

**Actividades farmacológicas duales "in vivo"
(antitripanosómicas y antitumorales) y toxicidad
desplegada por los nuevos complejos neutros y
octaédricos del rutenio (III).**

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

*Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, Facultad
de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 28040
Madrid (España).*

E. GASTON DE IRIARTE.

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

A. GOMEZ, R.M. MOSQUERA

*Departamento de Histopatología y de Microscopía Electrónica.
Instituto Nacional de Toxicología, Madrid (España).*

RESUMEN

En este trabajo se describe la síntesis y la caracterización físico-química (análisis químico y espectros I.R.) de unos 26 nuevos complejos aniónicos y octaédricos del Rutenio (III), pertenecientes a las siguientes estructuras generales: a) Complejos dinucleares y aniónicos del Ru (III), donde el entorno alrededor de cada ión de Ru(III) es octaédrico, pertenecientes a la estructura general $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$. En estas sales complejas, los ligandos (L) son los siguientes medicamentos clásicos de acción antitripanosómica, que presentan una acción tetradentada hacia los iones Ru(III): "Pentamidina", "Hexamidina", "Stilbamidina", "2-Hidroxistilbamidina", "Berenile".

b) Complejos monoaniónicos y octaédricos del Ru (III) pertenecientes a la

estructura general $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^- (\text{LH})^+$. En estas sales complejas del Ru(III), los ligandos L son medicamentos clásicos anti-parasitarios, derivados del imidazol como "Benzimidazole", "Misomidazole", "Niridazole"; derivados de nitrofurano, como "LAMPIT"; derivados de hidroquinoleína como "Oxamniquine"; derivados de sulfonamida, como "Sulfatiazol", "Sulfafurazol", "Sulfapiridina", "Sulfadiazina", "Sulfadimetoxina", "Sulfapirazina"; o bien distintas aminas heterocíclicas (benzotiazol, 2-amino naftotiazol, 2-bromo tiazol, 2-mercaptobenzotiazol, 2-amino-5-nitrotiazol, 3-amino piridazina, 3-hidrazino pirazina, 2-amino indazol, 9-amino acridina, 2-amino quinoleína).

Los nuevos complejos han sido ensayados frente a ratones infectados con las siguientes líneas de infección tripanosómicas: T. evansi (venezuelensi), T. rhodesiense y T. cruzi (epimastigotes). También han sido ensayados frente a los ratones portadores de tumores: ascítico de Ehrlich, ascítico de Landschutz y tumores leucémicos P388. Se ha valorado también en la sangre de las ratas (a las 192 horas) que habían recibido por vía i.p. 1/2 de la DL_{50} de cada complejo, como suspensión en aceite de cacahuete, mediante los parámetros: %mg urea, %mg creatinina, niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT", y se ha calculado el cociente L/N (L = Linfocitos, N = Neutrófilos). Se ha realizado también un estudio histopatológico por Microscopía óptica de los cortes semifinos de los riñones y del hígado de las ratas, en el complejo más interesante: $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ donde L = Pentamidina.

Palabras claves: Complejos del Ru(III). Antitumorales. Antitripanosómicos. Toxicidades. Histopatología renal. Histopatología hepática.

SUMMARY

In this paper we report the synthesis and physico-chemical characterization of 26 new anionic Rutenium(III) complexes belonging to the following structures: a) Dinuclear and dianionic Ru(III) complexes $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ where L = classical trypanocidal drugs as "Pentamidine", "Hexamidine", "Stilbamidine", 2-Hidroxitilbamidine", "Berenile", in which the coordination around Ru(III) is octahedral.

b) Monoanionic and octahedral Ru(III) complexes, $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^- (\text{LH})^+$. where L = classical antiparasitic drugs (imidazole derivatives as "Benzimidazole", "Misomidazole", "Niridazole"; nitrofurane ("LAMPIT") and hydroxiquinoleine ("Oxamniquine"); sulphonamides, ("Sulphatiazole", "Sulphafurazole", "Sulphapyridine", "Sulphadiazine", "Sulphadimetoxine", "Sulphapyrazine"; as well as different heterocyclic amines (benzothiazole, 2-amino naphthothiazole, 2-bromo thiazole, 2-mercaptobenzothiazole, 2-amino-5-nitrothiazole, 3-amino pyridazine, 3-hydrazino pyrazine, 2-amino indazole, 9-amino acridine, 2-amino quinoleine).

The new Ru(III) complexes were assayed against mice bearing the

following established liquid tumours: Ehrlich ascitic, Landschutz ascitic, leukemic P 338 tumours. They were also assayed against mice infected with T evansi (venezueliense), 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 a histopathological examinations (Optical Microscopy), of the kidneys and liver of the rats which received (192 hours) 1/2 LD_{50} (via i.p. as suspension in arachis oil) of the most active complex that is $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ where L = Pentamidine.

Key words: Ru(III) anionic complexes, Trypanocidal effects. Antitumour effects. Toxicities. Kidney histopathology. Liver histopathology.

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente D.G. Craciunescu y colaboradores describieron las interesantes actividades farmacológicas "in vivo" duales (antitripanosómicas y antitumorales) desplegadas por varios complejos aniónicos y octaédricos del Ru(III) pertenecientes a la estructura general $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^- (\text{LH})^+$, donde L = medicamentos clásicos de acción antimalárica derivados de aminoquinoleína y de aminoacridina o bien L = derivados de tiazol. (1,2). Además estas mismas relaciones farmacológicas duales las habíamos descrito también en el caso de varios complejos neutros del Ru(III) y del Ru(II) originados por los derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos (3,4). El estudio de las sales complejas del Ru(III) de formulación general $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^- (\text{LH})^+$ permitió a B.K. Keppler (5,6) diseñar varios antitumorales muy potentes (donde L = derivados de imidazol, indazol, tiazol y otras aminas heterocíclicas), si bien este autor no exploró las actividades antiparasitarias de estas sales, donde la coordinación alrededor del catión es octaédrica.

En este trabajo se describen las actividades antitumorales y antitripanosómicas "in vivo" desarrolladas por unos 26 nuevos complejos aniónicos y octaédricos del Ru(III) pertenecientes a las

siguientes estructuras:

a) Complejos dinucleares y dianiónicos del Ru(III) de estructura general $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ donde L = medicamentos clásicos de acción antitripanosómica y /o antileismaniásica, derivados de diamidinas aromáticas: "Pentamidina", "Hexamidina", "Stilbamidina", "2-Hidroxistilbamidina", "Berenile". que realizan una actuación coordinadora tetradentada, a través de sus dos grupos NH y NH_2 hacia los dos cationes de Ru(III), en un entorno octaédrico.

b) Complejos mononucleares y monoaniónicos del Ru(III), de fórmula general $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^{-} (\text{LH})^{+}$, de estructura octaédrica donde los ligandos monodentados (L) son medicamentos clásicos anti-parasitarios, derivados del imidazol como "Benzimidazole", "Misomidazole", "Niridazole"; derivados de nitrofurano, como "LAMPIT"; derivados de hidroquinoleína como "Oxamniquibe"; derivados de sulfonamida, como "Sulfatiazol", "Sulfafurazol", "Sulfapiridina", "Sulfadiazina", "Sulfadimetoxina", "Sulfapirazina"; o bien distintas aminas heterocíclicas (benzotiazol, 2-amino naftotiazol, 2-bromotiazol, 2-mercatobenzotiazol, 2-amino-5-nitrotiazol, 3-amino piridazina, 3-hidrazino pirazina, 2-amino indazol, 9-amino acridina, 2-amino quinoleína).

Es interesante mencionar el hecho de que M.J. Clarke realizó un detenido estudio de las actividades antitumorales con unas series de complejos catiónicos y neutros del Ru(II) y (III), postulando una importante interacción de éstos con el ADN de las células tumorales, pero sin investigar el potencial tripanocida. (7-10). En la literatura se ha descrito un potente tripanocida "in vivo", el compuesto llamado Rojo de Rutenio, compuesto polinuclear que contiene átomos de Ru en los estados de oxidación formales +3 y +4(11), en tanto que N.Farrell apuntó hacia el interés como tripanocidas que podrán presentar varios complejos del Ru(II) y (III) debido a los elevados valores de la DL_{50} que presentaban (12).

Las sales complejas del Ru(III) que son objeto de este trabajo han sido caracterizadas a través de los datos de los análisis químicos y mediante el estudio de sus espectros I.R. El efecto antitumoral "in vivo" se ha medido frente a las 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 también frente a los ratones de la cepa "Swiss white mice" infectados con las siguientes líneas de infección tripanosómica: T. evansi (venezueliensi), T. rhodesiense y T. cruzi (epimastigotes). La cepa T. evansi (venezueliensi), una variante disquinetoplásica del T. evansi, no es patógena para el hombre pero sí para el ganado, mientras que las otras dos cepas son los agentes patógenos de las dos enfermedades tripanosómicas más letales para el ser humano (enfermedad del sueño y de Chagas). El perfil tóxico desplegado por los nuevos complejos del Ru(III) se ha valorado, a las 192 horas, en la sangre de las ratas 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). Se ha realizado también un estudio histopatológico renal y hepático por microscopía óptica de los cortes de los riñones y del hígado de las ratas, en el complejo más activo: $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ donde L = Pentamidina.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1) Síntesis de los complejos $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ donde L = derivados de diaminas aromáticas (medicamentos clásicos antitripanosómicos).

1g de la sal $\text{RuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (producto p.a. de Johnson Matthey Chemicals Ltd) se disuelve en unos 200 mL de ClH conc. bajo fuerte agitación y calentamiento y se mantiene a refugio durante

2h. A esta disolución se le añade, bajo agitación y a ebullición, la cantidad correspondiente de los ligandos (L) disuelta en unos 100 mL de mezcla 2:1 CIH 10N:Etanol. La mezcla total de la reacción se concentra a reflujo bajo fuerte agitación, hasta que alcance el volumen final de unos 30-50 mL. Se deja reposar 15-30 minutos a la temperatura ambiente y se filtra el precipitado microcristalino de color rojo intenso, sobre crisol G4. Se lava con 20 mL de etanol y con 200 mL de éter y se conservan en un desecador sobre CaCl_2 y a vacío.

Se ha trabajado respetando siempre la estequiometría Ru(III): L = 1:1. Los complejos son muy solubles en agua, en la cual se hidrolizan lentamente, en DMSO, DMF, alcoholes, piridina y algo solubles en cloroformo y muy insolubles en benceno tetracloruro de carbono, dioxano y éter y son estables a la exposición de la luz. El rendimiento es del 40-50% .

En estas síntesis hemos empleado los ligandos (L), medicamentos clásicos de acción antitripanosómica, "Pentamidina", "Hexamidina", "Stilbamidina", 2-Hidroxistilbamidina", y "Berenile", productos de los laboratorios May Baker (U.K.) y Rhone-Poulen (Francia).

2) Síntesis de los complejos de estructura $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^-$ (LH) donde L = medicamentos clásicos antiparasitarios derivados de imidazol, nitrofurano, hidroquinoleína, sulfamidas y aminas heterocíclicas.

1g de la sal $\text{RuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (producto p.a. de Johnson Matthey Chemicals Ltd) se disuelve en unos 200 mL de CIH conc. bajo fuerte agitación y calentamiento y se mantiene a reflujo durante 2h. A esta disolución se le añade, bajo agitación y a ebullición, la cantidad correspondiente de los ligandos (L) disuelta en unos 100 mL de mezcla 2:1 CIH 10N:Etanol. La mezcla total de la reacción se concentra a reflujo bajo fuerte agitación, hasta que alcance el volumen final de unos 30-50 mL. Se deja reposar 15-30 minutos a la temperatura ambiente y se filtra el precipitado microcristalino

de color rojo intenso, sobre crisol G4. Se lava con 20 mL de etanol y con 200 mL de éter y se conservan en un desecador sobre CaCl_2 y a vacío.

Se ha trabajado respetando siempre la estequiometría Ru(III): L = 1:3. Los complejos son muy solubles en agua, en la cual se hidrolizan lentamente, en DMSO, DMF, alcoholes, piridina y algo solubles en cloroformo y muy insolubles en benceno tetracloruro de carbono, dioxano y éter y son estables a la exposición de la luz. El rendimiento es del 30-40% .

En estas síntesis hemos empleado los ligandos (L), detallados en el capítulo anterior, productos de los laboratorios Aldrich (USA) o bien suministrados por Pfizer (USA), Roche (Suiza) y Bayer (Alemania).

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

El análisis de Ru se ha realizado por la técnica de espectroscopía 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 "PASCHEN 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 del Ru(III) descritos en este trabajo, de estructuras generales $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-}$ (LH) $_2^{2+}$ y $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^-$ (LH) lo que nos hace pensar que las estructuras han sido asignadas correctamente.

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

Los espectros I.R. de los nuevos complejos de Ru(III) y de los ligandos (L), han sido registrados por la técnica de la pastilla de KCl en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 457, en el rango $4000\text{ cm}^{-1} - 250\text{ cm}^{-1}$. Los ligandos también han sido registrados una vez disueltos en tetracloruro de carbono y/o en suspensiones de Nujol.

5) Ensayos anticancerosos "in vivo" con los nuevos complejos del Ru(III).

Los complejos han sido administrados a los ratones de la cepa "Swiss white mice" por vía i.p. como disoluciones en suspensión de aceite de cacahuete los días 1, 5 y 9, siendo el día cero el del implante tumoral. 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, y tumores leucémicos P388 (ver Tabla I). El criterio para medir la actividad antitumoral ha sido 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 han sido realizados en colaboración con el "NATIONAL CANCER INSTITUTE"(USA) y/o con otros Institutos Anticancerosos con los que colaboramos.

TABLA I

Resultados de los ensayos anticancerosos "in vivo" con los nuevos complejos del Rutenio(III).

COMPLEJOS	TUMORES	DOSIS mg/kg	TC %
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_1)]^{2-}(\text{L}_1\text{H})_2^{2+}$	Ascíticos de Landschutz	400	271
		200	260
	Ascíticos de Ehrlich	400	268
		200	260
		100	212
	P388	400	139
		200	137
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_2)]^{2-}(\text{L}_2\text{H})_2^{2+}$	Ascíticos de Landschutz	400	260
		200	230
	Ascíticos de Ehrlich	400	250
		200	229
		100	210
	P388	400	137
		200	125
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_3)]^{2-}(\text{L}_3\text{H})_2^{2+}$	Ascíticos de Landschutz	400	129
		200	125
	Ascíticos de Ehrlich	400	125
		200	120
	P388	400	125
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_4)]^{2-}(\text{L}_4\text{H})_2^{2+}$	Ascíticos de Landschutz	400	230
		200	200
	Ascíticos de Ehrlich	400	200
		200	178
		100	120

TABLA I (Cont.)

$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_5)]^{2-}(\text{L}_5\text{H})_2^{2+}$	Ascíticos de	400	230
	Landschutz	200	217
	Ascíticos de	400	157
	Ehrlich	200	155
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_6)_2]^- (\text{L}_6\text{H})^+$	Ascíticos de	400	200
	Landschutz	200	195
	Ascíticos de	400	135
	Ehrlich	200	130
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_7)_2]^- (\text{L}_7\text{H})^+$	Ascíticos de	400	195
	Landschutz	200	182
	Ascíticos de	400	138
	Ehrlich	200	135
	P388	400	125
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_8)_2]^- (\text{L}_8\text{H})^+$	Ascíticos de	400	139
	Landschutz	200	135
	Ascíticos de	400	130
	Ehrlich	200	110
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_9)_2]^- (\text{L}_9\text{H})^+$	Ascíticos de	400	175
	Landschutz	200	170
	Ascíticos de	400	163
	Ehrlich	200	150

TABLA I (Cont.)

$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{10})_2]^- (\text{L}_{10}\text{H})^+$	Ascíticos de	400	170
	Landschutz	200	165
	Ascíticos de	400	150
	Ehrlich	200	142
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{11})_2]^- (\text{L}_{11}\text{H})^+$	Ascíticos de	400	122
	Landschutz	200	110
		600	150
		800	155
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{16})_2]^- (\text{L}_{16}\text{H})^+$	Ascíticos de	400	145
	Landschutz	200	135
		600	147
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{17})_2]^- (\text{L}_{17}\text{H})^+$	Ascíticos de	400	325
	Landschutz	200	300
	Ascíticos de	400	310
	Ehrlich	200	250
	P388	400	141
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{18})_2]^- (\text{L}_{18}\text{H})^+$	Ascíticos de	400	275
	Landschutz	200	250
	Ascíticos de	400	232
	Ehrlich	200	215
	P388	400	137
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{19})_2]^- (\text{L}_{19}\text{H})^+$	Ascíticos de	400	308
	Landschutz	200	290
		100	250
	Ascíticos de	400	185
	Ehrlich	200	175
	P388	400	125

(Tabla I) (Cont.)

$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{20})_2]^- (\text{L}_{20}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	275
		200	250
	Ascíticos de Ehrlich	400	232
		200	180
	P388	400	125
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{21})_2]^- (\text{L}_{21}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	325
		200	310
		100	260
	Ascíticos de Ehrlich	400	300
	P388	400	130
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{22})_2]^- (\text{L}_{22}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	270
		200	262
		100	145
	Ascíticos de Ehrlich	400	215
	P388	400	127
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{23})_2]^- (\text{L}_{23}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	310
		200	275
		100	162
	Ascíticos de Ehrlich	400	260
	P388	400	125
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{24})_2]^- (\text{L}_{24}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	302
		200	278
		100	174
	Ascíticos de Ehrlich	400	270
	P388	400	127

$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{25})_2]^- (\text{L}_{25}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	310
		200	290
		100	192
	Ascíticos de Ehrlich	400	270
	P388	400	135
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{26})_2]^- (\text{L}_{26}\text{H})^+$	Ascíticos de Landschutz	400	240
		200	170
		100	152
	Ascíticos de Ehrlich	400	200
	P388	400	129
NEOPLATIN	Ascíticos de Landschutz	6	425
	Ascíticos de Ehrlich	6	410
	P388	6	192

PIES TABLA I.- Las claves de las leyendas son las siguientes: L₁="PENTAMIDINA"; L₂="STILBAMIDINA"; L₃="2-HIDROXISTILBAMIDINA"; L₄="BERENILE"; L₅="HEXAMIDINA"; L₇="BENZIMIDAZOLE"; L₈="MISONIDAZOLE"; L₉="NIRIDAZOL"; L₁₀="LAMPIT"; L₁₁="OXAMNIQUINE"; L₁₂="SULFATIAZOL"; L₁₃="SULFAFURAZOL"; L₁₄="SULFAPIRIDINA"; L₁₅="SULFADIAZINA"; L₁₆="SULFADIMETOXINA"; L₁₇="SULFAPIRAZINA"; L₁₈=Benzotiazol; L₁₉=2-aminonaftotiazol; L₂₀=2-bromotiazol; L₂₁=2-mercaptobenzotiazol; L₂₂=2-amino 5-nitrotiazol; L₂₃=3-aminopiridazina; L₂₄=3-hidrazinopiridazina; L₂₅=2-amino indazol; L₂₆=9-amino acridina; L₂₇=2-aminoquinoleína. Los complejos que no aparecen en la Tabla, han sido totalmente inactivos frente a las tres líneas de tumores ensayados. 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.

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

Los nuevos complejos del Ru(III) han sido ensayados frente

a los ratones de la cepa "Swiss white mice" infectados por vía i.p. con 10 parásitos *T. evansi* (venezuelense), *T. rhodesiense* y *T. cruzi* (formas epimastigotas). Los complejos han sido administrados por vía s.c. como disoluciones en suspensión de aceite de cacahuete una hora después de inocular con las mencionadas líneas de infección tripanosómicas. 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 supervivencia (T en días) para los animales infectados y no tratados frente a los infectados y tratados. En el caso de los parásitos *T. evansi* y *T. rhodesiense* T = 5 días y en el de los parásitos *T. cruzi* (formas epimastigotas) T = 12 días.

Las claves para valorar la actividad antitripanosómica de los nuevos complejos del Ru(III) serían: Muy activo (Curativo), 2T + 8, y ningún parásito detectable en la sangre de los animales el día 8 y el día 30. Activo: 2T, y ningún parásito detectable 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). La parasitemia se mide en la sangre de los ratones el día 8 y eventualmente el día 30.

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
Resultados de los ensayos antitripanosómicos "in vivo" realizados con los nuevos complejos del Ru(III).

Complejo	Parásitos	Dosis mg/kg	Actividad
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_1)]^{2-}(\text{L}_1\text{H})_2^{2+}$	<i>T. rhodesiense</i>	200	Curativo
		100	Curativo
		50	Curativo
		25	Curativo
		10	Activo
		12,5	Activo
		6	Activo
		3	Activo
		1,5	Muy Activo
	0,75	Muy Activo	
	<i>T. evansi</i> (venezuelense)	200	Curativo
		100	Curativo
		50	Curativo
		25	Activo
		12,5	Activo
		6	Muy Activo
	3	Muy Activo	
	<i>T. cruzi</i>	200	Activo
		100	Muy Activo
50		Muy Activo	
25		Muy Activo	
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_2)]^{2-}(\text{L}_2\text{H})_2^{2+}$	<i>T. rhodesiense</i>	200	Curativo
		100	Activo
		50	Muy Activo
	<i>T. evansi</i> (venezuelense)	200	Activo
		100	Muy Activo
	<i>T. cruzi</i>	200	Muy Activo
		100	Muy Activo

D.G. Craciunescu y cols.		An. Real Acad. Farm.		
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_3)]^{2-}(\text{L}_3\text{H})_2^{2+}$	T. rhodesiense	400	Activo	
		200	Activo	
		100	Activo	
		50	Muy Activo	
	T. evansi (venezuelense)	400	Activo	
		200	Muy Activo	
		100	Muy Activo	
		50	Muy Activo	
	T. cruzi	400	Muy Activo	
		200	Muy Activo	
	$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_4)]^{2-}(\text{L}_4\text{H})_2^{2+}$	T. rhodesiense	400	Activo
			200	Muy Activo
100			Muy Activo	
T. evansi (venezuelense)		400	Muy Activo	
		200	Muy Activo	
		100	Inactivo	
T. cruzi		400	Muy Activo	
		200	Inactivo	
		100	Inactivo	
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_7)_2]^- (\text{L}_7\text{H})^+$		T. rhodesiense	600	Curativo
			500	Curativo
			400	Activo
	200		Activo	
	100		Activo	
	50		Activo	
25	Activo			
12,5	Muy Activo			
6	Muy Activo			

Vol. 61, (4) 1995		Actividades farmacológicas duales	
$[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L}_5)]^{2-}(\text{L}_5\text{H}_2)^{2+}$	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Activo
		100	Activo
		50	Inactivo
	T. evansi (venezuelense)	400	Activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
		800	Activo
	T. cruzi	600	Muy Activo
		400	Muy Activo
		100	Inactivo
		50	Inactivo
400		Activo	
T. rhodesiense	200	Inactivo	
	100	Inactivo	
	400	Muy Activo	
T. evansi (venezuelense)	200	Inactivo	
	100	Inactivo	
	400	Muy Activo	
T. cruzi	200	Inactivo	
	100	Inactivo	
	400	Muy Activo	
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_6)_2]^- (\text{L}_6\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
	T. evansi (venezuelense)	400	Muy Activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
T. cruzi	400	Muy Activo	
	200	Inactivo	
	100	Inactivo	
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_8)_2]^- (\text{L}_8\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo
	T. evansi (venezuelense)	400	Muy Activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
	T. cruzi	400	Muy Activo
		200	Inactivo

$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_9)_2]^- (\text{L}_9\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo
	T. evansi (venezuelense)	400	Muy Activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
	T. cruzi	400	Muy Activo
		100	Inactivo
		50	Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{10})_2]^- (\text{L}_{10}\text{H})^+$	T. rhodesiense	800	Muy Activo
		600	Muy Activo
		400	Muy Activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
		50	Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{11})_2]^- (\text{L}_{11}\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo
		50	Inactivo
		25	Inactivo
			Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{12})_2]^- (\text{L}_{12}\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{13})_2]^- (\text{L}_{13}\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{17})_2]^- (\text{L}_{17}\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Activo
		100	Activo
		50	Activo
		25	Muy Activo
		12,5	Muy Activo

	T. evansi (venezuelense)	400	Activo
		200	Muy Activo
		100	Muy Activo
	T. cruzi	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{18})_2]^- (\text{L}_{18}\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Activo
		100	Activo
		50	Muy Activo
		25	Muy Activo
	T. evansi (venezuelense)	400	Activo
		200	Muy Activo
		100	Muy Activo
	T. cruzi	400	Activo
		200	Muy Activo
		100	Muy Activo
		50	Muy Activo
		25	Muy Activo
		12,5	Inactivo
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L}_{19})_2]^- (\text{L}_{19}\text{H})^+$	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Activo
		100	Activo
		50	Activo
		25	Muy Activo
		12,5	Muy Activo
		6	Inactivo

	T. evansi (venezuelense)	400	Activo
		200	Activo
		100	Muy Activo
		50	Inactivo
	T. cruzi	400	Activo
		200	Activo
		100	Muy Activo
		50	Muy Activo
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₀) ₂] ⁻ (L ₂₀ H) ⁺	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₁) ₂] ⁻ (L ₂₁ H) ⁺	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Activo
		100	Muy Activo
		50	Inactivo
T. evansi (venezuelense)	400	Muy Activo	
	200	Inactivo	
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₂) ₂] ⁻ (L ₂₂ H) ⁺	T. rhodesiense	400	Activo
		200	Muy Activo
		100	Muy Activo
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₃) ₂] ⁻ (L ₂₃ H) ⁺	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₅) ₂] ⁻ (L ₂₅ H) ⁺	T. rhodesiense	400	Muy Activo
		200	Muy Activo
		100	Inactivo

PIES DE TABLA II. - Si algunos de los complejos del Ru(III) no aparecen en la Tabla, esto significa que han sido totalmente inactivos (para dosis de 400, 200 y 100 mg/Kg) frente a las tres líneas de infección tripanosómicas empleadas. Si al lado de algún complejo no aparece alguna línea tripanosómica, significa que el complejo ha resultado también inactivo. Las claves de los ligandos son idénticas a las de la Tabla I.

7) Histopatología renal y hepática (Microscopía Óptica).

Hemos realizado también (véase fig.1) un estudio de histopatología renal y hepática de los cortes semifinos por microscopía óptica de los riñones y del hígado, a las 192 horas, de las ratas de la cepa Wistar, que habían recibido por vía i.p. $\frac{1}{2}$ DL₅₀ del complejo [Ru^{III}₂(Cl)₈(L)]²⁻ (LH)₂²⁺ donde L = Pentamidina (DL₅₀ = 500 mg/Kg); empleando los métodos de tinción y el instrumental mencionados en otros trabajos nuestros (13-17).

8) Valoración de la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y hematotoxicidad (a las 192 h.) en la sangre de los ratones que recibieron $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de cada complejo.

En la Tabla III se muestran los valores, medidos en la sangre de las ratas de los siguientes parámetros: %mg urea, %mg creatina, niveles enzimáticos "SGOT" y "GOT" y se ha calculado el cociente L/N. Para cada complejo se ha empleado un lote de 6 ratas de la cepa "Wistar" a las que se les ha administrado el complejo por vía i.p. como suspensión en aceite de cacahuete. Se ha empleado este vehículo para evitar la hidrólisis de los nuevos complejos del Ru(III). Los valores de la DL₅₀ de los complejos pertenecientes a las estructuras dianiónicas y dinucleares [Ru^{III}₂(Cl)₈(L)]²⁻ (LH)₂²⁺ están comprendidas en el rango de 500-600 mg/kg en tanto que los valores DL₅₀ de los complejos monoaniónicos [Ru^{III}(Cl)₄(L₂)]⁻ (LH)⁺ lo están en el rango 350-500 mg/Kg, aproximadamente. La lectura de los resultados que aparecen en la Tabla III se hizo a las 192 h. después de administrar los complejos

TABLA III

Estudio de las nefrotoxicidades, hepatotoxicidades y hematoxicidades (a las 192 h.) inducidas por la administración de 1/2 DL₅₀ de los complejos vía i.p.

COMPLEJOS	%mg Urea	%mg Crea- tinina	GOT	SGOT	L/N
CONTROLES	46,66	0,620	51,20	17,90	6,15
[Ru ^{III} ₂ (Cl) ₈ (L ₁) ₂] ²⁻ (L ₁ H ₂) ²⁺	55,12	0,815	79,20	22,10	6,10
[Ru ^{III} ₂ (Cl) ₈ (L ₂) ₂] ²⁻ (L ₂ H ₂) ²⁺	56,17	0,810	78,20	21,90	6,14
[Ru ^{III} ₂ (Cl) ₈ (L ₃) ₂] ²⁻ (L ₃ H ₂) ²⁺	54,92	0,790	78,60	21,20	6,12
[Ru ^{III} ₂ (Cl) ₈ (L ₄) ₂] ²⁻ (L ₄ H ₂) ²⁺	56,64	0,820	79,17	21,60	6,14
[Ru ^{III} ₂ (Cl) ₈ (L ₅) ₂] ²⁻ (L ₅ H ₂) ²⁺	58,51	0,842	79,90	22,30	6,10
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₆) ₂] ⁻ (L ₆ H) ⁺	57,51	0,823	79,10	22,20	6,12
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₇) ₂] ⁻ (L ₇ H) ⁺	56,84	0,790	78,90	22,10	6,10
[[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₈) ₂] ⁻ (L ₈ H) ⁺	55,92	0,820	78,20	22,06	6,11
[[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₉) ₂] ⁻ (L ₉ H) ⁺	56,21	0,870	78,90	21,83	6,10
[[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₀) ₂] ⁻ (L ₁₀ H) ⁺	57,20	0,790	79,30	22,10	6,10
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₁) ₂] ⁻ (L ₁₁ H) ⁺	55,20	0,82	51,54	17,83	6,10
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₂) ₂] ⁻ (L ₁₂ H) ⁺	56,91	0,87	50,21	17,60	6,11
[[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₃) ₂] ⁻ (L ₁₃ H) ⁺	57,03	0,99	51,26	18,90	6,10
[[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₄) ₂] ⁻ (L ₁₄ H) ⁺	56,91	0,88	51,77	18,32	6,12
[[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₅) ₂] ⁻ (L ₁₅ H) ⁺	57,31	0,89	52,21	18,76	6,14
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₆) ₂] ⁻ (L ₁₆ H) ⁺	55,22	0,80	51,92	17,74	6,09
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₇) ₂] ⁻ (L ₁₇ H) ⁺	56,21	0,82	51,72	17,03	6,08
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₈) ₂] ⁻ (L ₁₈ H) ⁺	56,92	0,83	52,62	17,90	6,08
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₁₉) ₂] ⁻ (L ₁₉ H) ⁺	57,29	0,79	52,40	17,82	6,09
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₀) ₂] ⁻ (L ₂₀ H) ⁺	56,64	0,81	51,93	17,21	6,10
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₁) ₂] ⁻ (L ₂₁ H) ⁺	57,20	0,79	52,40	17,80	6,09
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₂) ₂] ⁻ (L ₂₂ H) ⁺	57,12	0,77	52,40	17,80	6,10
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₃) ₂] ⁻ (L ₂₃ H) ⁺	56,20	0,85	52,90	17,30	6,11
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₄) ₂] ⁻ (L ₂₄ H) ⁺	44,83	0,78	52,25	17,40	6,14
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₅) ₂] ⁻ (L ₂₅ H) ⁺	54,93	0,75	53,12	17,90	6,10
[Ru ^{III} (Cl) ₄ (L ₂₆) ₂] ⁻ (L ₂₆ H) ⁺	55,72	0,77	54,29	17,81	6,09

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados de los análisis químicos, que no difieren en

± 1% de los valores teóricos, indican claramente hacia el hecho de que nos encontraríamos con dos grandes series de complejos aniónicos del Ru(III):

a). Complejos dinucleares y dianiónicos del Ru(III) de fórmula general [Ru^{III}₂(Cl)₈(L)]²⁻(LH)₂²⁺ donde L = ligando tetradentado, enlazado hacia los dos cationes de Ru(III) a través de sus grupos -NH y NH₂ (medicamentos clásicos de acción antitripanosómica y/o antileismaniásica, derivados de diamidinas aromáticas: "Pentamidina", "Hexamidina", "Stilbamidina", "2-Hidroxistilbamidina", "Berenile"). LH₂ = Ligando diprotonado. El entorno coordinativo hacia cada uno de los cationes de Ru(III) resultaría así de tipo octaédrico.

b) Complejos mononucleares y monoaniónicos del Ru(III), de fórmula general [Ru^{III}(Cl)₄(L)₂]⁻(LH)⁺, de estructura octaédrica donde L = medicamentos clásicos anti-parasitarios, aminas heterocíclicas y sulfonamidas, descritas anteriormente, que presentan una actuación monodentada hacia el catión Ru(III). LH⁺ = ligandos monoprotonados.

En los espectros I.R. de los complejos [Ru^{III}₂(Cl)₈(L)]²⁻(LH)₂²⁺ encontramos para todos los ligandos los siguientes aspectos generales:

- I) Los complejos presentan una sola banda de intensidad moderada, asignada a las vibraciones de tensión νRu-Cl, a frecuencias de 300-350 cm⁻¹ y que está ausente en los espectros I.R. de los ligandos puros (L).
- II) Se manifiesta también en el espectro I.R. unas bandas de intensidad débil, centradas en el rango de frecuencias 580-640 cm⁻¹ asignadas a las vibraciones de tensión νRu-N. Estas bandas están ausentes en los espectros I.R. de los ligandos puros (L).
- III) Se observa en los espectros I.R. de los complejos un desplazamiento del orden de 20-40 cm⁻¹ hacia menores frecuencias, de la banda de tensión νN-H, perteneciente a los grupos donadores -NH y NH₂ de los ligandos (regiones 2700-2800 y 3100-3300cm⁻¹, respectivamente), con respecto a los espectros I.R.

de los ligandos puros. Este hecho, confirma la actuación coordinadora de los ligandos (L) hacia los cationes de Ru(III) a través de los grupos -NH y -NH₂.

Estas observaciones de los estudios rutinarios de los espectros I.R. es obvio que deberán ser completadas con el estudio de difractogramas de Rayos X, para visualizar mejor su estructura en la que, al parecer, se mantiene el entorno octaédrico alrededor de los cationes de Ru(III); estudios que realizamos en la actualidad.

Los espectros I.R. de los complejos monoaniónicos [Ru^{III}(Cl)₄(L)₂]⁻ (LH)⁺ donde los ligandos L son derivados del imidazol, tiazol y sulfonamidas, ponen de manifiesto los siguientes aspectos generales:

- Todos los complejos presentan una banda de intensidad moderada centrada en el rango de las bajas frecuencias (300-360 cm⁻¹), asignada a las vibraciones de tensión $\nu_{\text{Ru-Cl}}$, que demuestra la existencia de enlaces Ru-Cl en estos complejos y que está ausente en las sales puras.
- En los espectros I.R. de los complejos aparecen bandas débiles centradas en la región 580-690 cm⁻¹ asignadas a las vibraciones de tensión $\nu_{\text{Ru-N}}$. Estas bandas están ausentes en los espectros I.R. de los ligandos puros confirmando así la existencia de enlaces coordinados entre los átomos N de los ligandos y los cationes Ru(III).
- Los derivados de imidazol, al parecer coordinan hacia el catión Ru(III) a través del átomo de N terciario, no quedando implicado en la coordinación el grupo -NH del derivado de imidazol, y verificándose así la actuación como ligandos monodentados de estos derivados, ya que las bandas correspondientes a la tensión $\nu_{\text{C=N}}$ experimentan un desplazamiento hacia menores frecuencias en los complejos con respecto a los ligandos puros (del orden de 20 a 40 cm⁻¹), hecho indicativo de la implicación en la coordinación de los átomos de N terciarios de los ligandos (rango de frecuencias 1680-1640 cm⁻¹).
- Los derivados de tiazol, coordinan hacia el Ru(III) exclusiva-

mente a través de los átomos de N terciarios, ya que las bandas de tensión $\nu_{\text{C=N}}$ se encuentran desplazadas hacia menores frecuencias (20-25 cm⁻¹) en los espectros I.R. de los complejos con respecto a los ligandos (región 1670-1690 cm⁻¹).

- Los derivados de sulfonamidas coordinan hacia el Ru(III) a través de sus grupos -NH₂ hexocíclicos, comportándose como ligandos monodentados, lo que se describió también en otros complejos del grupo del Pt, con Rh(I) y (III), Ir(I) y Pt(II) y (IV) (13-19). Las bandas de tensión $\nu_{\text{N-H}}$, de los grupos -NH₂ de las sulfonamidas (rango de 3100-3300 cm⁻¹) experimentan desplazamientos a menores frecuencias en los espectros I.R. de los complejos con respecto a los ligandos puros (alrededor de 30 cm⁻¹).

Evidentemente una confirmación absoluta de las estructuras propuestas para los nuevos complejos del Ru(III) se obtendría únicamente a través de un detallado estudio de sus difractogramas de Rayos X, estudio que ya emprendimos en nuestros Laboratorios.

Examinando los resultados de los ensayos anticancerosos "in vivo" con los nuevos complejos neutros y octaédricos del Ru(III) - véase la TABLA I - podemos poner de manifiesto los siguientes aspectos:

- Tanto los complejos pertenecientes a una serie como a la otra son más activos frente a los tumores ascíticos de Landschutz que frente a los tumores ascíticos de Ehrlich. B.K. Kepler encontró en varias sales complejas de [Ru^{III}(Cl)₄(L)₂]⁻ (LH)⁺ donde L = derivados de imidazol, indazol y tiazol, un gran efecto anticanceroso "in vivo" no solamente frente a los tumores ascíticos sino también frente a distintas líneas de tumores sólidos, a la vez que su actuación "in vivo" frente a las distintas líneas de tumores leucémicos (P388, L1210) era bastante pobre (5,6,8).
- Ninguno de los nuevos complejos del Ru(III) descritos en este trabajo 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) Las sales complejas pertenecientes a las series $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^- (\text{LH})^+$ donde L = derivados de tiazol, pirazina y acridina, presentados en la Tabla I, parecen ser los más eficaces agentes antitumorales; observación válida también para los derivados de indazol.

Parece que hay una relación farmacológica dual (véase Tabla II) entre los efectos antitumorales y los tripanosómicos desplegados por las sales complejas del Ru(III). No obstante esta relación parece operante si se examinan únicamente distintos subtipos de sales complejas (Tabla II).

En líneas generales los parásitos más sensibles a la actuación de los complejos del Ru(III) son: *T. evansi* y *T. rhodesiense*, siendo los parásitos *T. cruzi* los más resistentes. El complejo más activo es $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ donde L = Pentamidina, en todas las líneas de infección tripanosómicas empleadas, siendo su efecto curativo frente al *T. rhodesiense* (incluso para dosis relativamente bajas, véase Tabla II). También son muy eficaces los restantes complejos dímeros y aniónicos del Ru(III) pertenecientes a las diaminas aromáticas (L_2 - L_5).

Es interesante destacar que para la serie $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Cl})_4(\text{L})_2]^- (\text{LH})^+$, donde L = Misnidazole (agente clásico antifúngico), podría también ser un agente tripanocida.

Según los resultados de la Tabla III, parece ser que la toxicidad limitante para ambas series de complejos de Ru(III), es la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad; puesto que a las 192 h. después de administrar $\frac{1}{2}$ DL_{50} de los complejos via i.p. como suspensiones de aceite de cacahuete, para evitar procesos de hidrólisis y/o de reacciones redox, los parámetros %mg urea y %mg creatinina experimentan aumentos del orden del 25-50% respecto a los controles. Los nuevos complejos del Ru(III) (véase Tabla III), carecen de potencial hematotóxico por cuanto los valores de los cocientes L/N, no descienden en más de un 10 % con respecto a los controles. Hemos podido confirmar estos

indicios de unas toxicidades renales y hepáticas catalogables de leves o moderadas, realizando también un estudio histopatológico (fig 1) de los cortes semifinos de los hígados y riñones de las ratas que habían recibido por vía i.p. $\frac{1}{2}$ DL_{50} del complejo más interesante $[\text{Ru}^{\text{III}}_2(\text{Cl})_8(\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$ donde L = Pentamidina (DL_{50} = 500 mg/Kg).

Este estudio histopatológico de microscopía óptica, se ha realizado empleando los métodos de tinción y el equipo mencionado en otros trabajos nuestros (13-19).

Podemos apreciar en las microfotografías 3 y 4 (fig.1) que el parénquima renal presenta a nivel glomerular asas vasculares ligeramente hinchadas y dilatadas, encontrándose repletas de hematíes y con algunos elementos polimorfo nucleares neutrófilos en su luz. A nivel de las células epiteliales parietales se observa una hiperplasia e hinchamiento. En la luz de los glomérulos existe un exudado sero-hemático, observándose así mismo células epiteliales parietales desprendidas. En la luz de los túbulos de forma focal, se observa la presencia de acúmulos PAS positivos. También en las microfotografías 3 y 4 se pone de manifiesto, a nivel de los túbulos contorneados proximales, zonas de erosión y desprendimiento del ribete en cepillo a la luz tubular, junto a zonas donde se mantiene parcial o totalmente. Las células epiteliales proximales, presentan en algunos casos intensa balonización citoplasmática, mostrándose los núcleos, en general, con aspecto laxo. En las microfotografías 5 y 6 (fig.1), se observan túbulos con células epiteliales proximales necrosadas (microfotografía 5), existiendo además desprendimiento de éstas a la luz y presencia de exudado sero-hemático en la luz tubular (microfotografía 6).

En cuanto a los túbulos colectores, asas de Henle y túbulos contorneados distales, no se han observado alteraciones morfohistológicas significativas.

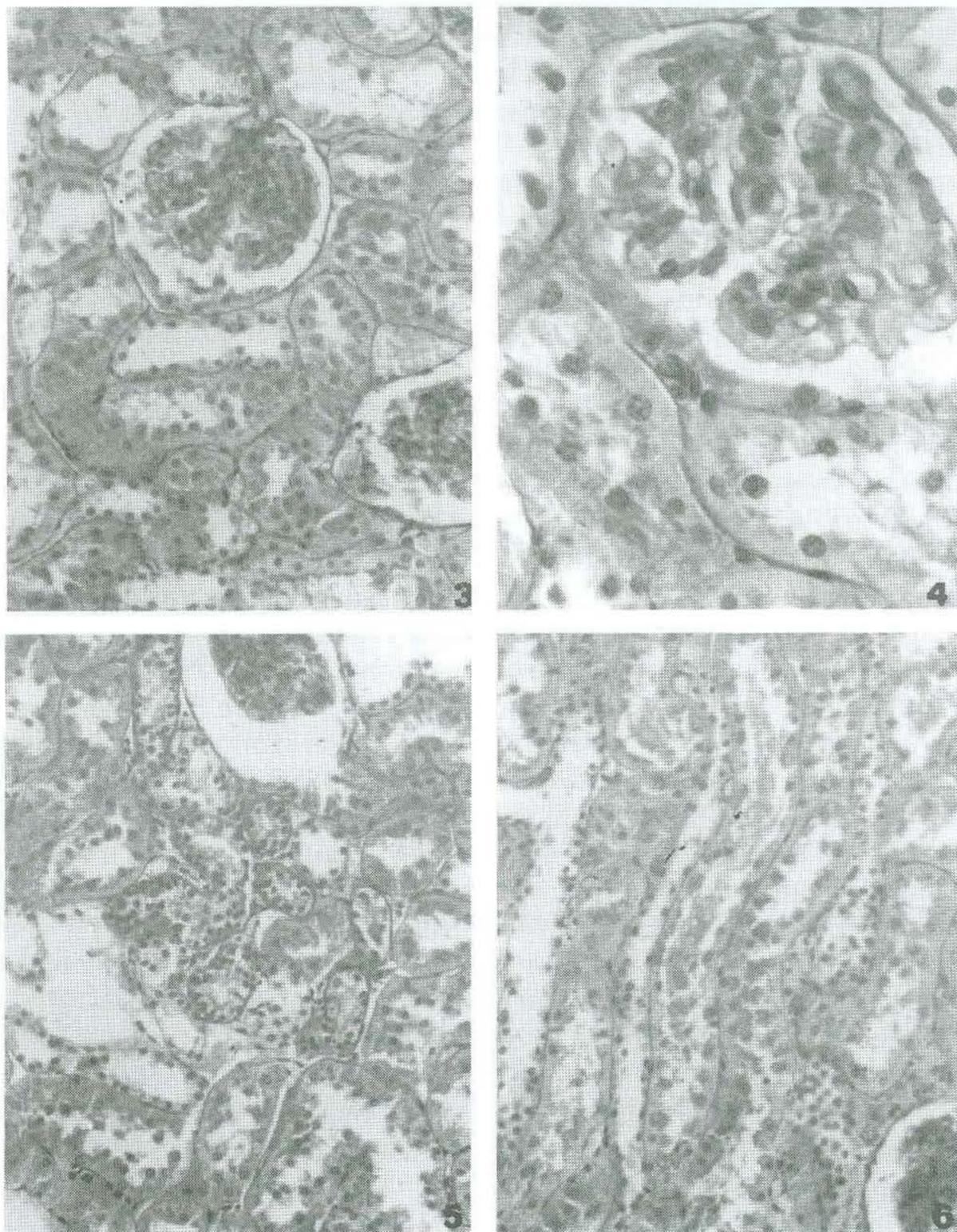
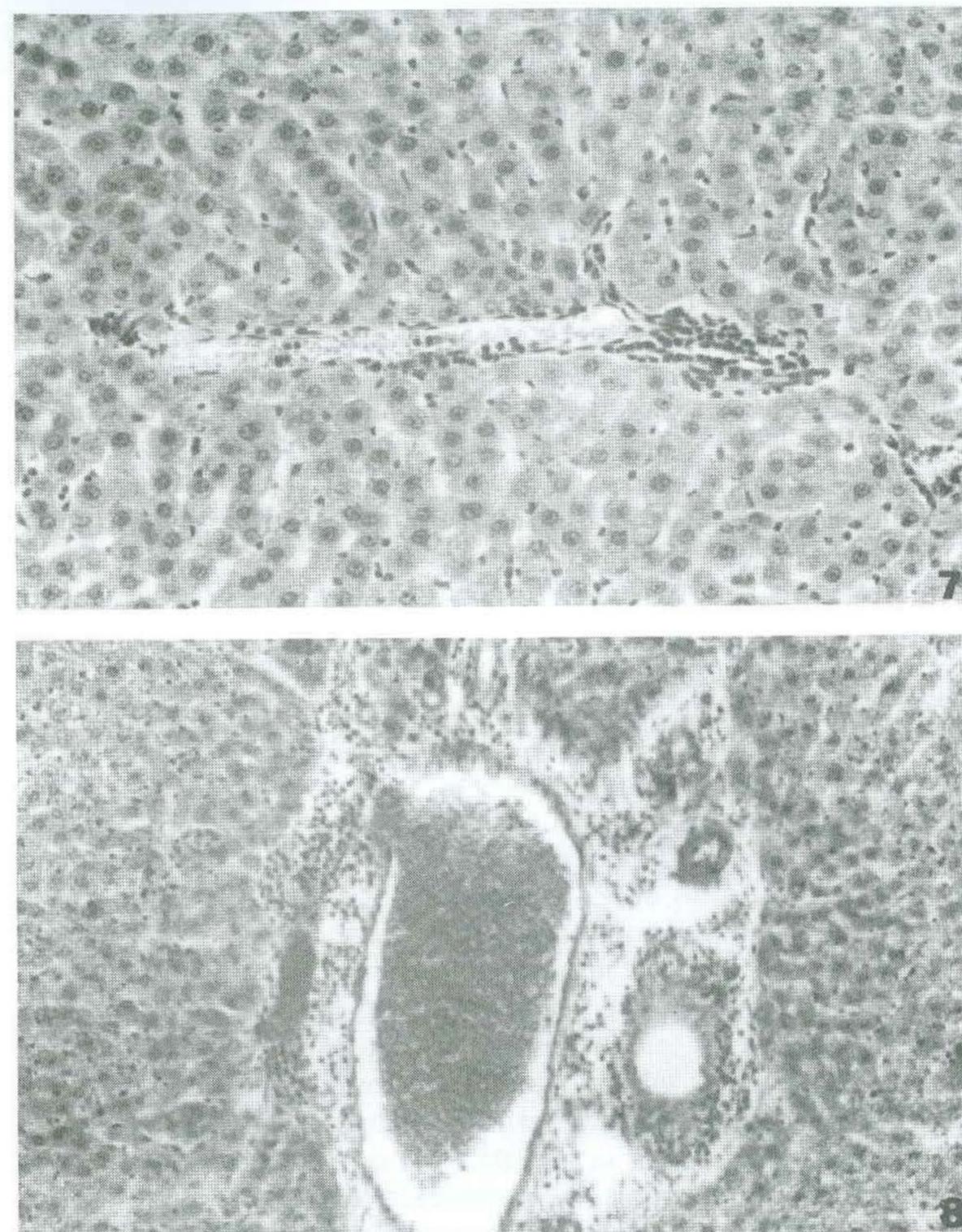


Fig. 1.- (Comprende las microfotografías 3-8).- Datos de Microscopía Óptica a las 192 h. en los cortes de los riñones y del hígado de las ratas tratadas con $\frac{1}{2}$ DL₅₀ del complejo $[\text{Ru}^{\text{III}}_2 (\text{Cl}_6) (\text{L})]^{2-} (\text{LH})_2^{2+}$, donde L=Pentamidina.



Continuación Fig. 1

En las microfotografías 7 y 8 (fig. 1), el parénquima hepático, presenta como signos de degeneración hepatocelular, anisocariosis, degeneración hidrópica y en algunos casos balonización y basofilia citoplasmática, así como pignosis nuclear.

A nivel sinusoidal, existe un ligero infiltrado inflamatorio de leucocitos, observándose a nivel de la vena centrolobulillar marginación de leucocitos adosados bien al endotelio de la pared venosa, o bien atravesando ésta e infiltrando zonas proximales (fig 1, microfotografía 7).

A nivel de los espacios porta, junto a un marcado edema, existe un infiltrado inflamatorio leucocitario (microfotografía 8, fig.1).

De esta manera, ponemos de relieve el hecho de que los estudios de histopatología renal y hepática parecen confirmar los resultados de la Tabla III, en el sentido de que las toxicidades limitantes en el caso de los nuevos complejos de Ru(III) descritos en este trabajo, son la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. B. K. Keppler y col. postularon para estas sales complejas con imidazol y sus derivados, la existencia de unas importantes toxicidades de los tipos mencionados (20).

Nos parece de interés mencionar el hecho que M. J. Clarke y col. al estudiar la acción de este tipo de complejos con Ru(II) y (III), consideraban la existencia de unos procesos de óxido-reducción del Ru(III) al Ru(II) en la biofase (21,22), con el fin de interpretar los importantes procesos de desorganización del ADN tumoral y de la interacción con la guanosina, que presentaban varios antitumorales de Ru(II) y (III) en los medios hipóxicos, característicos de los entornos tumorales. Algunos datos de nuestro equipo por Microscopía Electrónica (23) en los parásitos *T. rhodesiense* y/o *cruzi*, con complejos del tipo $[Ru^{III}(Cl)_4(L)_2] (LH)^+$, parecen apoyar la hipótesis de que el sitio primario de la actuación de estas sales complejas es el ADN, ya que el ADN del kinetoplasto de los parásitos aparece enormemente engrosado y muy electrodensos, así como la cromatina. Estos hechos apuntan hacia una actuación alquilante sobre el ADN de las distintas

estructuras de los parásitos.

Además, en el estudio de Microscopía Electrónica (23) se verifican una serie de lesiones en las mitocondrias del parásito, que son identificadas con las producidas con la Pentamidina pura, lo que podría significar que también el complejo actuaría como un eficaz transportador hacia el parásito de ligando Pentamidina.

En la Tabla IV, se muestran unos experimentos antitripanosómicos "in vivo" en los que hallamos el hecho interesantísimo de que el Índice Terapéutico del complejo mencionado, parece muy elevado respecto al I.T. de la Pentamidina pura, frente a los parásitos *T. rhodesiense*.

TABLA IV
Indices terapéuticos producidos por la administración de varios complejos de Ru(III).

COMPUESTOS	Parasito	DL ₅₀	DI ₉₀	IT
Pentamidina	<i>T. rhodesiense</i>	100	2	50
	<i>T. evansi</i> (venezuelense)	100	5	20
	<i>T. cruzi</i>	100	25	4
$[Ru^{III}_2(Cl)_8(L^*)]^{2-} (LH_2)^{2+}$	<i>T. rhodesiense</i>	500	3	166
	<i>T. evansi</i> (venezuelense)	500	12	40
	<i>T. cruzi</i>	500	200	2,5
Misonidazole	<i>T. rhodesiense</i>	600	20	30
$[Ru^{III}(Cl)_4(L^{**})_2] (LH)^+$	<i>T. rhodesiense</i>	480	25	19

Pies Tabla IV.- L* = Pentamidina. L** = Misonidazole. DL₅₀ = Dosis Letal 50 en mg/Kg. DI₉₀ = Dosis necesaria para reducir la parasitemia al 90 % en mg/Kg. IT = Índice terapéutico.

IV. CONCLUSIONES

Para las 26 nuevas sales complejas de Ru(III), se han puesto de manifiesto relaciones farmacológicas duales "in vivo" (a-

titripanosómicas y antitumorales). Las toxicidades limitantes parecen ser la nefrotoxicidad y la hepatotoxicidad, siendo despreciable o nula la hematotoxicidad. Resultan muy importantes las actividades antitripanosómicas "in vivo", especialmente frente al *T. rhodesiense*, desplegadas por varias de las sales complejas y especialmente, por el complejo dianiónico y dinuclear $[\text{Ru}_2(\text{Cl})_8(\text{L})_2]^{2-}$ (LH)₂²⁺ donde L = Pentamidina.

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 (1992) *Anal Real Acad Farm.* 58, 207-231.
- (2) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB (1991) *Anal Real Acad Farm.* 57, 221-240.
- (3) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1988). *An. Real. Acad. Farm.* 54, 46-69.
- (4) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1988). *An. Real. Acad. Farm.* 54, 16-45.
- (5) B.K. KEPPLER, W. RUPP, U.M. JUHL, H. ENDRESS, R. NIEBL Y W. BALZER. (1987). *Inorg. Chem.* 26, 4366-4369.
- (6) B.K. KEPPLER Y W. RUPP. (1986). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* III, 166-176.
- (7) M.J. CLARKE, S. BITLER, D. RENNERT, M. BUCHBINDER Y A.D. KELMAN. (1980). *J. Inorg. Biochem.* 12, 279-305.
- (8) M.J. CLARKE, B. JANSEN, K. MARX Y R. KRUEGER. (1986). *Inorg Chim. Acta.* 124, 13-20.
- (9) M.J. CLARKE (1980). *Metals Ions in Biol. Syst.* II, 231-255.
- (10) M.J. CLARKE Y P.E. MORISEY. (1982). *Anal. Biochem.* 122, 404-409.
- (11) J.H. LUFT. (1971). *Anat. Rec.* 171, 369-407.
- (12) N. FARRELL. (1981). *J. Inorg. Biochem.* 14, 261-268.
- (13) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1985). *An. Real Acad Farm.* 51, 241-268.
- (14) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1993). *An. Real Acad Farm.* 59, 73-97.
- (15) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1992). *An. Real Acad Farm.* 58, 529-549.
- (16) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1991). *An. Real Acad Farm.* 57, 391-418.
- (17) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1990). *An. Real Acad Farm.* 56, 469-486.
- (18) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1985). *An. Real Acad Farm.* 51, 653-658.
- (19) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1991). *Anticancer Res.* 9, 731-736.
- (20) B. K. KEPPLER Y COLAB. (1989). *Progr. Clin. Biochem. Med.* 10, 41-48.

- (21) M. J. CLARKE Y P. E. MORISEY (1984). *Inorg. Chim. Acta.* 80, L 69-73.
- (22) M.E. KASTNER, K. COFFEY, M.J. CLARKE, S.E. EDMONS Y K. ERIKS. (1981). *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5747-5755.
- (23) D.G. CRACIUNESCU Y COLAB. (1994). En imprenta. *Drug. Res.*