

Phaffia rhodozyma tratadas con EMS no se encontró ningún mutante, y lo mismo sucedió tras realizar un ensayo con 50.000 colonias tratadas con MNNG. Por el contrario, en el caso de MNNG si aparecieron mutantes alterados en la pigmentación celular. La dificultad de aislamiento directo de mutantes auxótrofos de *Phaffia rhodozyma* sugiere la necesidad de aplicar un método de enriquecimiento que incremente su proporción entre supervivientes al tratamiento mutagénico. El enriquecimiento con nistatina ha dado excelentes resultados con otras especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (13), *Rhodotorula mucilaginosa* (14), *Hansenula polymorpha* (15) y *Candida tropicalis* (16).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado con el proyecto número BIO-91-0749 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) JOHNSON, E.; CONKLIN, D.; LEWIS, M. (1977) *J. Fish. Res. Board. Can.* 34: 2417-2421.
- (2) JOHNSON, E.; VILLA, T.; LEWIS, M. (1980) *Aquaculture* 20: 123-134.
- (3) ANDREWES, A.; STARR, M.P. (1976) *Phytochemistry* 15: 1009-1011.
- (4) VEIGA, M.; GUTIERREZ, F. (1992) *Int. J. Pharm.* 79: 1-9.
- (5) CERDA-OLMEDO, E.; RUIZ VAZQUEZ, R. (1979). Genetics of industrial microorganisms. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- (6) LAWRENCE, C.W. (1991) *Meth. Enzymol.* 194: 273-280.
- (7) BAINBRIDGE, B.W. (1987) Genetics of microbes. Ed. Blackie. Glasgow.
- (8) OCHSNER, U.A.; GLUMOFF, V.; KÄLIN, M.; FIECHTER, A.; REISER, J. (1991) *Yeast* 7: 513-524.
- (9) AN, G.H.; SCHUMAN, D.B.; JOHNSON, E.A. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124.
- (10) BALTZ, R.H. (1986) Manual of industrial microbiology and biotechnology. Ed. Demain, A.L. y N.A. Solomon. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- (11) FIX, D.; KOEHLER, D.; GLICKMAN, B.W. (1990) *Mut. Res.* 244: 115-121.
- (12) AGER, D.D.; HAYNES, R.H. (1990) *Mut. Res.* 232: 327-336.
- (13) SNOW, R. (1966) *Nature* 211: 206-207.
- (14) COOK, K.A. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 85: 29-36.
- (15) SÁNCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. (1977) *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4: 45-49.
- (16) GLEESON, M.A.; HAAS, L.O.C.; GREEG, J.M. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2562-2566.

Actividades farmacológicas "in vivo" duales (anti-tripanosómicas y antitumorales) de algunos nuevos complejos del Platino (II) y del Platino (IV).

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

Dpto. de Química Inorgánica y BioInorgánica.- Facultad de Farmacia.- UCM.- 28040 Madrid.

N. ERCOLI

Instituto de Zoología Tropical.- Caracas (Venezuela).

E. GASTON DE IRIARTE

Dpto. de Urología.- Facultad de Medicina.- UAM.- 28032 Madrid

RESUMEN

En este trabajo se presentan las actividades farmacológicas "in vivo" duales desplegadas por más de veinte complejos del Pt (II) y del Pt(IV) pertenecientes a los tres tipos estructurales:

- a) Complejos neutros de Pt (II)(Pt^{II}(L)₂)⁰, donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos.
- b) Complejos catiónicos (Pt^{IV}(L)₂)⁺² 2 Cl⁻, donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos.
- c) Complejos neutros cis-Pt^{II}(L)₂(Cl)₂, donde L = medicamentos antimaláricos clásicos (derivados de aminoquinoleína y/o aminoácidos).

Los complejos han sido ensayados frente a las ratas portadoras de las infecciones tripanosómicas T. evansi (venezolense), T. evansi (India), T. equiperdum, T. congolense, T. rhodesiense, así como frente a las ratas portadoras de tumores ascíticos de Ehrlich, S-180 ascíticos y P-388. Los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) han sido caracterizados a través de datos del análisis químico y de sus espectros I.R. Se han valorado también los potenciales hematotóxicos, hepatotóxicos y nefrotóxicos de estos complejos a las 192 horas,

* Autor al que debe dirigirse toda la correspondencia

en la sangre de las ratas que recibieron (vía i.p.) 1/2 LD50 de cada complejo. También se presenta un estudio de histopatología renal (microscopía óptica) de las ratas que recibieron (a las 192 horas) 1/2LD50 del complejo más activo, es decir cis-PtII(L)₂ (Cl)₂, donde L = Mepacrina (cuyo LD50 aproximada es de 350 mg/kg).

Palabras clave: Complejos del Pt(II) y del Pt(IV).- Actividades antitripanosómicas.- Actividades antitumorales.- Perfil toxicológico.- Histopatología renal.

SUMMARY

Dual Pharmacological "in vivo" effects (trypanocidal and antitumour) displayed by the new Pt(II) and Pt(IV) complexes.

In this paper we report the dual pharmacological effects "in vivo" displayed by more than 20 new Pt(II) and Pt(IV) complexes, belonging to the following general structures:

- Neutral Pt(II) complexes (Pt^{II}(L)₂)₀, where L = dithiocarbamates or xanthates derivatives.
- Cationic Pt(IV) complexes, (Pt^{IV}(L)₂)⁺² 2Cl⁻, where L = dithiocarbamates or xanthates derivatives.
- Neutral cis-Pt^{II}(L)₂ (Cl)₂ derivatives, where L = classical antimalarial drugs (quinoline or acridine derivatives).

The new Pt(II) and Pt(IV) complexes were assayed against rats infected with *T. evansi* (venesueliense), *T. evansi* (India), *T. equiperdum*, *T. congolense* and *T. rhodesiense*, as well as against rats bearing the established tumours lines (Ehrlich ascitic, S-180 ascitic and P-388 tumours). The complexes were characterized through their I.R. spectra as well as by chemical analysis.

The nephrotoxicity, hepatotoxicity and hematotoxicity displayed by the new Pt (II) and Pt(IV) complexes were monitored (%mg creatinine, %mg urea, "SGOT" and "GOT" enzymatic levels, L/N ratio) in the blood of the rats which received (i.p.) 1/2LD50 of each complex (at 192 hours). We performed also a histopathological study (optical microscopy) of the kidneys of the rats which received (at 192 hours) 1/2LD50 of the most active complex, that is cis-Pt^{II}(L)₂ (Cl)₂, where L = Mepacrine (LD50 = 350 mg/kg).

Key words: New Pt(II) and Pt(IV) complexes.- Trypanocidal effects.- Antitumour effects.- Toxicological profile.- Renal histopathology.

INTRODUCCIÓN

En los últimos seis años, N. Farrell y colaboradores (1-3), así como Craciunescu y colaboradores (4-8), Osuna y colaboradores (8, 9) y L.M. Ruiz Pérez y colaboradores (10-12) -los últimos tres grupos de investigación trabajando en España- pusieron de manifiesto las interesantes

actividades farmacológicas "in vivo" duales, desplegadas frente a distintas cepas de tripanosomas y líneas tumorales, tanto por los complejos del Pt(II) y Pt(IV), como por los complejos originados por los restantes cationes del grupo del platino (Rh(III), Rh(I), Rh(II), Ir(III), Ir(I), Ir(II), Os(III), Os(II), Ru(III), Ru(II)) (1-6). Hemos considerado de interés explorar las actividades farmacológicas duales "in vivo" de los complejos originados por los ligandos (L), derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos, teniendo en cuenta su comprobado efecto "in vivo"/"in vitro" como moduladores de la "SOS" (superóxido dismutasa) así como el hecho de que los complejos del cis-PtII(L)₂ (X)₂ (donde L = 1,2 diaminociclohexano y X- = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos), sintetizados por Craciunescu y colaboradores (1-6) presentaban interesantes actividades anticancerosas "in vivo" y, a la vez bajas toxicidades renales. En cuanto a los ligandos (L) seleccionados entre los medicamentos antimaláricos clásicos (derivados de aminoquinoleína y los derivados de acridina) su elección se hizo recordando las excelentes actividades antiparasitarias (antileishmaniásicas y antitripanosómicas) desplegadas "in vitro"/"in vivo" por los complejos estudiados por S.L. Croft y Craciunescu (12), así como por N. Farrell y colaboradores (1), y formulados como (Rh^{III} (L)₄(Cl)₂)⁺ Cl⁻ (L = "Mepacrina" y/o "Primaquina") y respectivamente (Rh^{II} (CH₃COO)₂ (L)_n)⁰, donde n = 1 ó 2 y L = "Cloroquina" y/o otros derivados de aminoacridina.

En este trabajo se presentan las actividades farmacológicas duales desplegadas "in vivo" por los siguientes tipos estructurales (complejos del Pt(II) y del Pt(IV)).

- Complejos neutros del Pt(II), de estructura presumiblemente cuadrado plana, (Pt^{II}(L)₂)₀, donde L = anilinditiocarbamato; 2-aminotiazol ditiocarbamato; 2-amino-4-bromotiazol ditiocarbamato; 2-amino-4-feniltiazol ditiocarbamato; imidazol ditiocarbamato; N-hexil ditiocarbamato; ciclohexil ditiocarbamato; ciclopentil ditiocarbamato; indazol ditiocarbamato; benzimidazol ditiocarbamato; 5-nitroimidazol ditiocarbamato; etilxantato; alil xantato.
- Complejos catiónicos del Pt(IV) de estructura (Pt^{IV}(L)₂)⁺² 2Cl⁻, donde L = los ligandos (L) descritos más arriba (derivados de ditiocarbamatos y xantatos).

c) Complejos neutros del Pt(II) de simetría molecular "cis", $\text{cis-Pt(L)}_2(\text{Cl})_2$, donde L = medicamentos antimalárico clásico ("Mepacrina", "Primaquina", "Amodiaquina", "Lepidina").

En el diseño de los complejos del Pt(II) de estructura cuadrado plana $(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2)^0$ y $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2(\text{Cl})_2$ hemos tenido también en cuenta su posible mecanismo de acción alquilante y/o intercalante sobre el ADN de las células tumorales y del ADN del kinetoplasto de los tripanosomas, similar al que presentaba tanto el $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_3(\text{Cl})_2$ ("Neoplatin") como los complejos $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{Tranilcipromina})_2(\text{Cl})_2$ y cis-Pt(L)(X)_2 sintetizados por Craciunescu y colaboradores (1-6) tanto sobre el ADN tumoral como sobre el ADN del kinetoplasto (*T. cruzi*) (10, 11). Los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) han sido ensayados frente a las ratas infectadas con las siguientes líneas de infección tripanosómica: *T. evansi* (India), *T. evansi* (venezuelense), *T. equiperdum*, *T. congolense*, *T. rhodesiense*. También han sido ensayados los nuevos complejos sobre las ratas portadoras de tumores ascíticos de Ehrlich, ascíticos S-180 y leucémicos P-388. El perfil toxicológico de los nuevos complejos se ha medido en la sangre de las ratas (a las 192 horas), a las que se les administró (vía i.p.) 1/2LD50 de cada complejo, mediante los parámetros % mg de urea, % mg creatinina, niveles enzimáticos "SGOT" y "GOT", cociente L/N (L = Linfocitos, N = Neutrófilos). También se ha realizado el estudio de histopatología renal (microscopía óptica) de los cortes semifinos de los riñones de las ratas que recibieron 1/2LD50 del complejo más activo, es decir $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2(\text{Cl})_2$, donde L = "Mepacrina".

Los más de 20 nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) han sido caracterizados a través de los datos de los análisis químicos y de sus espectros I.R.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Síntesis de los complejos neutros $(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2)^0$, donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos

Los nuevos complejos $(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2)^0$ se han obtenido por la reacción de 1 g $\text{K}_2(\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_4)$ disuelto en 100 cm³ de agua, con la cantidad correspondiente de los ligandos (L) -en forma de sales $\text{L}^- \text{K}^+$ - disueltas en 200 cm³ de mezcla caliente (ebullición) 2:1 = etanol: agua.

La mezcla total de reacción se calienta a reflujo, bajo fuerte agitación, hasta que alcance 1/4-1/5 del volumen inicial. Se deja enfriar a la temperatura ambiente 1 hora, y se filtran los complejos del Pt (II) de color amarillo intenso sobre crisoles G4. Se lavan con 100 cm³ etanol y con 100 cm³ éter, y se guardan en un desecador sobre CaCl_2 .

Se ha trabajado siempre respetando las estequiometrías (Pt(II): L = 1:2)

Los nuevos complejos son poco solubles en el agua (0,001-0,005 mg/ml), etanol y CH_2Cl_2 , pero son bastante solubles en DMSO y en DMF. Son estables a la exposición al aire y a la luz. Los rendimientos de obtención son de un 80-85% de los valores calculados teóricamente.

2. Síntesis de los complejos catiónicos $(\text{Pt}^{\text{IV}}(\text{L})_2)^{+2} 2 \text{Cl}^-$, donde L = derivados de ditiocarbamatos y xantatos.

Los nuevos complejos catiónicos $(\text{Pt}^{\text{IV}}(\text{L})_2)^{+2} 2 \text{Cl}^-$ se han obtenido según el siguiente método:

1 g $\text{K}_2(\text{Pt}^{\text{IV}}\text{Cl}_6)$ o bien 1 g $\text{Na}_2(\text{Pt}^{\text{IV}}\text{Cl}_6)$ se disuelve a la temperatura ambiente en 150 cm³ agua. Se le añade la cantidad correspondiente del ligando (L) -en forma de sal $\text{L}^- \text{K}^+$ - disuelto en 200 cm³ de mezcla caliente (ebullición) 2:1 = etanol:agua.

La mezcla total de reacción se calienta (ebullición), bajo fuerte agitación, hasta que alcance 1/4-1/5 del volumen inicial. Se deja reposando a la temperatura ambiente 1-2 horas y se filtra el precipitado microcristalino de color amarillo pardo o marrón sobre crisoles G4. Se lava con 50 cm³ etanol y con 100 cm³ éter. Se guardan los nuevos complejos en un desecador sobre CaCl_2 .

Se ha trabajado siempre respetando las estequiometrías Pt(IV): L = 1:2.

Los complejos catiónicos del Pt(IV) se obtuvieron con resultados cercanos al 50% respecto a los rendimientos teóricos. Son poco solubles en el agua, pero bastantes solubles en alcoholes, DMSO y en DMF.

Todos los ligandos (L), empleados en forma de sales $\text{L}^- \text{K}^+$ - descritos en el capítulo I del presente trabajo- han sido sintetizados en nuestros laboratorios (derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos).

3. Síntesis de los complejos $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$ donde $L =$ medicamentos antimaláricos.

1 g $K_2(Pt^{II}Cl_4)$ se disuelve en unos 50 cm³ agua y se le añade bajo fuerte agitación una disolución caliente (ebullición) del ligando (L) disuelto en 100 cm³ - 150 cm³ de mezcla 2:1 etanol:agua.

La mezcla total de reacción se agita fuertemente durante 3-6 horas ($t = 40-60^\circ C$), al cabo de las cuales precipitan los complejos $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$ en forma de microcristales de color amarillo o bien amarillopardo. Se filtran sobre crisoles G4, y se lavan con 100 cm³ agua, 100 cm³ etanol y 100 cm³ éter etílico. Los complejos se guardan en un desecador sobre $CaCl_2$. Se ha trabajado siempre respetando las estequiometrías Pt(II): L = 1:2 y empleando los siguientes ligandos (L) -medicamentos antimaláricos-: "Mepacrina", "Amodiaquina", "Primaquina" y "Lepidina".

Los rendimientos de obtención rondan un 78-80% de los rendimientos teóricos. Los complejos $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$ son poco solubles en el agua y alcoholes pero algo solubles en DMSO y en DMF.

4. Análisis químicos de los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) y espectros I.R.

Los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) han sido atacados (en caliente) por agua regia, y el contenido en Pt % hallado con la ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica AA60 Techtron. El contenido en N % ha sido hallado por el método de Kjeldhal y el contenido en Cl % por el método de Volhard. El contenido en S %, C %, H % se ha determinado a través de métodos estándar de microcombustión. Los resultados de los análisis químicos (realizados en nuestro laboratorio) no difieren en $\pm 0,5$ % de los valores teóricos calculados para las estructuras propuestas. Los espectros I.R. (4000-250 cm⁻¹) se obtuvieron con un aparato I.R. Perkin Elmer 457.

5. Ensayos antitripanosómicos "in vivo"

Los nuevos complejos han sido administrados por vía s.c. (como suspensiones en "Tween") a las ratas (cepa "Swiss white mice") infectadas previamente (2 horas) con 10^5 parásitos (vía i.p.). Para cada dosis de cada complejo se ha empleado un lote de 6 ratas -véase Tabla I-.

TABLA I

Resultados de los ensayos antitripanosómicos "in vivo" con los nuevos complejos del Pt(II) y Pt(IV)

Complejos	Parásitos	Dosis (en 10 ⁻⁶)	Clave actividad
$Pt^{II}(L_1)_2^o$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	T. rhodesiense	400	Muy activo
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	T. evansi (venezuelense)	400	Activo
		200	Moderadamente activo
		100	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	T. evansi (India)	400	Marginalmente activo
		200	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	T. rhodesiense	600	Activo
		400	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	T. evansi (venezuelense)	400	Moderadamente activo
		200	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	T. evansi (India)	400	Marginalmente activo
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	T. rhodesiense	600	Activo
		400	Activo
		200	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	T. evansi (venezuelense)	400	Marginalmente activo
		200	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	T. evansi (India)	400	Marginalmente activo
		200	Activo
$cis-Pt^{II}(L_{15})_2(Cl)_2$	T. rhodesiense	400	Moderadamente activo
		200	Activo
$(Pt^{II}(L_2)_2)^o$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo
$(Pt^{IV}(L_1)_2)^{2+}2Cl^-$	T. rhodesiense	600	Moderadamente activo
		400	Activo
$(Pt^{II}(L_3)_2)^o$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo
$(Pt^{IV}(L_3)_2)^{2+}2Cl^-$	T. rhodesiense	400	Moderadamente activo
$(Pt^{IV}(L_6)_2)^{2+}2Cl^-$	T. rhodesiense	600	Moderadamente activo
		400	Activo
$(Pt^{II}(L_4)_2)^o$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo

TABLA I CONTINUACIÓN

$(Pt^{II}(L_9)_2)^o$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo
$(Pt^{II}(L_{10})_2)^o$	T. rhodesiense	600	Marginalmente activo

Las claves de los ligandos (L) son las siguientes: L_1 = Anilinditiocarbamato; L_2 = 2aminotiazol ditiocarbamato; L_3 = 2 amino 4-bromotiazol ditiocarbamato; L_4 = imidazol ditiocarbamato; L_5 = N-hexil ditiocarbamato; L_6 = ciclohexil ditiocarbamato; L_7 = ciclopentil ditiocarbamato; L_8 = imidazol ditiocarbamato; L_9 = Benzimidazol ditiocarbamato; L_{10} = 5 nitro imidazol ditiocarbamato; L_{11} = etil xantato; L_{12} = "Mepacrina"; L_{13} = "Primaquina"; L_{14} = "Amodiaquina"; L_{15} = "Lepidina". Los complejos que no aparecen en la Tabla han resultado totalmente inactivos frente a todas las líneas de infecciones tripanosómicas (para dosis únicas de 600, 400, y 200 mg/Kg).

El criterio para medir el efecto antitripanosómico "in vivo" ha sido el tiempo de sobrevivencia de los animales y, eventualmente la parasitemia medida en la sangre el día 8º y/o el día 30º; T = tiempo de sobrevivencia animales no tratados e infectados (controles), en días; 2T - moderadamente activo; 2T + 8 "Activo" (ningún parásito detectable el 8º día); 2T + 30 "Muy activo" (ningún parásito detectable el día 30); T + 4 = Marginalmente activo.

Se han empleado las siguientes líneas de parásitos: T. evansi (venezuelense), T. evansi (India), T. equiperdum, T. congolense, T. rhodesiense - véase la Tabla I.-

6. Ensayos antitumorales "in vivo"

Los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) han sido administrados (vía i.p. como suspensiones en 5 % glucosa en el agua) a las ratas de la cepa "Swiss white mice", los días 1, 5, 9, siendo el día 0 el día del implante de los tumores. Se han empleado ratas de la cepa "Swiss white mice" (un lote de seis ratas para cada dosis de los complejos. -Véase la Tabla II.-

TABLA II

Resultados de los ensayos antitumorales "in vivo" con los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV)

Complejos	Tumores	Dosis en 10^{-6}	T/C %
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	Ascíticos	600	271
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	Landschutz	400	265
		200	162
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	Ascíticos	600	251
	Ehrlich	400	230
		200	150
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	P-388	600	131
		400	125
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	Ascíticos	400	250
	Landschutz	200	151
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	P-388	400	150
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	Ascíticos	400	212
	Ehrlich		
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	Ascíticos	400	200
	Landschutz	200	150
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	Ascíticos	400	171
	Landschutz	200	153
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	P-388	400	127
$cis-Pt^{II}(L_{15})_2(Cl)_2$	Ascíticos	400	171
	Landschutz	200	151
$cis-Pt^{II}(L_{15})_2(Cl)_2$	Ascíticos	400	155
	Ehrlich	200	153
$(Pt^{IV}(L_6)_2)^{+2}2Cl^-$	Ascíticos	600	155
	Landschutz	400	150
		200	149
$(Pt^{IV}(L_9)_2)^{+2}2Cl^-$	Ascíticos	600	160
	Landschutz	400	155
		200	150
$(Pt^{IV}(L_1)_2)^{+2}2Cl^-$	Ascíticos	400	175
	Landschutz	200	160
$(Pt^{IV}(L_5)_2)^{+2}2Cl^-$	Ascíticos	400	170
	Landschutz		
$(Pt^{IV}(L_6)_2)^{+2}2Cl^-$	Ascíticos	400	155
	Ehrlich		
$(Pt^{IV}(L_6)_2)^{+2}2Cl^-$	P-388	600	128
		400	125

TABLA II CONTINUACIÓN

$(Pt^{IV}(L_5)_2)^{+2}2Cl^-$	Ascítico	400	170
	Landschutz	200	165
		100	152
$(Pt^{II}(L_1)_2)^o$	Ascítico	400	155
	Landschutz	200	150

Las claves de los ligandos (L_1 - L_{15}) son los que aparecen en la Tabla I. Los complejos que no aparecen en esta Tabla, han sido inactivos frente a todas las líneas tumorales (dosis totales de 600, 400, 200 y 100 mg/kg).

Se han empleado las siguientes líneas tumorales: ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz, P-388 leucémicos. Estos ensayos se han realizado en colaboración con el "National Cancer Institute" (USA).

7. Estudios de toxicidad

Los valores LD50 de los complejos pertenecientes a las series $(Pt^{II}(L)_2)^o$ y $(Pt^{IV}(L)_2)^{+2}2Cl^-$ (donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos) oscilan en los rangos de 600-1050 mg/kg y 250-700 mg/kg, respectivamente (vía i.p. como suspensiones en "Tween"). Los complejos $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$, donde L = medicamentos antimaláricos, poseen unos valores LD50 aproximados, comprendidos en el rango 250-650 mg/kg (vía i.p. como suspensiones en "Tween").

Los complejos han sido administrados a un lote de cuatro ratas de las cepas "Swiss white mice" -1/2LD50 vía i.p. como suspensiones en "Tween"- y los contenidos % mg urea, % mg creatinina, "GOT", "SGOT", L/N medidos a las 192 horas en la sangre de las ratas -véase la Tabla III.

TABLA III

Complejos	% mg Urea	% mg creatinina	"GOT"	"SGOT"	L/N
Controles	42,50	0,621	51,20	17,91	6,15
$cis-Pt^{II}(L_{12})_2(Cl)_2$	57,20	0,667	55,20	18,51	5,93
$cis-Pt^{II}(L_{13})_2(Cl)_2$	58,13	0,71	51,20	19,40	5,94
$cis-Pt^{II}(L_{14})_2(Cl)_2$	59,02	0,77	59,80	18,20	5,97
$cis-Pt^{II}(L_{15})_2(Cl)_2$	59,11	0,67	58,70	18,15	6,02
$(Pt^{IV}L_1)_2^o$	41,70	0,63	69,20	17,94	6,01
$(Pt^{IV}L_2)_2^o$	43,01	0,625	68,70	18,70	6,06
$(Pt^{IV}L_3)_2^o$	43,25	0,641	69,30	12,50	6,07
$(Pt^{IV}L_4)_2^o$	43,15	0,641	67,70	22,84	6,00
$(Pt^{IV}L_5)_2^o$	43,20	0,627	68,51	23,77	5,89
$(Pt^{IV}L_6)_2^o$	42,80	0,631	68,20	22,65	5,92
$(Pt^{IV}L_7)_2^o$	42,90	0,64	67,20	22,91	5,90
$(Pt^{IV}L_8)_2^o$	42,81	0,65	67,90	23,10	5,89
$(Pt^{IV}L_9)_2^o$	42,81	0,645	67,20	19,50	5,90
$(Pt^{IV}L_{10})_2^{+2}2Cl^-$	42,90	0,644	67,30	19,71	5,99
$(Pt^{IV}L_{11})_2^{+2}2Cl^-$	42,95	0,681	67,20	19,88	6,01
$(Pt^{IV}L_{12})_2^{+2}2Cl^-$	42,90	0,670	67,20	19,51	5,90
$(Pt^{IV}L_{13})_2^{+2}2Cl^-$	42,80	0,66	67,15	18,93	6,02
$(Pt^{IV}L_{14})_2^{+2}2Cl^-$	42,87	0,64	67,30	18,90	6,07
$(Pt^{IV}L_{15})_2^{+2}2Cl^-$	42,85	0,651	67,50	19,10	5,90
$(Pt^{IV}L_{16})_2^{+2}2Cl^-$	42,85	0,64	67,80	19,02	5,89

Las claves de los ligandos (L) son las que aparecen en la Tabla I (L_{121} - L_{16})

8. Histopatología renal

En la Figura 1 (que comprende las microfotografías 1-7) se detallan los estudios de microscopía óptica de los cortes semifinos de los riñones de las ratas que recibieron 1/2LD50 (por vía i.p. como suspensiones en "Tween", a las 192 horas) del complejo $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$, donde L = "Mepacrina" (LD50 = 350 mg/Kg).



Figura 1.- (Comprende las microfotografías 1-7). Histopatología renal del complejo cis- $\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2(\text{Cl})_2$, donde L = "Mepacrina" (1/2 LD50 vía i.p. y lectura a las 192 horas):



Figura 1.- Continuación.

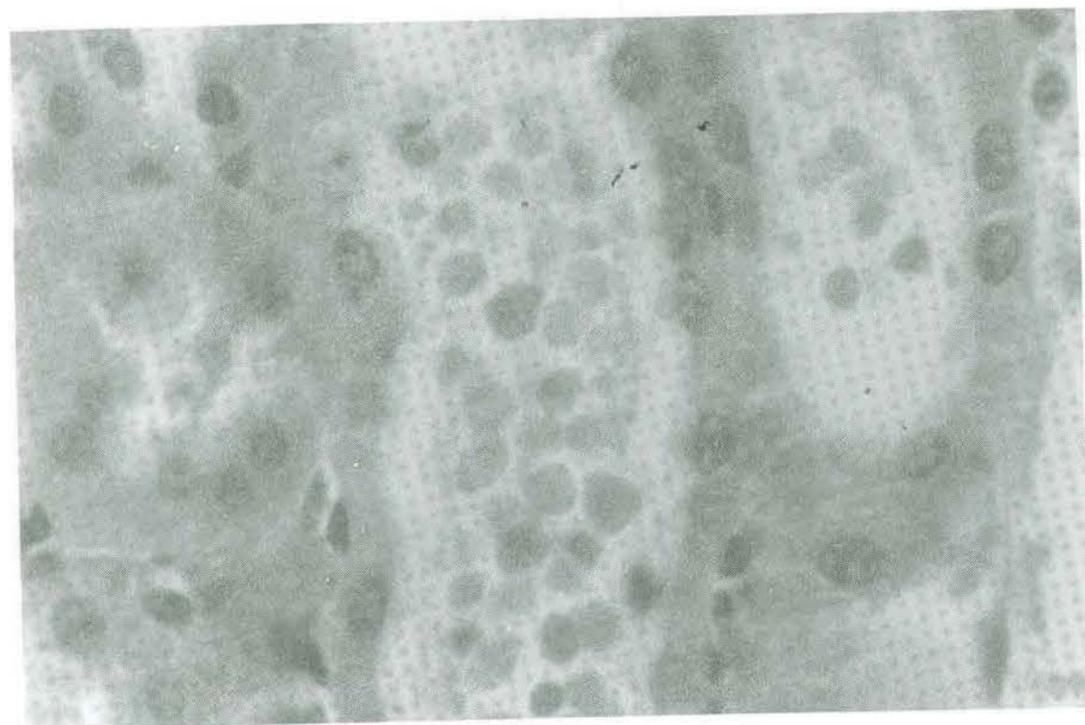
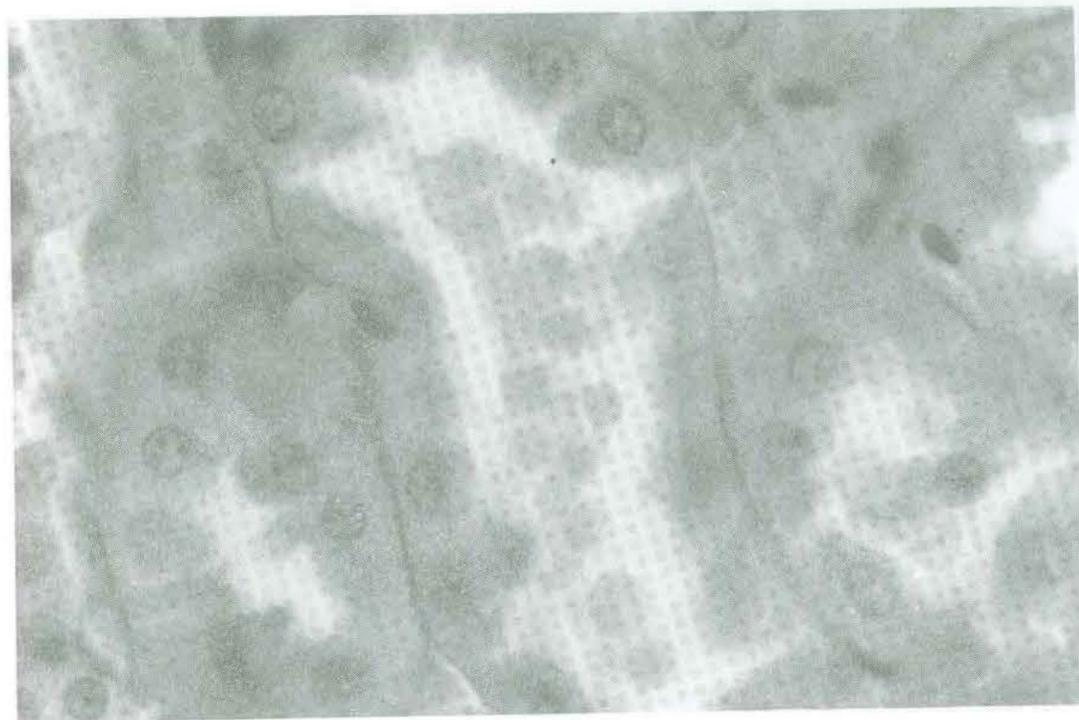


Figura 1.- Continuación



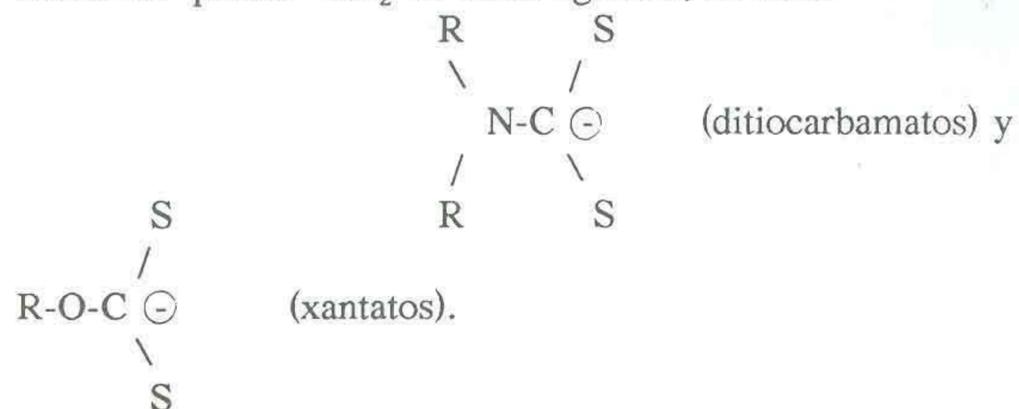
Figura 1.- Continuación

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis químicos de estos nuevos complejos del Pt(II) y Pt(IV), indican (ya que no difieren en $\pm 1\%$ de los resultados teóricos) que las estructuras generales propuestas parecen ser correctas. Los espectros I.R. de los complejos $(Pt^{II}(L)_2)^0$ y $(Pt^{IV}(L)_2)^{+2} 2Cl^-$ (donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos) presentan las siguientes características generales:

a) Todos estos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) presentan una única banda, de intensidad moderada, en el rango de $460-495\text{ cm}^{-1}$ y asignada a las vibraciones de tensión ν Pt-S. Estas bandas están ausentes en los espectros I.R. de los ligandos puros (en forma de sales).

b) Todos los complejos presentan una única banda, de intensidad moderada, en el rango de frecuencias 1100-1000 cm^{-1} y asignada a las vibraciones de tensión $\nu\text{C-S}$. Este hecho indica (11, 12, 20) que los ligandos (L) coordinan hacia el Pt (II) o hacia el Pt(IV) en las formas catiónicas que implican la existencia de una delocalización electrónica sobre las "pinzas" CS_2 de estos ligandos, es decir



c) Ninguno de los complejos $(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2)^0$ presenta bandas I.R. de absorción en la zona de las bajas frecuencias (300-330 cm^{-1}); ya que al no contener enlaces Pt-Cl no se originan, lógicamente, frecuencias de tensión $\nu\text{Pt-Cl}$.

d) Los complejos catiónicos $(\text{Pt}^{\text{IV}}(\text{L})_2)^{+2} 2\text{Cl}^-$ tampoco presentan bandas de absorción $\nu\text{Pt-Cl}$ (rango 300-330 cm^{-1}), ya que no poseen enlaces covalentes Pt-Cl. Se puede visualizar su estructura como la de unos cationes complejos divalentes $(\text{Pt}^{\text{IV}}(\text{L})_2)^{+2}$, siendo el entorno del Pt(IV) de tipo, presumiblemente cuadrado plano.

En cuanto a los espectros I.R. de los complejos $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2(\text{Cl})_2$ donde L = medicamentos antimaláricos (derivados de las aminoquinoleínas y/o aminoacridinas), se pueden poner de manifiesto los siguientes aspectos generales:

- 1) Los complejos presentan dos bandas de absorción en la región 330-300 cm^{-1} asignadas a las vibraciones de tensión $\nu\text{Pt-N}$ y que indican que la simetría molecular es de tipo "cis".
- 2) Los complejos presentan una banda débil en el rango 460-492 cm^{-1} y asignada a las vibraciones de tensión $\nu\text{Pt-N}$ (pertenecientes a los enlaces Pt-N, puesto que los ligandos (L) coordinan hacia el catión Pt(II) a través de sus átomos N. heterocíclicos).
- 3) Todos los complejos presentan unas bandas intensas (bandas únicas) en el rango 1590-1660 cm^{-1} y asignadas a las vibraciones de tensión $\nu\text{C}=\text{N}$;

lo que indica que los ligandos (L) coordinan hacia el Pt(II) a través de sus átomos de nitrógeno heterocíclicos, quedando no implicados en el proceso de coordinación los grupos $-\text{NH}-$ o bien $-\text{NH}_2$ o $-\text{NR}_2$ de los ligandos (grupos exocíclicos). Esta banda de tensión $\nu\text{C}=\text{N}$ está desplazada (respecto a los ligandos (L) puros), en los complejos, con unos 10-35 cm^{-1} hacia menores frecuencias, lo que indica que los ligandos (L) -derivados de aminoquinoleína y/o derivados de aminoacridina- coordinan hacia los cationes Pt(II), exclusivamente a través del átomo N heterocíclico, actuando por lo tanto como ligandos neutros y monodentados. En cuanto a los efectos antitripanosómicos "in vivo" -véase la Tabla I- podemos desprender las siguientes observaciones generales:

- a) Los complejos más activos pertenecen a la serie $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2(\text{Cl})_2$, donde L = medicamento de acción antimalárica; siendo el más activo el complejo donde L = "Mepacrina".
- b) La actividad antitripanosómica disminuye cuando se pasa desde la serie $(\text{Pt}^{\text{IV}}(\text{L})_2)^{+2} 2\text{Cl}^-$ hacia la serie $(\text{Py}^{\text{II}}(\text{L})_2)^0$ (en ambas series los ligandos L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos).
- c) Los complejos donde L = derivados de ditiocarbamatos son más activos que los complejos donde L = derivados de xantatos.
- d) La línea de infección parasitaria T. rhodesiense es la más sensible a la actuación de los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV), seguida de la línea de infección T. evansi (venezuelense).
- e) Los parásitos T. evansi (India), T. equiperdum y sobre todo T. congolense son muy resistentes a la actuación "in vivo" de los nuevos complejos del Pt(II) y Pt(IV).
- f) Es muy interesante la actuación "in vivo" del complejo $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{L})_2(\text{Cl})_2$, donde L = "Mepacrina" frente a la línea de parásitos T. rhodesiense, ya que inducen valores de sobrevivencia superiores a los 30 días ("curativos") para dosis únicas del orden de 200-300 mg/kg (vía s.c.).

La actividad desplegada por este complejo es además muy prometedora, ya que precisamente los parásitos T. rhodesiense son muy patógenos para el hombre (agentes patógenos de la "enfermedad del sueño").

También es interesante el efecto desplegado "in vivo" por este complejo, sobre las cepas de T. evansi (venezuelense), ya que también posee (para dosis únicas de 200-300 mg/kg vía s.c.) "actividad fuerte" (curativo), induciendo tiempos de sobrevivencia $2T + 20$ (superiores a los

30 días). Si bien tanto las cepas de *T. evansi* como *T. equiperdum* y *T. congolense* no son patógenas para el ser humano, dicho complejo podría presentar cierto interés en el ámbito de la quimioterapia de las tripanosomiasis estudiadas por las ciencias veterinarias ("Nagana", etc.).

Respecto a las actividades antitumorales "in vivo" que presentan los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV), -véase la Tabla II- podríamos poner de manifiesto los siguientes aspectos generales:

- 1) Las líneas de tumores ascíticos de Ehrlich y S-180 ascítico, son más sensibles a la actuación de los complejos del Pt(II) y Pt(IV) que la línea de tumores leucémicos P-388.
- 2) Los tumores Ehrlich son los que mayor sensibilidad presentan frente a estos nuevos complejos del Pt(II) y Pt(IV).
- 3) Ninguno de los nuevos complejos del Pt(II) y Pt(IV) no induce valores T/C % iguales o superiores al medicamento anticanceroso de referencia "Neoplatin" (cis-Pt(NH₃)₂(Cl)₂).
- 4) Los complejos más activos son los que pertenecen a la serie cis-Pt^{II}(L)₂(Cl)₂, donde L = medicamento antimalárico; siendo el más activo el complejo donde L = "Mepacrina".
- 5) La actividad antitumoral disminuye en la secuencia de los complejos (Pt^{IV}(L)₂)⁺² 2Cl⁻ hacia la secuencia de los complejos pertenecientes a la estructura general (Pt(L)₂)⁰, siendo L = derivados de ditiocarbamatos o xantatos.
- 6) Los complejos donde los ligandos L, son derivados de ditiocarbamatos son algunos más activos que los complejos donde L = derivados de xantatos (estructuras generales (Pt^{IV}(L)₂)⁺² 2Cl⁻ y (Pt^{II}(L)₂)⁰).
- 7) *Hay un claro paralelismo entre las actividades anticancerosas "in vivo" y las actividades antitripanosómicas "in vivo" (véase también la Tabla I). Cuanto mayor actividad antitumoral presenta un complejo, también mayores efectos antitripanosómicos se pueden observar. Esta última observación reforzaría la hipótesis de que el posible mecanismo de acción de los complejos neutros o catiónicos del Pt(II) y del Pt(IV) podría estar relacionado con un ataque selectivo, directo, sobre el ADN tumoral y sobre el ADN del kinetoplasto de los parásitos, teniendo estos complejos el Pt(II) y el Pt(IV) -de simetría cuadrado plana- una acción intercalante y alquilante sobre los pares G-C del ADN (de los tumores o del kinetoplasto de las tripanosomas), similar a la desplegada por el complejo cis-*

Pt(NH₃)₂(Cl)₂ como por otros complejos del Pt(II) estudiados por Craciunescu (1-6) y por L.M. Ruiz Pérez y A. Osuna (8, 11) en España.

Examinando ahora los resultados que aparecen en la Tabla III, parece que de manera general los nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) pertenecientes a las series (Pt^{II}(L)₂)⁰ y (Pt^{IV}(L)₂)⁺² 2Cl⁻, donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos, presentan como toxicidad limitante una elevada hepatotoxicidad (elevaciones de los niveles "GOT" y "SGOT" en más de 25-40%, respecto a los controles), siendo en cambio nulo o escaso su potencial nefrotóxico y hematotóxico (ya que los valores % mg urea, % mg creatinina no suben en más de 10% respecto a los controles). Estos resultados no son sorprendentes, ya que precisamente varios ligandos azufrados (entre los que destaca el dietil ditiocarbamato) se emplean para reducir la nefrotoxicidad que presenta tanto el complejo cis-Pt(NH₃)₂(Cl)₂ ("Neoplatin"), así como otros complejos del Pt(II) y del Pt(IV).

En el caso de los complejos cis-Pt(L)₂(Cl)₂, donde L = medicamentos antimaláricos clásicos ("Primaquina", "Amodiaquina", "Mepacrina", "Lepidina") -véase la Tabla III- la toxicidad limitante parece ser la nefrotoxicidad (ya que se observan elevaciones de los niveles % mg urea, % mg creatinina superiores en 30-50% respecto a los controles). No obstante, estos complejos presentan unas suaves o bajas hepatotoxicidades y/o hematotoxicidades, ya que los niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT", así como el cociente L/N no varían en ± 10-15% respecto a los controles.

El estudio de microscopía óptica (véase la Figura 1, que comprende las microfotografías 1-7) de los cortes semifinos de los riñones de las ratas que recibieron 1/2 LD50 del complejo más interesante, es decir cis-Pt^{II}(Mepacrina)₂(Cl)₂, (LD50 = 375 mg/kg vía i.p. como suspensión en "Tween" ponen de relieve (a las 192 horas) la existencia de unos importantes efectos nefrotóxicos.

En la foto 1 (perteneciente a la Figura 1), microscopía óptica (x40), se pueden ver 2 glomérulos mostrando ligera hiperemia. Las estructuras tubulares muestran aplanamiento celular y áreas de tubuláresis, así como importante ocupación de luz tubular por material amiloideo y hemático. En la microfotografía 2 (también perteneciente a la Figura 1) (x40) se aprecia una gran área tubular con importantes afectaciones necróticas de las células y con almacenamiento albuminoideo-hemático en su luz.

En la microfotografía 3 (perteneciente también a la Figura 1), tinción hematoxilina-eosina (x200), se muestra en detalle la sección de túbulos renales conteniendo en su luz abundante material proteico y hemático con engrosamiento de la pared celular y pérdida parcial del ribete, así como un notable grado de tumefacción.

En la microfotografía 4 (perteneciente también a la Figura 1) (x40) aparece un área tubular con afectación de la estructura celular y contenido proteico-hemático en su luz. A la izquierda se observa parcialmente un glomérulo con afectación degenerativa y extravasado hemático.

Por ende, en las microfotografías 5, 6 y 7 (pertenecientes también a la Figura 1 (x40) se puede considerar la configuración posible de un proceso de nefrosis en grado I de índole tóxica.

IV CONCLUSIONES

De los más de veinte nuevos complejos del Pt(II) y del Pt(IV) pertenecientes a las estructuras generales: $(Pt^{II}(L)_2)^0$ y $(Pt^{IV}(L)_2)^{+2}2Cl^-$ (donde L = derivados de ditiocarbamatos y xantatos), así como $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$, donde L = medicamento antimalárico clásico (derivados de aminoquinoleína y derivados de aminoacridina) únicamente el complejo $cis-Pt^{II}(L)_2(Cl)_2$, donde L = "Mepacrina", se perfila como candidato interesante de acción antitripanosómica comprobada ("Curativo") frente, especialmente a T. rhodesiense (agente patógeno de la "enfermedad del sueño"). Para los restantes complejos se ponen de manifiesto, no obstante, relaciones farmacológicas duales "in vivo" (antitumorales y antitripanosómicas) y la existencia de unas moderadas toxicidades.

V. AGRADECIMIENTOS

El profesor Dr. D.G. Craciunescu agradece a las compañías "Johnson Matthey Ltd (Inglaterra) y "Platinum Rustenburg Mines" (Sur Africa), por las sales $K_2(PtCl_4)$ recibidas gratuitamente.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) FARRELL, N. Y COL. (1984) *J. Biochem. Pharm.* 33: 961-971.
- (2) FARRELL, N. Y COL. (1983). Ponencia presentada al "Congreso Int. Complejos del Grupo del Platino en la Quimioterapia del Cáncer". Vermont (USA) junio 1983.
- (3) FARRELL, N. Y COL. (1988). Comunicación privada al Prof. Dr. D. G. Craciunescu.
- (4) D. CRACIUNESCU Y COL. (1988). *An. Real Acad. Farmacia* 54: 442-466.
- (5) D. CRACIUNESCU Y COL. (1987) "*In vivo*" 1: 229-234.
- (6) D. CRACIUNESCU Y COL. (1989). *Anticancer Res.* 9: 781-786.
- (7) D. CRACIUNESCU Y COL. (1991) "*In vivo*" 5: 329-332.
- (8) OSUNA, A. Y COL. (1986). *Drus Res.* 36 (1): 13-16.
- (9) OSUNA, A. Y COL. *Drug Res.* 38 (1): 312-314.
- (10) RUIZ PÉREZ, L.M. Y COL. (1987) *Tropical Med. & Parasitology* 38: 45-48.
- (11) RUIZ PÉREZ, L.M. Y COL. *J. Parasitology* 73 (2): 272-277.
- (12) CROFT, S.L., NEAL, R., CRACIUNESCU, D., CERTAD FOMBONA, G (1992) *Tropical Med. & parasitology* 43: 24-27.