

Actividades farmacológicas duales "in vivo" (antitripanosómicas y antitumorales) y toxicidad desplegadas por los nuevos complejos neutros y octaédricos del Rutenio (II).

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

*Dept. Química Inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid. 28048 Madrid (España).*

C.I. GHIRVU

*Dept. Química Física, Facultad de Química,
Universidad "A.I. Cuza", 6600 -Iasi (Rumanía).*

E. GASTON DE IRIARTE.

*Dept. Urología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de
Madrid, 28034 Madrid (España).*

N. ERCOLI

*Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela,
Caracas (Venezuela).*

RESUMEN

En este trabajo se describe la síntesis y la caracterización físico-química (análisis químico y espectros I.R.) de unos 24 nuevos complejos neutros y octaédricos del Rutenio (II), pertenecientes a las siguientes estructuras generales:

a) Complejos neutros y octaédricos del Ru (II) pertenecientes a la estructura $[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L)_2]^0$ donde L= derivados de imidazol (medicamentos antifúngicos, medicamentos antitripanosómicos) o bien L= derivados de aminoquinoleína y/o aminoacridina (medicamentos antimaláricos).

b) Complejos dinucleares y neutros de Ru (II) pertenecientes a la estructura general $[Ru^{II}_2(Cl)_4(DMSO)_4(L)]^0$ donde L= diamidinas aromáticas (medicamentos clásicos antitripanosómicos como "Pentamidina", "Hexamidina", "Stilbamidina", 2-Hidroxistilbamidina", "BERENILE").

Los nuevos complejos han sido ensayados frente a los ratones infectados con las siguientes líneas de infección tripanosómicas: *T. brucei brucei*, *T. rhodesiense* y *T. cruzi* (epimastigotes). También han sido ensayados frente a los ratones portadores de las siguientes líneas tumorales líquidas: ascítico de Ehrlich, ascítico de Landschutz y tumores leucémicos P388. El perfil tóxico de los nuevos complejos del Ru (II) se ha valorado en la sangre de los ratones de la cepa "Swiss white mice" (a las 192 horas) que habían recibido por vía i.p. 1/2 de la DL_{50} de cada complejo mediante los parámetros: %mg urea, %mg creatinina, niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT", cociente L/N (L= Linfocitos, N= Neutrófilos). Se ha realizado también un estudio de Microscopía electrónica de los parásitos *T. rhodesiense*, tratados durante 48 horas "in vitro" con 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ del complejo más activo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L=2-hidroxibenzimidazol. Además, hemos realizado un estudio de orbitales moleculares Hückel, para las moléculas de los ligandos derivados de imidazol, para apreciar mejor las posibles relaciones estructura-actividad farmacológica existentes en el caso de estos nuevos complejos neutros y octaédricos del Rutenio(II).

Palabras claves: Complejos del Ru(II). Antitumorales. Antitripanosómicos. Toxicidades. Microscopía Electrónica. Calculos O.M. Hückel.

SUMMARY

Dual pharmacological activities "in vivo" (trypanocidal and antitumour) and toxicity displayed by the new neutral and octahedral Rutenium (II) complexes.

In this paper we report the synthesis and physico-chemical characterization of 24 new neutral and octahedral Rutenium(II) complexes belonging to the following structures:

- Neutral and octahedral Ru(II) complexes $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ where L= imidazole derivatives (e.g. classical antifungal agents, classical trypanocidal drugs), amino quinoline and amino acridine derivatives (classical antimalarial drugs).
- Neutral and dinuclear Ru(II) complexes, $[\text{Ru}_2^{\text{II}}(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ where L= classical aromatic diamidines (trypanocidal drugs e.g. "Pentamidine", "Stilbamidine", "2-Hidroxistilbamidine", "Hexamidine", "Berenile").

The new Ru(II) complexes were assayed against rats bearing the following established liquid tumours: Ehrlich ascitic, Landschutz ascitic, leukemic P 338 tumours. They were also assayed against rats infected with *T. brucei brucei*, *T. rhodesiense*, *T. cruzi* (epimastigotes). The toxicities displayed by the administration of the 1/2 LD_{50} of each complex, were monitored (at 192 hours) in the blood of the rats, taking into account the following parameters; %mg urea, %mg creatinine, enzymatic levels "GOT", "SGOT" and the ratio L/N (L=Lymphocytes, N= Neutrophils).

We performed also an Electronic Microscopy examination (at 48 hours) of

the *T. rhodesiense* parasites treated "in vitro" with 1-10 $\mu\text{g/ml}$ of the most active complex, that is $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ where L= 2-Hidroxibenzimidazole, as well as the M.O. Hückel calculations for the imidazole derivatives ligands, in order to draw structure - activity relationships.

Key words: New Ru(II) complexes, Trypanocidal effects. Antitumour effects. Toxicities. Electron Microscopy. M.O. Hückel calculations.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de las actividades farmacológicas duales "in vivo" desplegadas por varios complejos neutros del Rutenio (II) ha quedado limitado a los complejos neutros y tetraédricos de formulación general $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})_4]$ donde L= ligandos azufrados monoaniónicos y bidentados (derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos), sintetizados por D.G. Craciunescu y colaboradores(1). Sin embargo M.J. Clarke y colaboradores así como Sava y colaboradores (2-7) postularon el gran interés que revisten como agentes antitumorales varios complejos neutros del Ru(II) así como varios complejos catiónicos sobre el ADN tumoral; caracterizando incluso varios complejos del Ru(II) con la guanosina.

Es interesante observar que N. Farrel describió la intensa actividad antitripanosómica desplegada "in vivo" y también "in vitro" por varios complejos catiónicos del Ru (II), partiendo de las antiguísimas observaciones hechas por Nicolle y Mesnil (8-9) en cuanto al potencial tripanocida que presentaba el producto comercial llamado "Rojo de Rutenio" (un complejo trinuclear, catiónico en el cual se identificó la presencia de cationes Ru(II) y también Ru (IV)). Finalmente mencionaremos que en fecha reciente, Chan y colaboradores (10-11), describieron las interesantes propiedades radioprotectoras que presentaban amplias series de complejos neutros y octaédricos del Ru(II) pertenecientes a la estructura general $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L= derivados de nitroimidazol, complejos que además presentaban una buena solubilidad en el agua.

En este trabajo presentamos un estudio de las actividades antitumorales y antitripanosómicas "in vivo" (ratas) desarrolladas por unos 24 complejos neutros y octaédricos del Ru(II) pertenecientes a dos grandes series:

- a) Complejos neutros y octaédricos del Ru(II) de estructura general $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L= derivados de imizadol (medicamentos clásicos antifúngicos y antitripanosómicos), o bien L= derivados de aminoquinoleína y/o aminoacridina (medicamentos clásicos antimaláricos).
- b) Complejos dinucleares y neutros del Ru(II) donde se mantiene el entorno octaédrico alrededor de cada uno de los cationes Ru(II), de estructura general $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ donde L= ligando puente de actuación tetradentada (amidinas aromáticas, medicamentos clásicos antitripanosómicos "Pentamidina", "Stilbamidina", "2-Hidroxistilbamidina", "Hexamidina", "Berenile"). Los nuevos complejos han sido caracterizados a través de los resultados de los análisis químicos y mediante el estudio de sus espectros I.R. El efecto antitumoral "in vivo" se ha medido frente a los ratones de la cepa "Swiss white mice" portadores de las siguientes líneas de tumores líquidos: ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz y tumores leucémicos P 338. Los efectos antitripanosómicos han sido valorados frente a los ratones de la cepa "Swiss white mice" infectados con las siguientes líneas de infección tripanosómica: T. brucei brucei, T. rhodesiense y T. cruzi (epimastigotes). El perfil tóxico de los nuevos complejos neutros del Ru(II) se ha valorado, a las 192 horas, en la sangre de los ratones que recibieron por vía i.p. 1/2 de la DL_{50} de cada complejo, mediante la determinación de los siguientes parámetros: %mg urea, %mg creatinina, niveles enzimáticos "SGOT" y "GOT" y cociente L/N (L= Linfocitos, N= Neutrófilos).

Con el fin de dilucidar el posible mecanismo de acción antitripanosómica de los nuevos complejos del Ru(II), hemos realizado un estudio de Microscopía electrónica (a las 48 horas) de los parásitos tratados "in vitro" con concentraciones en el rango de 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del complejo más activo, es decir $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L= 2-Hidroxibenzimidazol.

También se ha realizado un cálculo de Orbitales Moleculares Hückel para los ligandos puros (derivados de imidazol) con el fin de establecer posibles relaciones estructura-actividad farmacológica. La elección de los ligandos se ha realizado tomando en cuenta el hecho de que recientemente habíamos descrito las interesantes

actividades farmacológicas duales "in vivo" (antitripanosómicas y antitumorales) que presentaban otros complejos originados por los cationes Ru(III), Rh(III), Ir(III), Rh(II), Ir(II), Os(IV), Pt(II) y Pt(IV) de interés en el ámbito de la metaloterapia (12-20).

II. PARTE EXPERIMENTAL

I) Síntesis de los complejos neutros y octaédricos del Ru(II) de estructura general $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L=derivados de imidazol, derivados de aminoquinoleina y derivados de aminoacridina.

1g del complejo neutro $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_4]^0$ se disuelve en unos 100 mL de mezcla 1:1 Etanol-Agua bajo fuerte agitación y calentamiento (ebullición). Se le añade, bajo agitación, la cantidad correspondiente del ligando (L) disuelto en unos 200 mL de mezcla 3:1 Etanol-Agua (ebullición). La mezcla total de la reacción se concentra a reflujo bajo fuerte agitación, hasta que alcance el volumen final de unos 25-30 mL. Se deja reposar unos 15 minutos a la temperatura ambiente y se filtra el precipitado microcristalino de color marrón o bien amarillo-marrón, sobre crisol G4. Se lava con 25 mL de Etanol y con 200 mL de Eter y se conservan en un desecador sobre CaCl_2 .

Se ha trabajado respetando siempre la estequiometría Ru(II): L= 1:2. Los nuevos complejos son muy solubles en el agua, DMSO, DMF, alcoholes, piridina pero son poco solubles en el éter, dioxano, tetracloruro de carbono y CS_2 y son estables a la exposición de la luz. El rendimiento es del 50-55%.

En estas síntesis hemos empleado los siguientes ligandos (L): derivados de aminoquinoleina (medicamentos clásicos antimaláricos: "PRIMAQUINA", "AMODIAQUINA", "CLOROQUINA"), aminoacridina (medicamento clásico antimalárico "MEPACRINA"), medicamentos antifúngicos derivados de imidazol ("ECONAZOLE", "KETOCONAZOLE", "BIFONAZOL", "CLOTRIMAZOL", "ISOCOTAZOL", "MISNIDAZOL", "FLUCONAZOL", "TINIDAZOLE") así como los derivados de imidazol que no presentan ninguna acción farmacológica antiparasitaria y/o antitumoral como: 2-Hidroxibenzimidazol; 2-benzimidazolil acetónitrilo; 2-benzimidazolilurea; Imidazoleidona; 2-Mercaptobenzimidazol; 2-Nitrometilimidazol;

4- Azabenzimidazol; 6-Nitrobenzimidazol; (Imidazol- 1 - il) acetofenona; 4 - Hidroximetilimidazol: todos ellos reactivos p.a. de MERCK y ALDRICH (USA).

El complejo $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_4]^0$ ha sido sintetizado según las indicaciones de Chan y colaboradores (10,11).

2) Síntesis de los complejos neutros y dinucleares del Ru(II) de estructura $[\text{Ru}^{II}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ donde L= ligando puente tetradentado (derivados de diamidinas aromáticas).

1g del complejo $[\text{Ru}^{II}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_4]^0$ se disuelve en unos 100 mL de una mezcla a ebullición de Etanol-Agua 1:1. Se le añade la cantidad correspondiente del ligando (L) disuelto en unos 200 mL de mezcla caliente (ebullición) de Etanol- Agua (3: 1). La mezcla total de la reacción se concentra a reflujo bajo una fuerte agitación, hasta que alcance un volumen final de unos 30 mL. Se deja reposar a la temperatura ambiente unos 15 minutos y se filtra el precipitado microcristalino de color marrón o amarillo-rojizo sobre crisol filtrante G4. Se lava con unos 25 mL de Etanol y unos 200 mL de Eter y se guardan los complejos en un desecador sobre CaCl_2 .

Los complejos sintetizados son estables a la exposición de la luz y bastante solubles en el agua, alcoholes, piridina, DMSO, DMF. Son poco solubles en éter, dioxano, tetracloruro de carbono y benceno y algo solubles en cloroformo. Se ha trabajado respetando siempre la estequiometría Ru(II): L, 2:1.

Las diamidinas empleadas (medicamentos clásicos antitripanosómicos), es decir, "PENTAMIDINA", "STILBAMIDINA", "2-HIDROXISTILBAMIDINA", "HEXAMIDINA", "BERENILE" han sido productos p.a. suministrados por MAY & BAKER (INGLATERRA). Los rendimientos son del 70-75%.

3) Análisis químico de los nuevos complejos del Ru(II).

El análisis de Ru se ha realizado por la técnica de Absorción atómica, previo ataque de los complejos con agua regia. El contenido de N ha sido hallado por el método Kjeldhal y el contenido en Cl por el método de Volhard.

El análisis elemental (C%, H%, O%, S%) han sido hallados por métodos de microcombustión con V_2O_5 . Todos estos análisis se

han realizado en el Dpto. de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España), así como en colaboración con los "PASCHER ANALYTICAL LABORATORIES" (BONN, ALEMANIA) Y "GALBRAITH LABORATORIES" (KNOXVILLE, USA). Los resultados de estos análisis no difieren en $\pm 1\%$ de los valores teóricos calculados para las dos series de complejos neutros del Ru(II) descritos en este trabajo, de estructuras generales $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ y $[\text{Ru}^{II}(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ en las que el entorno coordinativo alrededor de los cationes Ru(II) es de tipo octaédrico.

4) Espectros I.R. de los nuevos complejos del Ru(II).

Los espectros I.R. de los nuevos complejos neutros del Ru(II) y de los ligandos (L), han sido registrados por la técnica de la pastilla de KCl en un espectrofotómetro Perkin-Elmer457, en el rango 4000 cm^{-1} - 250 cm^{-1} .

5) Ensayos antitumorales "in vivo" (ratas) con los nuevos complejos del Ru(II).

Los complejos han sido administrados a los ratones de la cepa "Swiss white mice" por vía i.p. como disoluciones en 5% de Dextrosa en agua. El implante de los tumores se ha hecho el día 0, y la administración fraccionada de los complejos se ha hecho los días 1,5 y 9. Para cada complejo se ha utilizado un lote de 6 ratones. Se han empleado las siguiente líneas tumorales líquidas: tumores ascíticos de Ehrlich, tumores ascíticos de Landschutz, tumores leucémicos P388. Las dosis que aparecen en la Tabla I, son las dosis totales empleadas. Para medir la actividad anticancerosa de los nuevos complejos se ha tomado en cuenta el parámetro T/C% donde T= Tiempo de supervivencia de los ratones "Tratados" y C= Tiempo de supervivencia de los ratones "CONTROL". En el caso de los tumores ascíticos de Ehrlich, valores T/C iguales o superiores a 150 indican actividad anticancerosa comprobada. Valores comprendidos entre 125% y 150% indican actividad antitumoral marginal, y valores inferiores a 125% indican falta de actividad antitumoral. Para los tumores ascíticos de Landschutz se emplean los mismos criterios. En el caso de los tumores P388,

valores T/C superiores o iguales a 125 indican actividad anticancerosa comprobada. Valores T/C% comprendidas entre 125 y 100 indican actividad marginal siendo considerados como inactivos los complejos para los cuales el cociente T/C% es 100 o inferior. Todos los ensayos antitumorales (véase la Tabla I) han sido realizados en colaboración con el "NATIONAL CANCER INSTITUTE (USA) y/o con otros Institutos Anticancerosos con los que colaboramos.

6) Ensayos antitripanozoicos "in vivo" con los nuevos complejos del Ru(II).

Los nuevos complejos del Ru(II) han sido ensayados frente a los ratones de la cepa "Swiss white mice" portadores de las siguientes líneas de infección tripanosómica: T. brucei brucei, T. rhodesiense y T. cruzi (formas epimastigotas). Los complejos han sido administrados por vía s.c. como disoluciones en "TWEEN" una hora después de inocular (por vía i.p.) con 10⁵ de parásitos. Para cada dosis de cada complejo se ha empleado un lote de cuatro ratones. El criterio para medir la actividad antitripanosómica toma en cuenta el tiempo de sobrevivencia (en días) y eventualmente la parasitemia medida en la sangre de las ratas el día 8 y el día 30.

En el caso de los parásitos T. brucei brucei y T. rhodesiense T= 10 días. y en el de los parásitos T. cruzi (formas epimastigotas) T= 14 días (T= Tiempo de sobrevivencia en días, para los animales control , infectados y no tratados).

Las claves para valorar la actividad antitripanosómica de los nuevos complejos del Ru(II) serían: Muy activo (Curativo), 2T+ 8, y ningún parásito detectable en la sangre de las ratas el día 8 y el día 30. Activo: 2T, y ningún parásito detectable en la sangre de los ratones el día 8. Moderadamente activo: los animales tratados viven T+ 8 días. Inactivo: los animales tratados viven como mucho T+ 1 días. Tóxico: los animales tratados mueren antes de los controles (es decir T- 1; T- 2; T- 3).

TABLA I

Complejos	Tumores	Dosis	T/C		
		mg/Kg	%		
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_1)_2]^0$	Ascíticos	200	355		
		100	330		
		Landschutz	50	320	
			25	170	
	Ascíticos	200	320		
		Ehrlich	100	295	
			50	280	
			25	150	
	P 388	200	150		
		100	142		
	$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_2)_2]^0$	Ascíticos	200	300	
			100	275	
		Landschutz	50	155	
			Ascíticos	200	270
		100		255	
		Ehrlich		50	240
25				150	
P 388		200	148		
		100	140		
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_3)_2]^0$		Ascíticos	200	295	
			100	280	
		Landschutz	50	240	
			25	150	
		Ascíticos	200	230	
			Ehrlich	100	200
				50	145
	P 388	200	150		
		100	125		

TABLA I (Continuación)

Complejos	Tumores	Dosis	T/C
		mg/Kg	%
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_4)_2]^0$	Ascíticos	200	275
	100	260	
	Landschutz	50	193
		25	160
	Ascíticos	200	260
	Ehrlich	100	195
		50	152
	P 388	200	137
		100	125
	Ascíticos	200	250
		100	237
	Landschutz	501	60
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_5)_2]^0$	Ascíticos	200	240
		100	190
	Ehrlich	50	150
	P 388	200	137
		100	125
	Ascíticos	200	175
		100	160
	Landschutz	50	120
	Ascíticos	200	155
	Ehrlich	100	137
		50	110
	P 388	200	127
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_7)_2]^0$	Ascíticos	200	170
		100	152
	Landschutz	50	Inac.
	Ascíticos	200	150
	Ehrlich	100	125
		50	Inac.

TABLA I (CONTINUACIÓN)

Complejos	Tumores	Dosis	T/C
		mg/Kg	%
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_8)_2]^0$	Ascíticos	200	150
		100	Inac.
	Landschutz	50	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_9)_2]^0$	Ascíticos	200	137
	Landschutz	100	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{12})_2]^0$	Ascíticos	200	150
		100	125
	Landschutz	50	120
	Ascíticos	200	150
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{13})_2]^0$	Ehrlich	100	125
	Ascíticos	200	152
		100	120
	Landschutz	50	104
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{14})_2]^0$	Ascíticos	200	154
	Landschutz	100	130
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{17})_2]^0$	Ascíticos	200	147
		100	127
	Landschutz	50	125
	Ascíticos	200	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{19})_2]^0$	Ehrlich	100	Inac.
		400	150
	Ascíticos	200	Inac.
	Landschutz	100	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{20})_2]^0$		50	152
	Ascíticos	200	150
	Landschutz	100	122
		50	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{21})_2]^0$	Ascíticos	200	Inac.
		100	Inac.
	Ehrlich	50	Inac.
		400	147
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{21})_2]^0$	Ascíticos	200	150
	Landschutz	100	127
		50	103

TABLA I (CONTINUACIÓN)

Complejos	Tumores	Dosis mg/Kg	T/C %
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{22})]^0$	Ascíticos	200	150
		100	137
	Landschutz	50	120
	Ascíticos	200	150
	Ehrlich	100	125
		50	115
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{23})]^0$	Ascíticos	200	155
		100	142
	Landschutz	50	120
	Ascíticos	400	127
	Ehrlich	200	Inac.
		100	Inac.
		50	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{24})]^0$	Ascíticos	400	152
		200	127
	Landschutz	100	Inac.
		50	Inac.
	Ascíticos	400	137
	Ehrlich	200	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{25})]^0$	Ascíticos	400	137
	Landschutz	100	Inac.
		50	Inac.
	Ascíticos	400	122
	Ehrlich	200	Inac.
		100	Inac.
		50	Inac.

TABLA I (CONTINUACIÓN)

Complejos	Tumores	Dosis mg/Kg	T/C %
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{26})]^0$	Ascíticos	400	155
		200	129
	Landschutz	100	Inac.
		50	Inac.
	Ascíticos	400	147
	Ehrlich	200	120
		100	Inac.
		50	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{19})_2]^0$	Ascíticos	200	150
		100	137
	Landschutz	50	120

Las claves de las leyendas son las siguientes: L_1 =2-Hidroxibenzimidazol; L_2 =2-Benzimidazolilurea; L_3 =2-Benzimidazolilacetónitrilo; L_4 =2-Imidazoleidona; L_5 =2-Mercaptobenzimidazol; L_6 =2-Nitrobenzimidazol; L_7 =4-Azobenzimidazol; L_8 =6-Nitrobenzimidazol; L_9 =Imizadol-1-il) acetofenona; L_{10} = 4- Hidroximetilbenzimidazol; L_{11} = "ECONAZOLE"; L_{12} = "CLOTRIMAZOLE"; L_{13} = "FLUCONAZOLE"; L_{14} = "MISNIDAZOLE"; L_{15} = "ISOCONAZOLE"; L_{16} = "BIFONAZOLE"; L_{17} = "KETOCONAZOLE"; L_{18} = "PRIMAQUINA"; L_{19} = "AMODIAQUINA"; L_{20} = "CLOROQUINA"; L_{21} = "MEPACRINA"; L_{22} = "PENTAMIDINA"; L_{23} = "HEXAMIDINA"; L_{24} = "STILBAMIDINA"; L_{25} = "2-HIDROXISTILBAMIDINA"; L_{26} = "BERENILE".

Los complejos que no aparecen en la TABLA I, han sido totalmente inactivos frente a las tres líneas de tumores ensayados para unas dosis de 200 mg/Kg, 100 mg/Kg, 50 mg/Kg. Si para algún complejo que aparece en la TABLA I, no se indica alguna línea tumoral, esto significa que el mencionado complejo resulta inactivo frente a dicha línea tumoral (para dosis de 200, 100 y 50 mg/Kg).

Los resultados de los ensayos antitripanosómicos "in vivo" se han realizado en colaboración con el "Institute of Veterinary Medicine" (BERLIN, ALEMANIA), "Instituto de Zoología Tropical" (Caracas, Venezuela) así como en otros Institutos de Medicina Tropical con los que colaboramos (véase la Tabla II).

TABLA II

Complejos	Parásitos	Dosis mg/Kg	Actividad
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_1)_2]^0$	T. brucei brucei	200	Muy act.
		100	Muy act.
		50	Muy act.
		25	Activo
		12,5	M.A.
	T. rhodesiense	200	Muy act.
		100	Muy act.
		50	Activo
		25	Activo
		12,5	M.A.
	T. cruzi	200	Activo
		100	Activo
		50	M.A.
		25	M.A.
		12,5	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_2)_2]^0$	T. brucei brucei	200	Activo
		100	Activo
		50	Activo
	T. rhodesiense	200	Activo
		100	Activo
		50	Activo
		25	M.A.
	T. cruzi	200	Activo
		100	Activo
		50	M.A.
		25	Inac.
	T. bruceibrucei	200	Activo
		100	Activo
		50	M.A.
		25	M.A.
		12,5	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_3)_2]^0$	T. rhodesiense	200	Activo
		100	M.A.
		50	M.A.
	T. cruzi	200	M.A.
		100	Inac.
		50	Inac.

TABLA II (CONTINUACIÓN)

Complejos	Parásitos	Dosis mg/Kg	Actividad
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_4)_2]^0$	T. brucei brucei	400	Activo
		200	M.A.
		100	M.A.
		50	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_5)_2]^0$	T. brucei brucei	200	Activo
		100	M.A.
		50	Inac.
	T. rhodesiense	200	M.A.
		100	M.A.
		50	Inac.
	T. cruzi	200	M.A.
		100	Inac.
		50	Inac.
	T. brucei brucei	200	Activo
		100	Activo
		50	Activo
		25	M.A.
		12,5	Inac.
		6,25	Inact
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{12})_2]^0$	T. rhodesiense	200	Activo
		100	M.A.
		50	M.A.
	T. cruzi	200	M.A.
		100	M.A.
		50	M.A.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{13})_2]^0$	T. brucei brucei	200	Activo
		100	Activo
		50	M.A.
	T. rhodesiense	200	Activo
		100	M.A.
		50	M.A.
	T. cruzi	200	M.A.
		100	M.A.
		50	M.A.
	T. rhodesiense	200	Activo
		100	M.A.
		50	M.A.

TABLA II (CONTINUACIÓN)

Complejos	Parásitos	Dosis mg/Kg	Actividad
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_4(\text{L}_{14})_2]^0$	T. brucei brucei	200	Activo
		100	Activo
		50	Activo
		25	M.A
		12,5	Inac.
	T. rhodesiense	200	Activo
		100	M.A
		50	M.A
	T. brucei brucei	200	Activo
		100	M.A.
		50	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{17})_2]^0$	T. rhodesiense	200	Activo
		100	Inac.
		50	Inac.
	T. cruzi	200	M.A
		100	M.A
		50	Inac.
	T. brucei brucei	400	M.A.
		200	M.A.
		100	Inac.
	T. rhodesiense	400	M.A.
		200	Inac.
		100	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{10})_2]^0$	T. brucei brucei	400	M.A
		200	M.A.
		100	Inac.
	T. rhodesiense	400	M.A
		200	Inac.
		100	Inac.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_{11})_2]^0$	T. brucei brucei	400	M.A
		200	Inac.
		100	Inac.
	T. rhodesiense	400	M.A
		200	Inac.
		100	Inac.

TABLA II (CONTINUACIÓN)

Complejos	Parásitos	Dosis mg/Kg	Actividad
$[\text{Ru}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{22})]^0$	T. brucei brucei	400	Activo
		200	M.A.
		100	M.A
		50	Inac.
	T. rhodesiense	400	M.A
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L}_{23})]^0$	T. rhodesiense	200	M.A
		100	M.A
		50	Inac.
		400	M.A
	T. brucei brucei	200	M.A
		100	M.A
		50	Inac.
	T. rhodesiense	400	M.A
		200	M.A.
		100	Inac.
		50	Inac.

Las claves de las leyendas (L_1 - L_{26}) son idénticas a las que aparecen en la TABLA I. Los complejos que no aparecen en la Tabla son inactivos frente a las tres líneas de infección tripanosómica empleadas. Si para algún complejo que aparece en la Tabla no aparece ninguna línea parasitaria, esto significa que el complejo ha sido inactivo frente al mencionado parásito para unas dosis de 200, 100 y 50 mg/Kg.

7) Valoración de las nefrotoxicidades, hematotoxicidades y hepatotoxicidades inducidas por la administración de 1/2 de la DL_{50} de los complejos.

Se ha administrado por vía i.p. como disoluciones en "Tween", 1/2 de la DL_{50} de los nuevos complejos a un lote de cuatro ratones de la cepa "Swiss white mice" y a las 192 horas se han medido en la sangre de los ratones los siguientes parámetros: %mg urea, %mg creatina, niveles enzimáticos "SGOT" y "GOT" y se ha calculado el cociente L/N (ver Tabla III). Los valores de la DL_{50} aproximados de los complejos pertenecientes a las estructuras $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L}_2)]^0$

están centrados en el rango 200-450 mg/kg en tanto que los valores DL_{50} de los complejos dinucleares $[Ru^{II}_2(Cl)_4(DMSO)_4(L)]^0$ donde L= diamidinas aromáticas, están centrados en el rango 400-525 mg/Kg, aproximadamente (administración por vía i.p. como disoluciones en "Tween").

8) Cálculos de O.M. Hückel para las moléculas de los ligandos (L) - derivados de imidazol -.

Los cálculos de Orbitales Moleculares Hückel para las moléculas de los ligandos (L) - derivados de imidazol -, que aparecen en la Figura 1, han sido realizadas tomando en cuenta los parámetros indicados por Streitwieser (30).

TABLA III

Medida de los parámetros %mg urea, %mg creatinina, "GOT", "SGOT", L/N a las 192 horas, después de administrar a los ratones $1/2 DL_{50}$ de los nuevos complejos del Ru(II)

Complejos	%mg urea	%mg creatinina	"GOT"	"SGOT"	L/N
CONTROLES	42,66	0,620	51,20	17,9	6,15
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_1)_2]^0$	56,84	0,89	75,20	25,31	6,12
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_2)_2]^0$	57,15	0,84	77,20	25,11	6,14
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_3)_2]^0$	56,61	0,87	75,13	24,28	6,09
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_4)_2]^0$	55,9	0,85	74,29	24,1	6,11
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_5)_2]^0$	58,1	0,89	76,20	27,1	6,10
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_6)_2]^0$	56,92	0,83	71,20	26,18	6,14
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_7)_2]^0$	56,90	0,84	71,80	27,2	6,10
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_8)_2]^0$	57,82	0,86	75,29	29,02	6,12
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_9)_2]^0$	56,1	0,84	75,30	25,9	6,09
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{10})_2]^0$	55,8	0,80	77,29	26,1	6,12
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{11})_2]^0$	56,7	0,82	76,11	26,92	6,10
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{12})_2]^0$	56,4	0,89	76,92	25,83	6,12
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{13})_2]^0$	56,8	0,82	76,20	25,92	6,10
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{17})_2]^0$	57,1	0,89	75,9	25,15	6,11
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{18})_2]^0$	58,11	0,92	77,40	26,5	6,10
$[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L_{20})_2]^0$	58,3	0,90	77,92	28,03	6,12

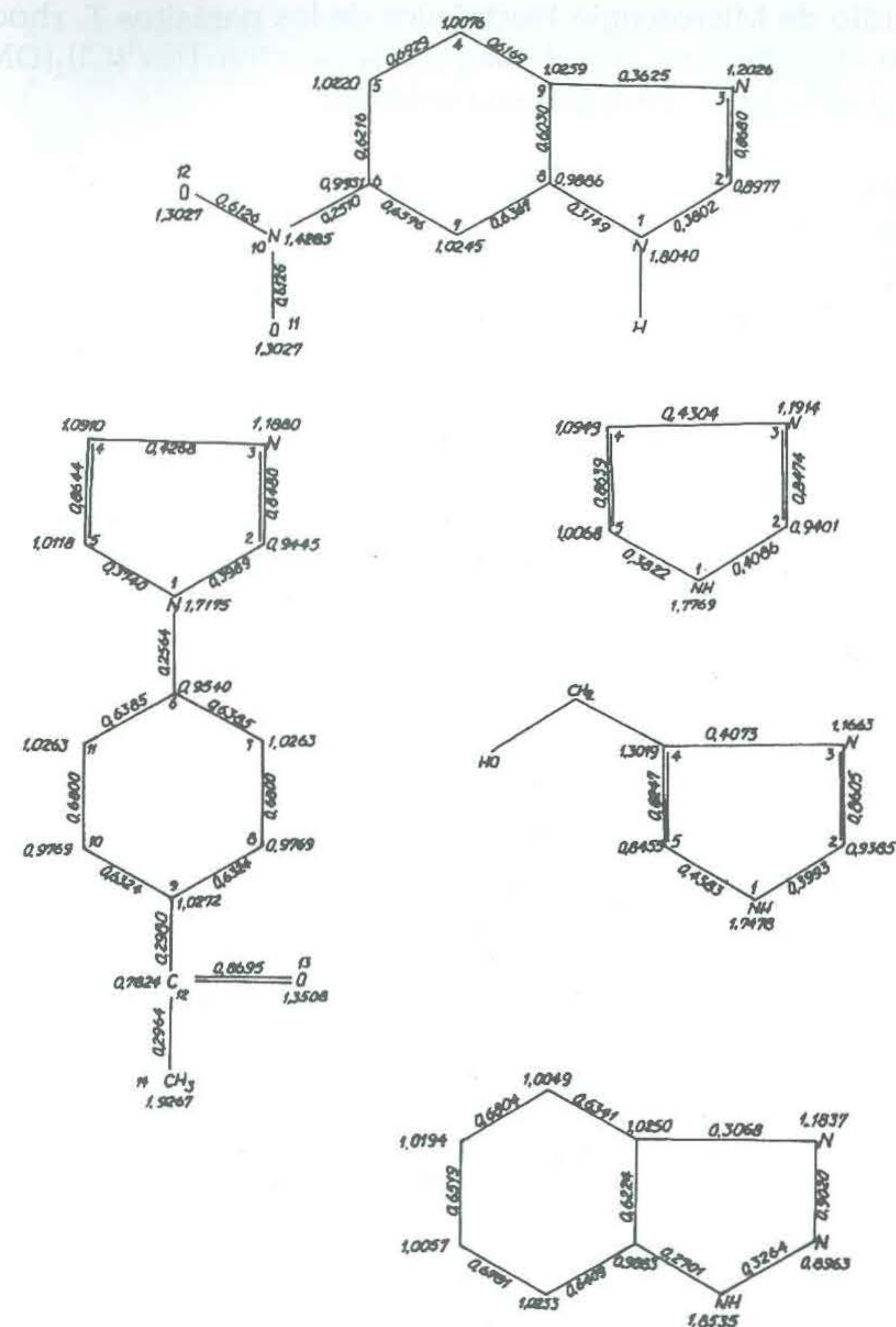
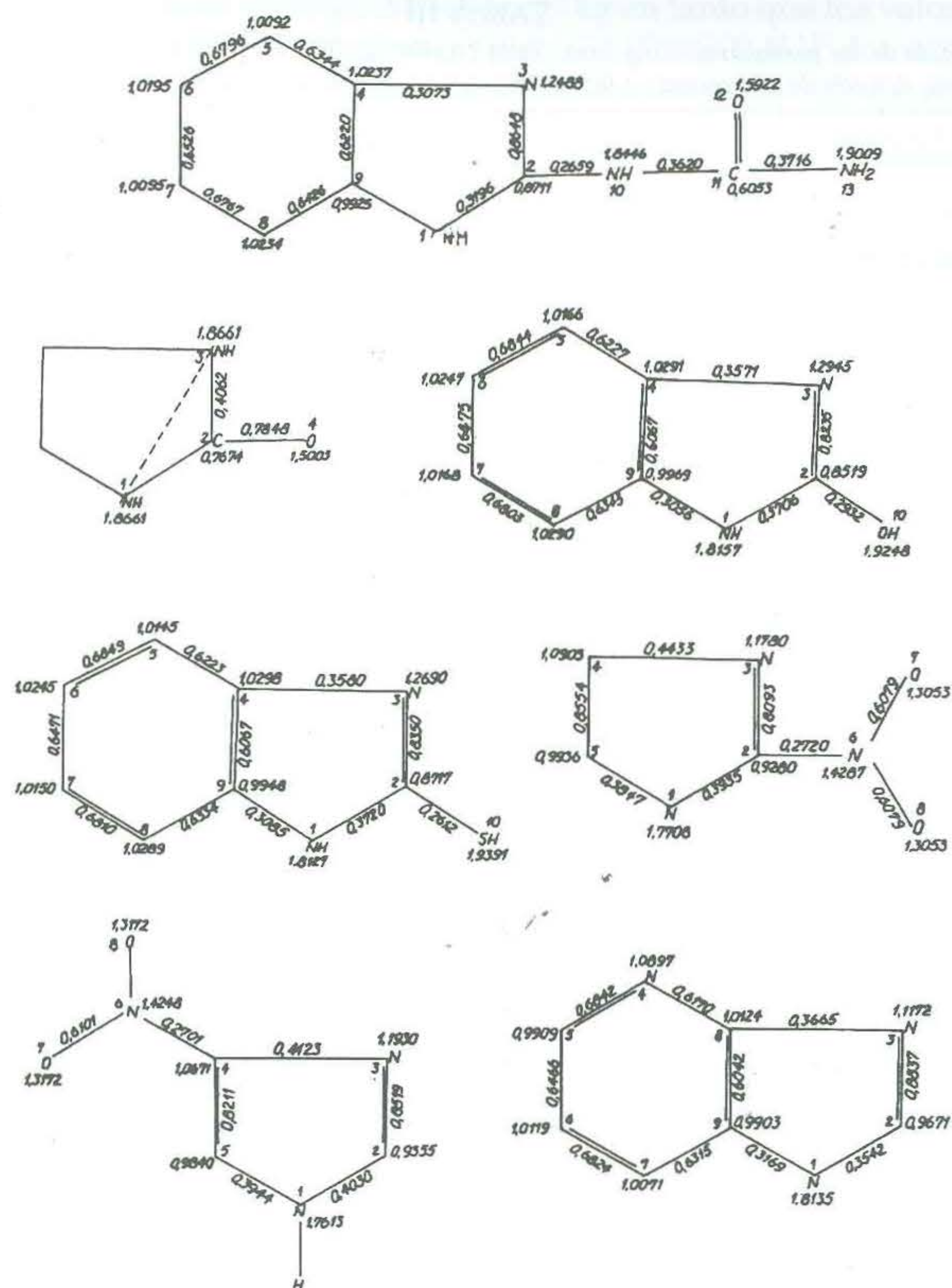
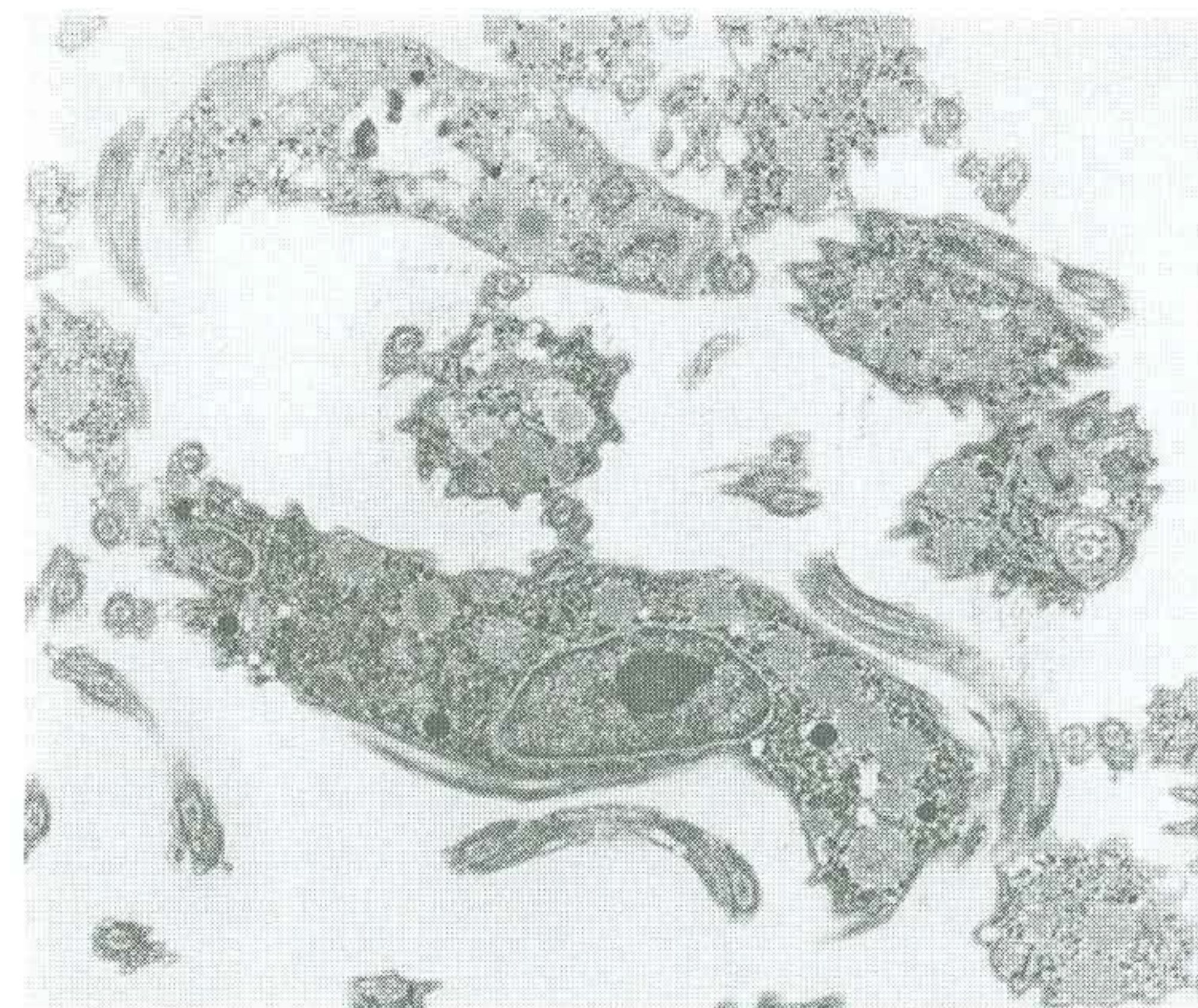
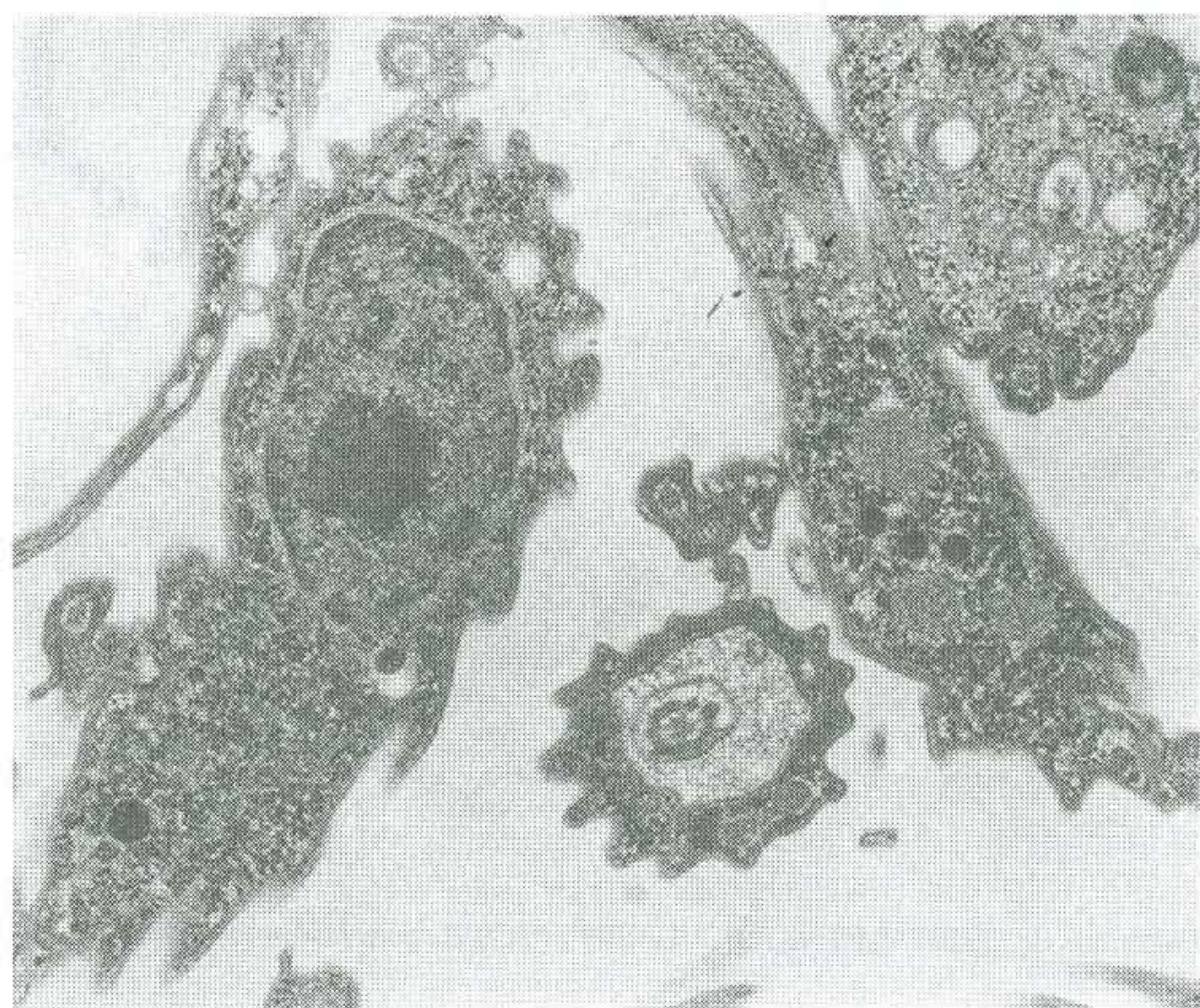


Figura 1. Diagramas de ORBITALES MOLECULARES HUCKEL para las moléculas de los ligandos puros (derivados de imidazol).

9) Estudio de Microscopía Electrónica de los parásitos *T. rhodesiense* tratados "in vitro" con el complejo más activo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde $\text{L} = 2\text{-Hidroxibenzimidazol}$.

Hemos realizado un estudio de Microscopía Electrónica de los parásitos tratados "in vitro" (*T. rhodesiense*) con disoluciones en 0,1% DMSO en el agua, del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde $\text{L} = 2\text{-Hidroxibenzimidazol}$ (concentraciones en el rango de 1-10 $\mu\text{g/ml}$) y lectura de los resultados a las 48 horas. El rango de aumentos varía entre 12.000 y 34.000. Se han empleado los métodos de tinción y el instrumental mencionados en otros trabajos nuestros (22-23). En las microfotografías 1-3 se aprecian los resultados obtenidos con concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ del complejo; en las microfotografías 4-6 se aprecian los resultados obtenidos al trabajar con concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ del mencionado complejo. (Véase la Figura 2).



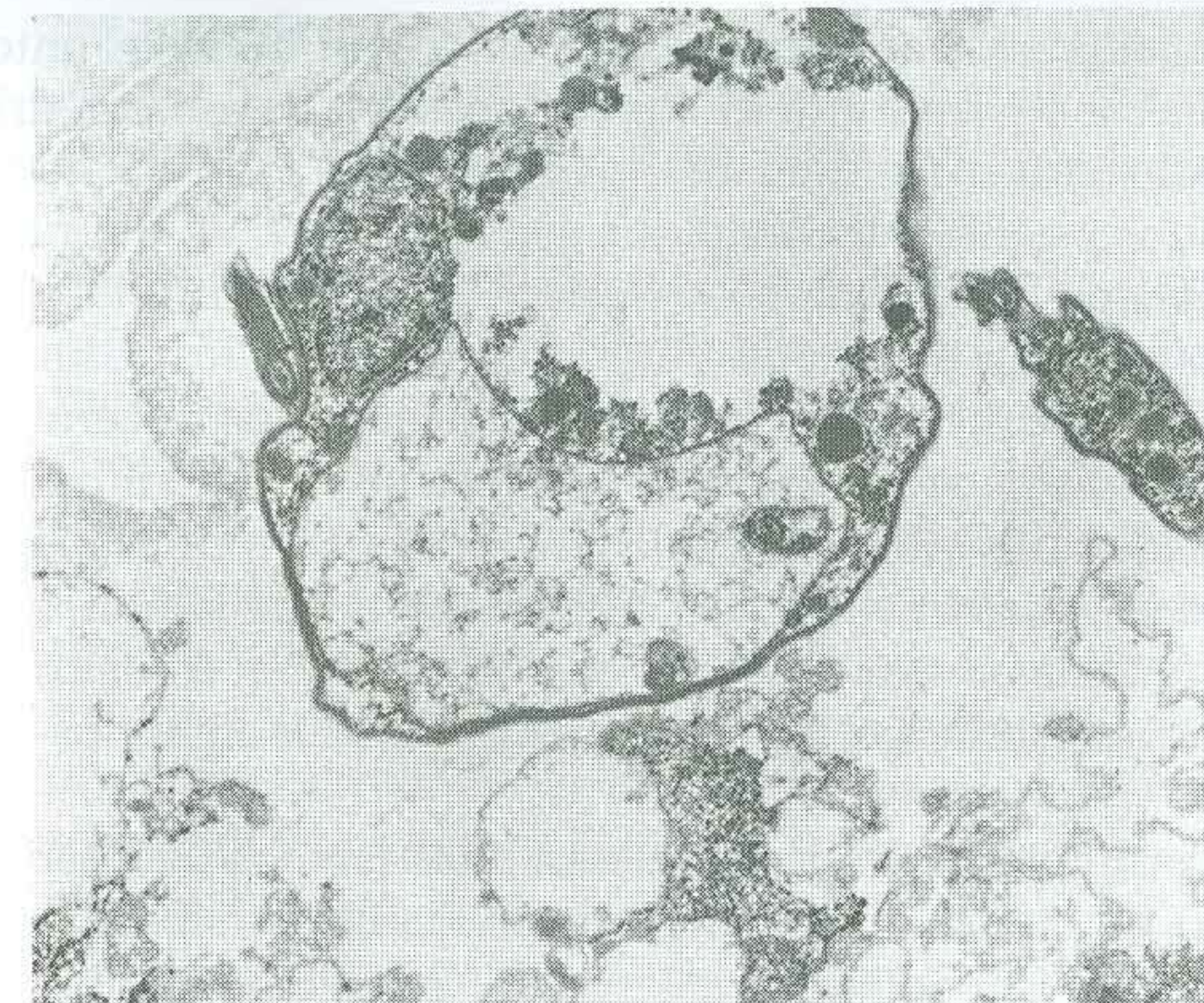
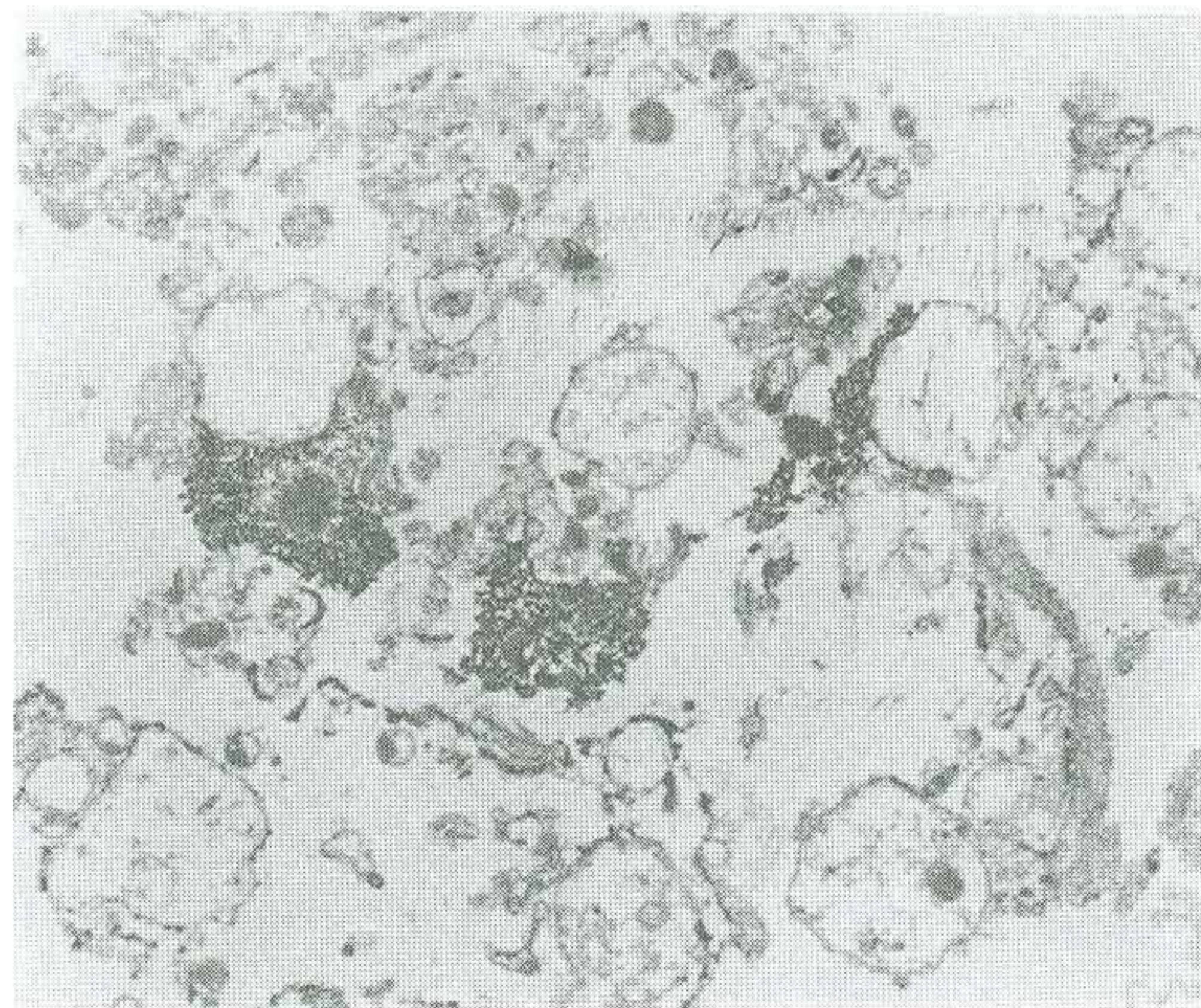


Figura 2. (comprende las microfotografías 1-6). Microscopía Electrónica de los parásitos *T. rhodesiense* tratados (48 horas) con concentraciones de 1 µg/mL y con 10 µg/mL (respectivamente microfotografías 1-3 y 4-6) del complejo $[Ru^{II}(CL)_2(DMSO)_2(L)_2]^0$ donde L= 2- Hidroxibenzimidazol.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis químicos, que no difieren en $\pm 1\%$ de los valores teóricos, apuntan claramente hacia el hecho de que nos encontraríamos con dos grandes series de complejos neutros y octaédricos del Ru(II):

- a) Complejos neutros y octaédricos del Ru(II) de estructura general $[Ru^{II}(Cl)_2(DMSO)_2(L)_2]^0$ donde los ligandos monodentados (L) son: medicamentos clásicos antifúngicos (derivados de nitro imidazol y/o derivados de imidazol), medicamentos clásicos antimaláricos (derivados de aminoquinoleína y/o derivados de aminocridina) así como otros derivados de imidazol carentes de acciones farmacológicas antitumorales

y/o antiparasitarias.

- b) Complejos neutros y dinucleares del Ru(II) donde el entorno alrededor de cada uno de los cationes Ru(II) es octaédricos, de estructura general $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})]^0$ donde los ligandos puente tetradentados son derivados de diamidinas aromáticas (medicamentos clásicos antitripanosómicos).

El estudio de los espectros rutinarios I.R. de los complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ indica los siguientes aspectos generales:

- I) Los complejos presentan una banda de intensidad moderada, asignada a las vibraciones de tensión $\nu\text{Ru-Cl}$, centrada en el rango de bajas frecuencias ($350\text{-}370\text{ cm}^{-1}$). Esta banda, que da cuenta de la existencia de los enlaces Ru-Cl en estos complejos, está ausente en los espectros I.R. de los ligandos puros (L).
- II) Los complejos presentan también unas bandas de intensidad débil, centradas en el rango de frecuencias $640\text{-}630\text{ cm}^{-1}$ y entre $600\text{-}620\text{ cm}^{-1}$, y asignadas, respectivamente a las vibraciones de tensión $\nu\text{Ru-N}$ y $\nu\text{Ru-S}$. Estas bandas están ausentes en los espectros I.R. de los ligandos puros (L), y nos permiten comprobar la existencia de enlaces coordinados entre el catión Ru(II) y los átomos de nitrógeno pertenecientes a los ligandos mono dentados (L) así como el hecho de que las moléculas de DMSO están coordinadas hacia el catión Ru(II) a través de su átomo dador S (actuando también como ligandos monodentados).
- III) La actuación coordinativa de los ligandos (L) que son derivados de imidazol, se realiza exclusivamente a través del átomo de nitrógeno terciario del heterociclo, quedando no implicado en el proceso de coordinación el grupo -NH- de los imidazoles. Este efecto se aprecia en los espectros I.R. de los complejos, por un desplazamiento del orden de $30\text{-}40\text{ cm}^{-1}$ hacia menores frecuencias, de la banda de tensión $\nu\text{C}=\text{N}$ (que aparece en los espectros I.R. de los ligandos puros en la región $1689\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$). Las bandas de tensión $\nu\text{N-H}$ (que

aparecen en los ligandos puros en el rango $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$) no experimentan en los complejos ningún desplazamiento, hecho que confirma la no implicación en el proceso coordinativo de los grupos -NH- pertenecientes a los derivados de imidazol.

- IV) Para los complejos donde los ligandos son derivados de aminoquinoleína y/o derivados de aminoacridina (medicamentos clásicos antimaláricos) hemos postulado la actuación coordinadora monodentada de estos ligandos, exclusivamente a través de los átomos de nitrógeno terciarios perteneciente al heterociclo, quedando no implicados en los procesos de coordinación alrededor de los cationes Ru(II), los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{NH-}$ heterocíclicos de estos ligandos, ya que en los espectros I.R. de los complejos se observan importantes desplazamientos ($30\text{-}50\text{ cm}^{-1}$) hacia menores frecuencias de las bandas de tensión (muy intensas) $\nu\text{C}=\text{N}$ de los ligandos (que aparecen en los ligandos puros en el rango $1690\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$). Al mismo tiempo, las bandas de tensión $\nu\text{N-H}$ pertenecientes a los grupos -NH- y $-\text{NH}_2$ de los ligandos (rangos de frecuencia, respectivamente de $3000\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ y $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$), no manifiestan ningún desplazamiento en los espectros I.R. de los complejos.

Los espectros I.R. de los complejos dinucleares y neutros pertenecientes a la serie $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ donde los ligandos L son diamidinas aromáticas (medicamentos clásicos antitripanosómicos que actúan como ligandos tetradentados puente a través de sus 2 grupos $-\text{NH}_2$ y de sus 2 grupos -NH), podemos poner de manifiesto los siguientes aspectos generales:

- a) Todos los complejos presentan una banda de intensidad moderada centrada en el rango de las bajas frecuencias ($300\text{-}370\text{ cm}^{-1}$), asignada a las vibraciones de tensión $\nu\text{Ru-Cl}$, que demuestra la existencia de enlaces Ru-Cl en estos complejos.
- b) En los espectros I.R. de los ligandos puros, esta banda está ausente.

- c) En los aspectos IR de los complejos aparecen dos bandas débiles centradas en las regiones $640-630\text{ cm}^{-1}$ y $600-620\text{ cm}^{-1}$, asignadas respectivamente, a las vibraciones de tensión $\nu\text{Ru-N}$ y $\nu\text{Ru-S}$. Estas bandas están ausentes en los espectros I.R. de los ligandos puros; se confirma así la existencia de enlaces coordinados entre los átomos N de los ligandos y los cationes Ru(II) así como el hecho de que la coordinación de las moléculas DMSO se realiza exclusivamente a través de los átomos S de estos ligandos.
- d) Las bandas de tensión N-H, (rango de frecuencias $3000-3200\text{ cm}^{-1}$ y $2800-2900\text{ cm}^{-1}$), asignadas respectivamente a los grupos dadores $-\text{NH}_2$ y $-\text{NH}$ de los ligandos, presentan en los espectros I.R. de los complejos unos importantes desplazamientos hacia menores frecuencias (del orden de 30 a 60 cm^{-1}), comprobándose así la implicación en el proceso de coordinación alrededor de los cationes Ru(II) de los dos grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{NH}$ pertenecientes al ligando (L) puente, derivados de diamidas aromáticas.

Por lo tanto, los espectros I.R. de los nuevos complejos Ru(II), confirman los resultados de los análisis químicos y nos hace pensar que las estructuras generales asignadas a estas dos grandes series de complejos neutros y octaédricos del Ru(II) parecen ser correctas. Evidentemente una confirmación absoluta de las estructuras propuestas para los nuevos complejos del Ru(II) se obtendría únicamente a través de un detallado estudio de sus difractogramas de Rayos X; estudio que ya emprendimos en estos Laboratorios.

Examinando los resultados de los ensayos anticancerosos "in vivo" con los nuevos complejos neutros y octaédricos del Ru(II) - véase la Tabla I - podríamos poner de relieve los siguientes aspectos:

- 1) Tanto los complejos pertenecientes tanto a la serie $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ como los pertenecientes a la serie $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ son mucho más activos frente a los tumores ascíticos de Landschutz que frente a los tumores ascíticos de Ehrlich. Los tumores más resistentes son siempre los

- leucémicos P 388.
- 2) Ninguno de los nuevos complejos del Ru(II) presenta una actividad igual o superior a la desplegada (en las tres líneas de tumores líquidos ensayados) por el medicamento antitumoral clásico de referencia "NEOPLATIN".
 - 3) El complejo que mayor actividad antitumoral ha presentado ha sido el complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})]^0$ donde L= 2-Hidroxibenzimidazol, seguido por los complejos donde L= 2-Mercaptobenzimidazol; L= 2-Benzimidazolilurea y L= 2-Benzimidazolilacetonitrilo (todos ellos perteneciendo a la misma serie). Y es precisamente para estos ligandos donde las cargas π electrónicas localizadas sobre los átomos N terciarios de los anillos imidazólicos, alcanza los mayores valores (respectivamente; 1, 2945; 1, 2690; 1, 2488 y 1, 2275 - véase también los resultados de los cálculos de O.M. Hückel que aparecen en la Figura 1.-). Estos hechos los hemos interpretado pensando que un aumento de la interacción N:-Ru(II) iba siempre relacionado con la existencia de unas mayores cargas π electrónicas localizadas sobre los átomos de N terciarios de los derivados de imidazol, con un debilitamiento de los enlaces Ru-Cl y Ru-DMSO, permitiéndose así la fácil pérdida de átomos Cl y grupos DMSO del complejo, en la biofase.
 - 4) A medida que disminuyen las cargas π electrónicas localizadas sobre los átomos N terciarios de los derivados de imidazol (véase también la Figura 1), disminuyen los efectos anticancerosos de los respectivos complejos del Ru(II). Así, en los casos donde estas cargas electrónicas son muy bajas (1,1172 en el caso del ligando 4-Azabenzimidazol y 1, 1663 en el caso del ligando 4-Hidroximetilimidazol) las actividades antitumorales son muy bajas, lo que estaría claramente relacionado con la existencia de unos enlaces débiles entre estos ligandos y el catión Ru(II).
 - 5) Para los restantes complejos pertenecientes a la misma serie,

es decir, $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde los ligandos L son los medicamentos clásicos antifúngicos (derivados de imidazol y/o derivados de nitroimidazol) o bien los medicamentos clásicos antimaláricos (derivados de aminoquinoleína o bien derivados de aminoacridina), las actividades antitumorales son netamente inferiores respecto a los complejos donde los ligandos L eran ligandos imidazólicos que no presentan "*per se*" ninguna actividad antitumoral y/o antiparasitaria.

- 6) Los complejos pertenecientes a la segunda serie de complejos, es decir, los complejos neutros y dinucleares $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ y donde L= derivados de diamidinas aromáticas (medicamentos clásicos antitripanosómicos), presentan siempre unas actividades anticancerosas "*in vivo*" inferiores a las desplegadas por los complejos pertenecientes a la serie anteriormente discutida. De la serie de complejos dinucleares del Ru(II) el complejo que mayores efectos antitumorales inducía, era el complejo donde L= "PENTAMIDINA".

Examinando ahora la Tabla II, podríamos poner de relieve los siguientes aspectos relacionados con las actividades antitripanosómicas "*in vivo*" de los nuevos complejos Ru(II):

- Los parásitos más sensibles a la actuación de los complejos del Ru(II) son: T. brucei brucei y T. rhodesiense. Los parásitos T. cruzi son los más resistentes a la actuación de los nuevos complejos.
- Hay una relación farmacológica dual (antitripanosómica y antitumoral), por cuanto los complejos que mayores efectos antitumorales producían, también mayores efectos antitripanosómicos inducen en las tres líneas de infección parasitaria. En efecto los complejos de la serie $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde los ligandos (L) son derivados de imidazol, desprovistos "*per se*" de efectos antitripanosómicos, inducen las mejores respuestas antitripanosómicas "*in vivo*". Y justamente son estos mismos complejos donde L= 2-Hidroxibenzimidazol; L= 2-Benzimidazolilurea; y L= 2-Benzimidazolil acetónitrilo los que inducían también las mejores

respuestas antitumorales "*in vivo*".

c) El complejo que mayores respuestas antitripanosómicas inducía (es decir situaciones catalogables de "CURATIVO" (véase la Tabla II), era el complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L= 2-Hidroxibenzimidazol; incluso para la administración de unas dosis relativamente bajas centradas en el rango de 50-100 mg/Kg, ya que la DL_{50} de este complejo es de 530 mg/kg.

d) También en algunos complejos pertenecientes a la serie $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$ donde L= derivados de imidazol seleccionados entre los medicamentos clásicos antifúngicos ("CLOTRIMAZOL", "KETOCANAZOLE", "FLUCANAZOLE") presentaban especialmente frente a los parásitos T. rhodesiense (agente patógeno de la "enfermedad del sueño") importantes efectos antitripanosómicos para unas dosis entre el 25% y el 50% de sus valores de la DL_{50} . Es importante mencionar el hecho de que los medicamentos antifúngicos estudiados (ligandos L_{11} - L_{17}) no presentan "*per se*" ninguna actividad antitripanosómica frente a las tres líneas de infección parasitarias estudiadas. Se podría entonces pensar que la actividad antitripanosómica desplegada por los complejos del Ru(II) con estos mismos ligandos estaría relacionada con algún mecanismo del transporte del complejo o de especies complejas derivadas de los procesos de hidrólisis y/o de sustitución en la biofase de las estructuras neutras y octaédricas $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$; llegando así a interaccionar el complejo del Ru(II) con diferentes estructuras parasitarias a través de mecanismos de inhibición de las reacciones bioquímicas vitales para los parásitos.

e) Los complejos pertenecientes a la segunda serie de complejos del Ru(II), neutros y octaédricos $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{Cl})_4(\text{DMSO})_4(\text{L})]^0$ donde L= ligando tetradentado elegido entre las diamidinas aromáticas, medicamentos clásicos antitripanosómicos ("PENTAMIDINA", "HEXAMIDINA", "STILBAMIDINA", "2-HIDROXISTILBAMIDINA", "BERENILE"), presentan siempre una actividad moderada (especialmente frente a los parásitos T. brucei brucei y T. rhodesiense); inferior a la desplegada por los complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^0$.

${}_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^\circ$ donde L= derivados de imidazol carentes "*per se*" de efectos antitripanosómicos.

f) En la serie de complejos dinucleares y neutros del Ru(II), el complejo que mejores efectos antitripanosómicos "*in vivo*" inducía, era el complejo donde L= "PENTAMIDINA". Este hecho que no es sorprendente por cuanto recientemente dimos cuenta de las excelentes actividades antitripanosómicas desplegadas "*in vivo*" frente a las distintas cepas Tripanosomas africanos por otros complejos del grupo del Platino, originados precisamente por la "PENTAMIDINA"(21-23).

Los resultados del estudio por Microscopía Electrónica (véase la Figura 2) de los parásitos T. rhodesiense tratados (rango de concentraciones 1 µg/ml y 10 µg/ml en 0,1% DMSO en Agua), indican que el sitio primario de la actuación del complejo $[\text{Ru}^\text{II}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^\circ$ donde L= 2-Hidroxibenzimidazol, no es en ningún caso ni el ADN del kinetoplasto, ni el ADN nuclear, ya que no se observa (microfotografías 1-6) ni el engrosamiento del kinetoplasto ni áreas de elevada densidad en la región del kinetoplasto del núcleo del parásito, alteraciones que habíamos evidenciado en el caso de los parásitos tratados con complejos octaédricos del Rh(III) y también con varios complejos cuadrados planos del Pt(II) en otros trabajos nuestros (24-29). Los parásitos presentan un aspecto "enfermizo" y están severamente dañados. Las alteraciones más importantes consisten en la aparición de numerosas vacuolas lipídicas, autofágicos en toda la superficie de los parásitos, procesos indicativos de las fuertes alteraciones bioquímicas inducidas por la exposición de los parásitos durante un tiempo relativamente corto (48 horas) a unas concentraciones relativamente bajas (1 y 10 µg/mL). Podemos observar que el número y el tamaño de estas vacuolas lipídicas es mas elevado en los casos en los que la concentración del complejo era de 10 µg/mL, que en el caso en el cual las concentraciones del complejo eran muy bajas (1µg/mL) - véase las microfotografías 4-6 y respectivamente 1-3 pertenecientes todas ellas a la Figura 2-. Estos efectos "*in vitro*" los hemos

relacionado con otros estudios de Microscopía Electrónica de los parásitos T. cruzi y L. donovani, tratados "*in vitro*" con varios complejos neutros y octaédricos del Rh(III), Ir(III), así como varios complejos catiónicos y octaédricos del Rh(III), en los que habíamos postulado una actuación no alquilante y no intercalante de estas estructuras sobre el ADN del kinetoplasto de los parásitos (24-29).

En cuanto a las toxicidades desplegadas "*in vivo*" (ratas) por la administración i.p. de 1/2 de la DL_{50} de los complejos y lectura de los resultados a las 192 horas, (véase la Tabla III), los complejos del Ru(II) descritos en este trabajo no poseen unas hematotoxicidades apreciables por cuanto los valores L/N (L= Linfocitos y N= Neutrófilos) no descienden en un 10% a los controles. Las toxicidades limitantes parecen ser, y por este orden, la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad; por cuanto los valores de los niveles enzimáticos "SGOT" y "GOT" se elevan en más de un 50%-75% respecto a los controles, en tanto que los contenidos %mg urea y %mg creatinina también experimentan aumentos del orden de 30-50% respecto a los controles. Quizás este hecho esté relacionado también con la existencia de unos valores DL_{50} inferiores para los complejos del Ru(II) respecto a los valores DL_{50} que presentan los complejos del Ru(III) aniónicos y octaédricos conocidos por su gran potencial antitumoral (2-7).

IV. CONCLUSIONES

Hemos seleccionado como complejo de interesante actividad antitumoral y de excelente actividad antitripanosómica "*in vivo*", especialmente frente a las líneas de infección parasitaria más patógena para el hombre (T. rhodesiense y T. cruzi), el complejo neutro octaédrico del Ru(II), de formulación general $[\text{Ru}^\text{II}(\text{Cl})_2(\text{DMSO})_2(\text{L})_2]^\circ$ donde L= 2-Hidroxibenzimidazol. Para los restantes complejos neutros y octaédricos del Ru(II) descritos en el presente trabajo, se ponen de manifiesto la existencia de unas relaciones farmacológicas duales "*in vivo*" (antitumorales y an-

titripanosómicas) bien definidas.

V. AGRADECIMIENTOS

El Prof. Dr. D.G. Craciunescu agradece a las casas "JOHNSON MATTHEY (INGLATERRA) y "PLATINUM RUSTENBURG MINES" (SUR AFRICA) por las sales del Rutenio recibidas gratuitamente.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- (1) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1988). *An. Real. Acad. Farm.* 54, 46-69.
- (2) G. SAVA Y COLAB.(1983). *Chem. Bio. Inter* 45, 1-9.
- (3) G. SAVA Y COLAB.(1984). *Eur. J. Clin. Oncol.* 20, 841-850.
- (4) M.J. CLARKE (1980). *Metals Ions in Biol. Syst.* II, 231-255.
- (5) M.J. CLARKE Y COLAB. (1980). *J. Inorg. Biochem.* 12, 279-287.
- (6) M.J. CLARKE Y COLAB. (1986). *Inorg. Chim. Acta* 124, 13-17.
- (7) M.J. CLARKE Y COLAB. (1978). *Inorg. Chim. Acta* 27, 187-189.
- (8) A. NICOLLE Y COLAB. (1906). *Ann. Inst. Pasteur* 20, 417-420.
- (9) N. FARRELL Y COLAB. (1984). *Biochem. Pharmacol.* 33, 961-974.
- (10) P.K. CHAN Y COLAB.(1986). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12(7), 1059-1062.
- (11) P.K. CHAN Y COLAB. (1986). *Chem. Biol. Inter.* 59(3). 247-254.
- (12) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1991). *"IN VIVO"*, 5, 329-332.
- (13) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1989). *Anticancer Res.* 9, 781-786.
- (14) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1988). *An. Real Acad Farm.* 54, 442-466.
- (15) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1990). *Drug. Res.* 40(I), 183-187.
- (16) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB.(1990). *Metals Ions. Biol. Med.* I, 462-464.
- (17) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB.(1987). *An. Real Acad Farm.* 53, 205-232.
- (18) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB.(1985). *Biol. Trace Elem Res.* 8,251-261.
- (19) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB.(1993). *Anal. Real. Acad. Farm.* 59, 73-97.
- (20) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB.(1992) *Anal. Real. Acad. Farm.* 58, 207-231.
- (21) G. DREYFUSS, B. PENICAUT, J. NICOLAS, D.G. CRACIUNESCU, P. LOISEAU (1993). *Trop. Med. Parasitol.* 44, 95-98.
- (22) J. ZINSSTAG, R. BRUN, D.G. CRACIUNESCU, E. PARRONDO IGLESIAS (1991). *Trop. Med. Parasitol.* 42, 41-44.
- (23) S. CROFT, R.A. NEAL, D.G. CRACIUNESCU, G. CERTAD FOMBONA (1992). *Trop. Med. Parasitol.*
- (24) A. OSUNA (1991). Comunicación privada al Prof. Dr. D.G. Craciunescu.
- (25) C. MESA-VALLE (1991). Comunicación privada al Prof. Dr. D.G. Craciunescu.

- (26) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1989). *An. Real Acad. Farmacia*, 55, 213-236.
- (27) A. OSUNA, L.M. RUIZ PÉREZ, M.C. LÓPEZ, F. GAMARRO, S. CASTANYS, D.G. CRACIUNESCU, C. ALONSO (1987). *J. Parasit.* 2, 272-277.
- (28) S. CROFT (1990). Comunicación privada al Prof. Dr. D.G. Craciunescu.
- (29) A. OSUNA, L.M. RUIZ PÉREZ, M.C. LÓPEZ, F. GAMARRO, S. CASTANYS, D.G. CRACIUNESCU, C. ALONSO (1988). *Drug. Res.* 38 (I), 312-314.
- (30) J. STREITWIESSER (1964). "M.O. Theory for organic chemist". Edit John Wiley, New York.