todos los complejos neutros del Os(III), Os(IV) y aniónicos del Ru(III) son más activos frente a los tumores ascíticos de Landschutz y de Ehrlich (por este orden), siendo mucho menos activos frente a los demás tumores.
2) Los tumores leucémicos P-388 son los más resistentes.
3) Los complejos del Ru(III) son más activos que los complejos del Os(IV).
4) Los complejos del Os(III) son los menos activos frente a todas las líneas de tumores ensayados.

5) Ninguno de estos complejos poseen efectos antitumorales comparables a los del medicamento de referencia cis-$Pt(NH_3)_2$ $(Cl)_2$ ("Neoplatin").
6) En el caso de los complejos del Os (III) y del Os(IV) con ligandos ditiocarbamatos, sus efectos antimitóticos son más elevados que en el caso en el cual los ligandos son derivados de xantatos (estructuras $(Os^{III}(L)_3)^o$ y $(Os^{IV}(L)_2(Cl)_2)^o$).

Esta última observación concuerda con lo postulado por Craciunescu y colaboradores (14, 17, 21, 22) sobre las actividades antitumorales de los complejos $(M^{II}(L)_2)^o$ y $(M^{III}(L)_3)^o$, donde M(II) = Rh(II), Ir(II), Os(II),Ru-(II); M(III) = Rh(III), Ir(III), Ru(III), Os(III) y L = derivados de ditiocarbamatos y xantatos, en los que a medida que aumenta la interacción entre las "pinzas" CS_2 y el ión metálico, aumentan los efectos antitumorales "in vivo" (superiores para los ditiocarbamatos respecto a los xantatos).

Respecto a las actividades antitripanosómicas desplegadas por estos nuevos complejos del Os(III), Os(IV) y del Ru(III) -véase la tabla II- podríamos poner de manifiesto los siguientes aspectos generales:

a) Las líneas de infección parasitarias T. evansi (venezuelensi y T. rhodesiense son las más sensibles a la actuación de estos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III).
b) Los parásitos T. evansi (India), T. equiperdum, T. congolense, son muy resistentes a la acción de estos complejos del Os(III), Os(IV) y Ru(III).
c) Los complejos más activos son los complejos aniónicos del Ru(III), y los menos activos los neutros del Os(III) y del Os(IV).
d) Los complejos del Os(IV) son algo más activos que los complejos del Os(III).
e) El complejo más activo es el complejo $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$ donde L = "Primaquina".
f) *La activividad desplegada por el mencionado complejo del Ru(III) es muy importante ya que afecta al parásito muy patógeno para el ser humano, T. rhodesiense (agente patógeno de la "enfermedad del sueño"). Los restantes parásitos estudiados tienen importancia en el ámbito de las enfermedades parasitarias ("nagana") en el campo de las ciencias veterinarias, pero no son patógenos para el ser humano.*
g) *Parece que hay una relación bien establecida entre las actividades antitumorales y antitripanosómicas "in vivo" de estos nuevos complejos, ya que precisamente los complejos que mejor actúan sobre los tumores (véase la Tabla I), presentan mayores actividades antitripanosómicas "in vivo" (véase la Tabla I).*

En cuanto a las toxicidades generales de los nuevos complejos (véase la Tabla III), parece que los complejos más tóxicos son los del Ru(III) sobre todo a nivel del funcionamiento renal. Estos complejos presentan elevaciones importantes (del orden de 20-35%) de los niveles de % mg urea y % mg creatinina a las 192 horas después de administrar 1/2 LD50 (vía i.p.).

El potencial hematotóxico y hepatotóxico es bajo para los complejos del Ru(III), como lo es también su potencial hematotóxico (ya que los cocientes L/N apenas disminuyen frente a los controles).

Los complejos del Os(III) y del Os(IV), en cambio, poseen elevadas hepatotoxicidades (elevaciones de los niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT" en 40-60% respecto a los controles) si bien su potencial nefrotóxico y hematotóxico no parece limitante.

En la Figura 1 y en la Figura 2 se detallan las fotografías (microscopía óptica) de los cortes semifinos de los riñones de las ratas que recibieron 1/2 LD50 del complejo más activo, es decir $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$ donde L= "Primaquina", a las 192 horas y a las 360 horas, demostrándose así un elevado potencial nefrotóxico de este complejo del Ru(III), cuya LD50 aproximada es de 375 mg/Kg (vía i.p. como suspensión en aceite).

En la microfotrografía 1-0 (perteneciente a la Figura I) se observa la presencia de varios glomérulos (3), con disminución del espacio capsular por engrosamiento del anillo, que evidencia la presencia de algunos polimorfonucleares. A nivel tubular aparecen signos degenerativos con pérdida del ribete en cepillo a nivel túbulo proximal. En otros túbulos se evidencia ocupación por material albuminoideo, así como áreas hemorrágicas circunscritas (tinción HE x80). Estado morfológico de sufrimiento nefrótico pero reversible.

En las microfotografías 1-1, 1-2 y 1-3 (que pertenecen también a la Figura 1), tinciones HE x80, se encuentran detalles de la morfología tubular mostrando pérdida de ribete en cepillo en los túbulos proximales, engrosamiento inflamatorio celular, disminución de la luz tubular, así como contenido albuminoide. También se observa la existencia de algún foco hemorrágico.

En general se manifiestan signos inflamatorios de células tubulares reflejo evidente de sufrimiento nefrotóxico no muy acusado.

En la microfotografía 1-4 (que pertenece a la Figura 2), HE x40, se puede apreciar el área tubular con contenido albuminoideo en la luz tubular. También se aprecia la pérdida del ribete interno así como edema inflamatorio de las células tubulares con aumento notable del citoplasma celular (microfotografías 1-5 a 1-9 de la Figura 2).

IV. Conclusiones

Los complejos aniónicos del Rutenio (III) formulados como sales complejas $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$, donde L = medicamentos clásicos antimaláricos (derivados de aminoquinoleina y/o derivados de aminoacridina), presentan un gran interés como agentes farmacológicos duales "in vivo" (antitumorales y antitripanosómicos), a pesar de su elevado potencial nefrotóxico. El complejo más activo $(Ru^{III}Cl_4(L)_2)^-(LH)^+$ donde L = "Primaquina" posee una elevada acción antitripanosómica frente a las cepas de tripanosomas africanos muy patógenos para el hombre (T. rhodesiense, agente patógeno de la "enfermedad del sueño").

Los complejos neutros del Os(III) y del Os(IV), formulados como $(Os^{III}(L)_3)o$ y $(Os^{IV}(L)_2(CL)_2)^o$ poseen unos suaves o débiles efectos duales (antitumorales y antitripanosómicos) "in vivo".

V. Agradecimientos

El Profesor Dr. D.G. Craciunescu agradece a las Compañías "Johnson Matthey Ltd" (Inglaterra y "Platinum Rustemburg Mines" (Sur Africa) por las sales de los metales nobles recibidas gratuitamente.

VI. Bibliografía

(1) D. Craciunescu y colaboradores (1988). *An. Real Acad. Farm.* **54**, 442-466.
(2) D. Craciunescu y colaboradores (1987) "In vivo" **1**, 229-234.
(3) D. Craciunescu y colaboradores (1990) *Drug Res.* **40** (1), 183-187.
(4) D. Craciunescu y colaboradores (1989). *Anticancer Res.* **9**, 781-786.
(5) D. Craciunescu y colaboradores (1989). *An. Real Acad. Farm.* **55**,213-236.
(6) A. Osuna y colaboradores (1986). *Drug Res.* **36** (1), 13-16.
(7) A. Osuna, D. Craciunescu, C. Mesa Valle (1988). *Drug Res.* **36** (1) 312-314.
(8) S.L. Croft, R. Neal, D. Craciunescu, E. Parrondo Iglesias. (1990) *Trop. Med. & Parasitology* en imprenta.

(9) S.L. Croft, R. Neal, D. Craciunescu, E. Parrondo Iglesias.Comunicación al "Congreso Int. de Parasitología" (Francia 20-22 agosto, 1990). París.
(10) G. Dreyfuss, Ph. Gayrol, G. Bouteille, D. Craciunescu (1988) *Bull. Soc. Path. Exotiques* **81** 626-631. Ibid (1990) **83**, 367-375.
(11) R. Rivera, V. Scarza, D. Craciunescu, A. Doadrio (1988). *Bol. Soc. Malariología* (Venezuela). **28**, 13-17.
(12) D.G. Craciunescu, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papa Ivannou, E. Parrondo Iglesias (1990) *Metal ions in Biol. & Medecine* 462-464.
(13) J. Zinsstag, R. Bun, D. Craciunescu, E. Parrondo Iglesias (1990) *Tropical Medicine & Parasitology* (en imprenta).
(14) D. G. Craciunescu y colaboradores (1987) *An. Real Acad. Farm.* **53**, 205-232.Ibid (1988) *An. Real Acad. Farm.* **54**, 16-45. Ibid (1985) *An. Real Acad. Farm.* **51**, 241-268.
(15) D. Craciunescu y colaboradores (1988) Comunicación al Congreso "Ruthenium and others metals complexes in chemitherapy" (Trieste), Italia.
(16) N. Farrell y colaboradores (1984) *J. Biochem. Pharmacology* **33**, 961-971.
(17) N. Farrel y colaboradores (1983) Comunicación al "Congreso Int. sobre complejos del Pt en la quimioterapia del cáncer" (Burlington, Vermont, USA, Julio 1983).
(18) N. Farrell (1987) Comunicación privada al Prof. Dr. D. G. Craciunescu.
(19) D.Craciunescu y colaboradores (1983) Comunicación al "Congreso Int. de Química Terapéutica" (Pamplona, España, Septiembre, 1983).
(20) B. Keppler y colaboradores (1987) Comunicación al "Congreso Int. de Quimioterapia con complejos del grupo del Platino" (Padova, Italia, Septiembre 1987).
(21) D. Craciunescu y colaboradores (1986). *An. Real Acad. Farm.* **52**, 45-64.
(22) D. Craciunescu y colaboradores (1990). *An. Real Acad. Farm.* En imprenta.
(23) a) A. Fabretti y colaboradores (1984). *Inorgánica chim. Acta.* **86**, 127-131.
(23) b) A. Fabretti y colaboradores (1987). Comunicación al "Congreso Int. sobre complejos del Platino en la quimioterapia del cáncer" (Padova, Italia, Julio, 1987).

Recibido: 14 Diciembre 1990