

SALVADOR GONZALEZ GARCIA
CATEDRATICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA

400840
MADE IN SPAIN

Algunas bases químicas y estructurales
de la acción antitumoral de complejos
inorgánicos



DISCURSO DE APERTURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
CURSO ACADÉMICO 1988-89

SALVADOR GONZALEZ GARCIA
CATEDRATICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA

Algunas bases químicas y estructurales
de la acción antitumoral de complejos
inorgánicos



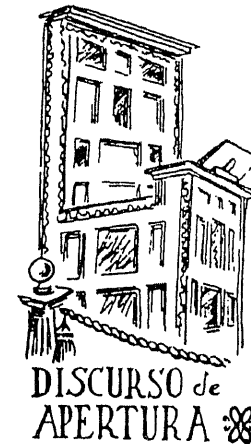
DISCURSO DE APERTURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
CURSO ACADÉMICO 1988-89

**Algunas bases químicas y estructurales
de la
acción antitumoral de complejos inorgánicos**

SALVADOR GONZALEZ GARCIA
CATEDRATICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
N.º Documento	56436
N.º Copia	241462

Algunas bases químicas y estructurales
de la acción antitumoral de complejos
inorgánicos



UNIVERSIDAD DE GRANADA
CURSO ACADEMICO 1988-89

*A Mari Carmen y a nuestros hijos,
Salvador, Marisa, Miguel Angel, Mari Carmen,
M.^a José, Jaime y Manolo*

UNIVERSIDAD DE GRANADA. DISCURSO DE APERTURA
DEL CURSO ACADEMICO 1988-89. Edita e imprime: Servicio de
Publicaciones. Campus Universitario de Cartuja. Granada.
Depósito legal: GR/704-88

Impreso en España

Printed in Spain

EXCMO. SR. RECTOR MAGNIFICO
EXCMAS. E ILMAS. AUTORIDADES
SRES. PROFESORES Y ALUMNOS
SRAS. Y SRES.

Muchos de los que me precedieron en la obligación de pronunciar la lección inaugural de un nuevo curso académico comenzaron solicitando la benevolencia de tan ilustre auditorio, para fortalecer su espíritu con la indulgencia del mismo. Yo deseo también hacerlo así, y confesar mis limitaciones al dirigirme a un público tan selecto y heterogéneo.

Como debió ocurrir también a muchos de los que me precedieron, la elección de esta primera lección me llevó a serias reflexiones, impuestas por la necesidad de tratar algún tema científico que, entrando dentro del dominio de la Química Inorgánica, pudiera ser de un interés general para este auditorio.

Debo señalar lo mucho que pesó en la elección el hecho de pertenecer al claustro de la Facultad de Farmacia, cuyo objetivo científico se centra esencialmente en torno al medicamento.

Un hecho, excepcionalmente coincidente con el comienzo de este curso, condicionó también la libertad en la elección: la inauguración de las magníficas instalaciones de la nueva Facultad de Farmacia. Todo esto me inclinó por una lección que sirviera para reforzar la idea, tantas veces defendida por mí, de la singularidad y perfil propio de los estudios de farmacia, incluso en el plantea-

miento de los objetivos de disciplinas básicas, como la Química Inorgánica, que pudieran parecer de un dominio general y común. Estoy convencido de la importancia que las orientaciones y matices en su planteamiento didáctico tienen a la hora de servir al curriculum farmacéutico.

En razón a lo expuesto me decidí por un tema de Bioinorgánica que, además de importantes connotaciones con el medicamento y la salud, tuviera un manifiesto interés interdisciplinar, pudiera cimentarlo en mis conocimientos científicos y, al mismo tiempo, ilustrarlo con alguna información de mi propia investigación.

Así fue como me decidí por este título: *Algunas bases químicas y estructurales de la acción antitumoral de complejos inorgánicos*.

De antemano sé que para su desarrollo he de entrar en campos que solapan con la Medicina, con la Biología y la Bioquímica, con la Química Orgánica, y con otras disciplinas de las que hay científicos muy cualificados entre el auditorio. A ellos, sobre todo, pido comprensión, ya que trato de informar de aspectos que afectan al campo de la Química de la Coordinación, aunque obligadamente tenga que referirme, por razones didácticas, a cuestiones relacionadas con sus especialidades. El desarrollo de esta lección me pone en este serio compromiso, pero al mismo tiempo me va a permitir entrar en uno de los campos más interesantes y activos con los que se enfrentan actualmente los científicos en su lucha con la terrible y temible enfermedad del cáncer.

INTRODUCCION

El cáncer se caracteriza esencialmente por la multiplicación y difusión incontrolada de formas celulares, poco diferenciadas y aparentemente anormales que, desde un tumor primario, pueden ser enviadas, a través de la sangre o del sistema linfático, a otras zonas del organismo donde producen tumores secundarios o metástasis del tumor primitivo.

Las causas de la enfermedad no son simples, aunque se conoce que ciertos metales actúan como sustancias carcinogénicas. La mayor parte de los cánceres se cree, sin embargo, que son causados por compuestos que tienen carácter de ligandos, como bencidina, isoniacida, metabolitos de triftófano, 8-hidroxiquinoleina, etc. y algunos cánceres producidos por virus.

La terapia del cáncer tropieza con el problema que plantea la dificultad de su localización inminente, ya que sus signos no suelen manifestarse hasta que las células cancerosas se implantan en un tejido normal. La terapia a emplear viene, entonces, determinada por el estadio de la enfermedad cuando es detectada, recurriendo a la extirpación quirúrgica y a la irradiación en los casos de tumores localizados.

Estas técnicas aportan, sin embargo, soluciones que son muchas veces limitadas, sobre todo cuando se ha producido ya la invasión de órganos nobles o cuando ya han aparecido metástasis o tumores secundarios.

En estos casos de cánceres diseminados surge la quimioterapia como recurso necesario para su tratamiento, campo en el que se viene investigando activamente desde hace más de cuarenta años.

Sin embargo, antes de 1969 el interés de los científicos se centró en el conocimiento de la carcinogenicidad de metales y sus sales más que en el de sus potenciales propiedades anticancerígenas. Pero a pesar de la dispersión de las investigaciones realizadas sobre la actividad anticancerígena de las sustancias químicas, los resultados condujeron a la introducción de compuestos, como las mostazas nitrogenadas, en el tratamiento de leucemias, así como de otros agentes anticancerígenos, como antibióticos, derivados de nucleósidos, esteroides, antifolatos, etc., para llegar finalmente al empleo de los compuestos de coordinación, en especial complejos de platino (II) y análogos, en el tratamiento de determinados cánceres en humanos.

* * *

DESCUBRIMIENTO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS DE PLATINO

Estudios en bacterias

La comunidad científica internacional atribuye, de hecho, el empleo de los compuestos de coordinación en la quimioterapia del cáncer al descubrimiento de la actividad biológica de complejos cloroaminados de Pt(II), realizado por Barnett Rosenberg en el año 1965.

Cabe señalar que, como ha ocurrido con otros importantes eventos científicos, el descubrimiento de Rosenberg fue casual y surgió a raíz de su traslado, en 1961, desde el Departamento de

Física de la Universidad de Nueva York al de Biofísica de la Universidad del Estado de Michigan. Atraído por unas microfotografías de células en fase mitótica de su división, diseñó una serie de experiencias para estudiar el efecto de los campos eléctricos y magnéticos en la multiplicación celular. Ideó para ello un aparato, equipado con electrodos de platino introducidos en un medio de cultivo "C", conteniendo NH_4Cl (medio de cultivo "C": 2 g/l de NH_4Cl ; 6 g/l de Na_2HPO_4 ; 3 g/l de KH_2PO_4 ; 3 g/l de NaCl ; 0,01 g/l de MgCl_2 y 0,026 g/l de Na_2SO_4). Para comprobar su funcionamiento y puesta a punto, realizó experiencias preliminares en cultivos con bacterias *Escherichia coli* en fase de crecimiento estacionario, observando un fenómeno conocido, pero inesperado. Bajo la acción del campo eléctrico se inhibe, como se observa en la figura 1, la división celular pero no el crecimiento de las bacterias, que se desarrollan con una sorprendente filamentosidad, alcanzando formas de longitud unas 300 veces superior a la de las formas normales.

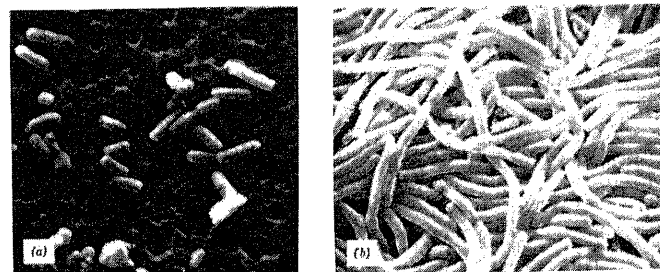


Fig. 1.- Microfotografías de: a) cultivo normal de *E. coli*. b) filamentosidad de *E. coli* en un medio de cultivo conteniendo unas pocas partes por millón de cisdiclorodiaminplatino(II). (Tomado de "Nucleic acid-metal ion interactions". Ed. por Thomas G. Spiro (1980)).

Pero el gran acierto de Rosenberg estuvo en sospechar que la filamentosidad no era debida a la corriente eléctrica sino a trazas de productos formados en el medio por electrolisis. Se encontró, en

tras que los no activos no conducen a la lisis, circunstancia que hacía pensar que los dos efectos, lisis y filamentación, pudieran surgir por un mecanismo similar que tuviera su causa en la interacción del complejo con el DNA.

Actividad antitumoral

Se llegó a pensar así que los complejos activos, que paralizan la división celular, pudieran tener también propiedades anticancerígenas. En tal sentido, se realizaron experiencias con ratones, tras la determinación de la dosis de complejo que produce la muerte del 50% de los animales, o DL_{50} , (13 mg/Kg de peso para el cisplatino), consistentes en inocular animales, por inyección bajo la piel, con 10 mg del tumor sólido, Sarcoma-180, que en 10 días se desarrolla hasta hacerse 100 veces mayor. Los animales inoculados se tratan con 8 mg/Kg de cisplatino en inyección intraperitoneal, comparándolos con un lote control, determinando en cada caso, por extirpación y pesada del tumor, la relación, T/C, entre el peso medio del tumor en el lote tratado y en el lote control. Los valores hallados son menores que 0,5 fijados como necesarios para considerar efectiva la sustancia. Las experiencias demostraron también la regresión, por el cisplatino, de tumores de 1 g de peso en animales con 20 g, siendo normales las expectativas posteriores de vida de los animales, que murieron por envejecimiento después de 30 meses.

La figura 3 ilustra parte de estos resultados, que pusieron también de manifiesto una vez más la estereoespecificidad de las sustancias, apoyando la conclusión de que los complejos conservan su geometría en el entorno biológico en que se introducen, sin degradarse a iones metálicos libres, con carácter de venenos no específicos.

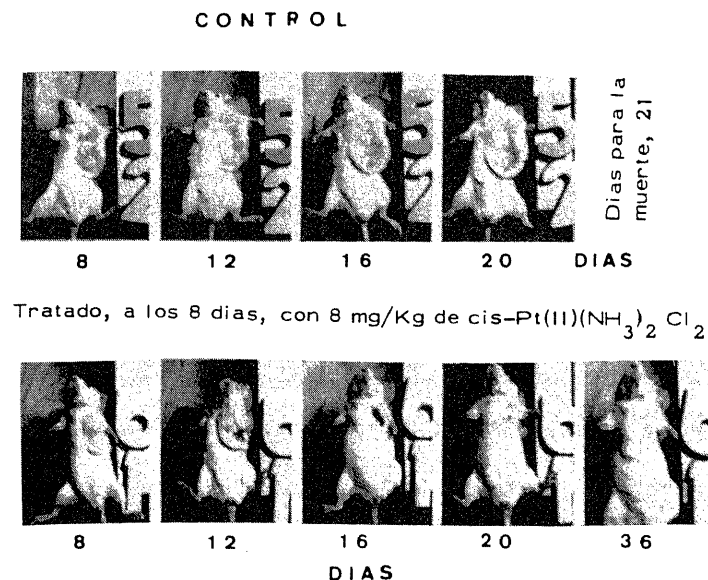


Fig. 3.- Fotografía que muestra la evolución con el tiempo de dos ratones inoculados con el tumor sólido, Sarcoma 180. El de la parte superior, del lote control no tratado con cisplatino, murió a los 21 días de la inoculación, cuando el tumor pesaba unos 3 gr. En el de la parte inferior, del grupo tratado al octavo día con una inyección intraperitoneal de cisplatino, se produjo la regresión del tumor seis días después, y murió de viejo a los tres años. (De "Metal ions in biological systems". Vol. 11. Ed. por H. Sigel).

Ensayos clínicos

Tras estas y otras experiencias, se procedió al ensayo de los compuestos, en el U.S. National Cancer Institute, frente a ratones con el tumor estandar líquido, Leucemia 1210, con resultados que confirman su actividad y que se publicaron en el número 222 (1969) de Nature, en un célebre trabajo firmado por B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko y W.H. Mansour.

De todos los complejos ensayados el más activo fue el cis-diclorodiamin Pt(II), con un amplio espectro frente a muchos

tumores implantados en animales. El complejo se sometió a un amplio "screening" farmacológico frente a diversos tumores, realizando además estudios de toxicidad que dieron una valiosa información sobre muchos aspectos de su comportamiento. Así, el cisplatino pasa, a los pocos minutos de su inyección en la cavidad peritoneal, al torrente sanguíneo donde, por la alta concentración en iones cloruro, se mantiene inalterado, excretándose por la orina sólo un 30-50% en los primeros 5 días, y el resto sólo lentamente. Un 5% atraviesa la membrana celular y en el citoplasma, donde la concentración en ion cloruro es 1/30 de la del plasma, se produce un cambio del cloruro por agua, para dar compuestos cargados, en un mecanismo hidrolítico que se verá más adelante.

Para llegar a estos resultados fue preciso, como señala el propio Rosenberg, abordar el problema con el concurso de especialistas en química de la coordinación, biofísica, biología molecular, fisiología, farmacología, microbiología, patología y clínica médica, constituyendo sin duda el mejor ejemplo de la utilidad y necesidad del establecimiento de estrechas relaciones interdisciplinarias en la investigación. Gracias a esta colaboración, el cis-DDP entra en 1972 en una primera fase de ensayos clínicos en el N.C.I., comportándose como una sustancia de singular actividad frente a tumores humanos, en especial los del aparato genitourinario. Se observó, sin embargo, una cierta acumulación de platino en riñón, hígado e intestino, y una escasa penetración en el sistema nervioso central. La nefrotoxicidad, con destrucción o necrosis de los túbulos renales, es factor limitante para la dosis del fármaco, aunque se reduce significativamente por prehidratación con diuresis, o disminuyendo la dosis, aprovechando la acción sinérgica que nace de su asociación con otros agentes quimioterapéuticos, como dietilditiocarbonato o tiosulfato. En cualquier caso, la toxicidad, que se asocia generalmente a la aparición de náuseas, vómitos, cierta neuropatía periférica, puede afectar también a la médula ósea, con una disminución de los leucocitos circulantes.

Pese a ello, el cisplatino fue aprobado en Diciembre de 1978 por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) como fármaco para el tratamiento de cánceres de testículos y ovarios y de cabeza y cuello, comercializándose en formas conteniendo NaCl y manitol, con el nombre de Platinol, y en el Reino Unido, en marzo de 1979, como Neoplatino.

La señalada toxicidad del cisplatino, en especial su toxicidad renal, hizo que las investigaciones se orientaran rápidamente al descubrimiento de nuevos complejos activos, menos tóxicos, en cuyo diseño fue esencial la intuición de los especialistas en Química de la Coordinación, ensayándose millares de sustancias con diversos ligandos, resultando activas sólo un bajo porcentaje, de las que algunas se incluyen en la figura 4.

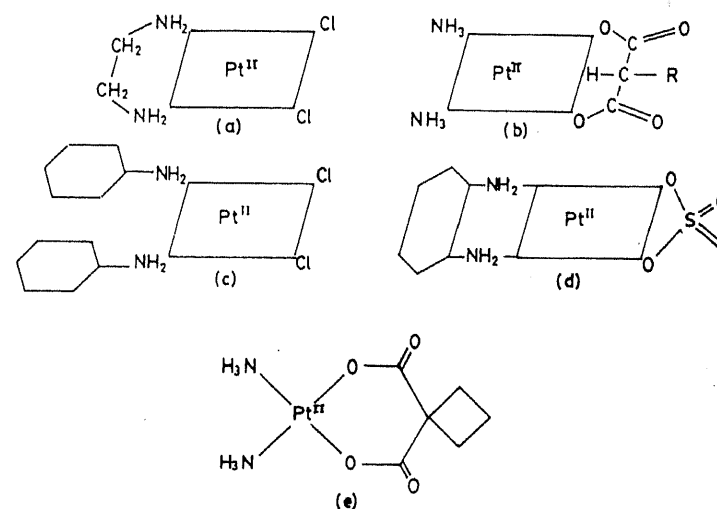


Fig. 4.- Estructura molecular de otros complejos con elevada actividad antitumoral. (a) dicloroetilendiaminplatino(II); (b) malonato (R sustituido) diaminplatino(II); (c) cis-diclorobis(ciclohexilamina)platino(II); (d) sulfato-1,2-diaminociclohexanoplatinum(II); (e) ciclobutano-1, 1-dicarboxilatodiaminplatino(II).

Es sorprendente que, pese al enorme esfuerzo realizado, solo se haya autorizado (en el Reino Unido), por su menor toxicidad, el uso clínico del ciclobutano-1, 1-dicarboxilato diaminplatino(II), $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(1,1\text{-CBDCA})]$, con el nombre comercial de carboplatino.

RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN COMPLEJOS DE PLATINO

Reactividad de especies complejas

Mientras se progresaba en la preparación y ensayo de nuevos fármacos, los equipos de investigación, haciendo uso de los conocimientos inorgánicos básicos de la química del platino y, en especial, de los avances logrados en la Química de la Coordinación, centraron también sus esfuerzos, durante los años setenta, en el esclarecimiento de las correlaciones estructura-actividad antitumoral.

Dada la gran afinidad del Pt(II) por el ligando NH_3 , parte de los trabajos se orientaron a la preparación de series análogas de compuestos resultantes de la sustitución del ion Cl^- , en el cisplatino, por ligandos neutros o negativos, de diferente labilidad, de acuerdo con el orden preestablecido siguiente:



El ensayo de los compuestos en cultivos bacterianos y celulares y frente a animales inoculados con el tumor S-180 reveló que complejos con grupos lábiles, como H_2O y NO_3^- , son altamente tóxicos; que los de ligandos con enlaces robustos al platino, como

SCN^- y NO_2^- , son inactivos, y que los de alta actividad son siempre compuestos con ligandos monodentados de labilidad intermedia, como Cl^- y Br^- .

Otros trabajos se orientaron a la síntesis y ensayos biológicos de series análogas de complejos obtenidos por sustitución de los ligandos Cl^- por agentes quelantes bidentados, lábiles, como oxalato, malonato y malonato sustituido, o a la síntesis de moléculas con los ligandos NH_3 sustituidos por aminas alicíclicas y heterocíclicas, o por aminas quelantes como la etilendiamina, 1,2-diaminociclohexano, etc. Algunos de éstos compuestos tienen una actividad comparable o superior a la del cisplatino, pero con índices terapéuticos más altos, sobre todo los de baja solubilidad en agua.

Los resultados revelan además una serie de hechos comunes que correlacionan la estructura química con la actividad antitumoral y que llevan a reglas empíricas que, como otras generalizaciones biológicas, tienen excepciones y deben contemplarse con ciertas precauciones.

— Los complejos activos tienen geometría plano-cuadrada u octaédrica, pero con, al menos, dos ligandos monodentados, lábiles, en posición cis (o un grupo lábil bidentado) y con los ligandos restantes, de carácter inerte, firmemente unidos al catión.

— Los complejos plano-cuadrados, (de Pt(II)), u octaédricos, (de Pt(IV)), con dos ligandos inertes en posición trans, son inactivos a dosis para las que son eficaces los correspondientes isómeros cis.

— La neutralidad eléctrica de los complejos favorece la actividad, pero formas activas pueden transformarse, en los medios biológicos, en especies cargadas por un mecanismo de cambio de ligandos.

— Formas cargadas de complejos análogos a especies inertes se comportan generalmente como sustancias de elevada toxicidad.

— Los grupos lábiles deben encontrarse en el complejo a una distancia próxima a $3,4 \text{ \AA}$, que coincide con la que existe entre los planos de bases consecutivas de una misma cadena de DNA.

Esta circunstancia, el mencionado fenómeno de la filamentación, que supone el bloqueo de la división celular pero no del crecimiento, y la referida actividad lisogénica de los complejos de platino con acción antitumoral, son hechos que apuntaban claramente a que la actividad biológica del cis-DDP y otros complejos de platino era determinada por su reacción con las moléculas de los ácidos nucleicos y, fundamentalmente, con las del DNA. La idea lleva, sin embargo, de inmediato a la pregunta de ¿por qué los complejos activos actúan preferentemente o selectivamente sobre las células tumorales, sin afección sensible de los tejidos sanos? Este sigue siendo el gran problema, aún sin resolver, para el que se han dado distintas interpretaciones que escapan al objetivo de esta lección. Pudiera señalarse, sin embargo, como posible razón de este comportamiento singular que el mecanismo enzimático de reparación de las lesiones espontáneas o artificiales del DNA está comprometido también en la reparación de las lesiones producidas por el cisplatino, y que la especialización y eficacia de los sistemas reparadores del DNA en células tumorales sea menor que en células de tejidos normales, aunque reacciones inmunológicas pueden resultar también operativas.

En cualquier caso, se imponía conocer los grupos funcionales del DNA con los que interaccionan los complejos y esclarecer sus mecanismos de acción a nivel molecular, así como el papel de los ligandos, lábiles y/o inertes, el de la geometría molecular y del ion metálico como condicionantes de la actividad. Contestar a estas cuestiones ha conducido a la aparición de un acúmulo tan grande de información puntual que ha desviado, en muchos casos, la atención del camino más simple y directo, consistente en el examen minucioso del antagonismo de la reactividad de los isómeros cis- y trans-DDP frente al DNA. Los resultados obte-

nidos hacen, en efecto, generalmente referencia a la acción del cisplatino y permiten contestar parcialmente al problema, como se verá más adelante, aunque la cuestión siga siendo todavía un campo apasionante en el que se continúa trabajando intensamente.

Entender y racionalizar los resultados precisa plantear las bases inorgánicas que condicionan la química de la coordinación del Pt(II).

ALGUNOS ASPECTOS DE LA QUIMICA DE LA COORDINACION DEL PLATINO(II)

Geometría de los complejos

El análisis de los principios inorgánicos fundamentales que condicionan la química de la coordinación del platino debe hacerse sin perder de vista las restricciones que en ella imponen los sistemas biológicos, con sus características de fuerza iónica, temperatura, permeabilidad de biomembranas, etc. El moderado carácter reductor de estos medios obliga además a prestar atención preferente a la coordinación del ion Pt(II) que es, sin duda, la especie de mayor significación en esas condiciones.

El ion Pt(II), con su configuración electrónica $Xe4f^{14} 5d^8$, se caracteriza esencialmente por la formación de complejos diamagnéticos de geometría plano-cuadrada, favorecida por la gran diferencia energética que introduce la escisión provocada por el campo cristalino entre el orbital $5d_{xy}$ y el $5d_{x^2-y^2}$ (vacío) (Figura 5).

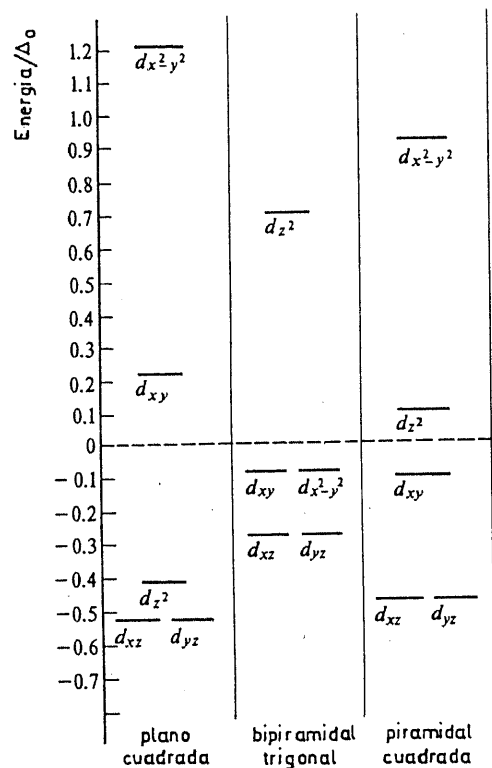


Fig. 5.- Energías relativas de los orbitales d en distintos entornos de coordinación.

Los esquemas de escisión de entornos pentacoordinados favorecen la estereoquímica de pirámide de base cuadrada, en contra de la realidad de los complejos conocidos de Pt(II) de número de coordinación cinco, que tienen estructura de bipirámide trigonal. El hecho se debe a que las diferencias reales de energía entre los orbitales dependen no sólo del catión sino también de los ligandos. En complejos pentacoordinados de Pt(II) existe siempre al menos un ligando aceptor de densidad electrónica π , que rebaja

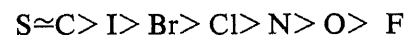
la energía de los orbitales π dadores del ion a valores que hacen más estable la configuración de bipirámide. El hecho es de especial significación y explica que las reacciones de sustitución en complejos plano-cuadrados transcurran por un mecanismo que conlleva la formación de un intermedio pentacoordinado, de geometría bipirámide trigonal.

Los complejos plano-cuadrados de Pt(II) tienen, sin embargo, una manifiesta inercia cinética a la sustitución, que contrasta con la de complejos de la misma estereoquímica del ion Pd(II), de radio análogo y con una velocidad de reacción unas 10^5 veces superior. Esta gran diferencia en el comportamiento cinético se debe a la mayor extensión espacial de los orbitales 5d del platino, protegidos de la atracción nuclear por el efecto de pantalla de los electrones 4f, lo que inhibe la coordinación axial y retarda la velocidad de las reacciones de sustitución.

Factores determinantes de la estabilidad

El ion Pt(II) se comporta frente a ligandos como un ácido blando de Pearson, o ion de la clase b de Ahrlund.

Se coordina, en efecto, con ligandos dadores σ y π , y con aceptores voluminosos y polarizables, según la secuencia general:



apoyada por los valores de las constantes globales de formación de diferentes sistemas plano-cuadrados, de los que se incluyen algunos en la Tabla 1.

Así, forma complejos con sulfuros, tioles ionizados ($R-S^-$) y tioéteres (R_2S) que son más estables que los correspondientes alcóxidos ($R-O^-$) y éteres (R_2O). La estabilidad de sus complejos con los iones hidrógeno-sulfuro (SH^-) e hidróxido (OH^-) es, sin embargo, comparable, mientras que los complejos con

TABLA 1

Constantes globales de formación de complejos de Pt(II) en agua a 25°C

Ligando	Complejo	logβ ₄
CN ⁻	[Pt (CN) ₄] ²⁻	42
NH ₃	[Pt (NH ₃) ₄] ²⁺	35'3
OH ⁻	[Pt (OH) ₄] ²⁻	35
I ⁻	[Pt I ₄] ²⁻	29'6
Br ⁻	[Pt Br ₄] ²⁻	20'5
Cl ⁻	[Pt Cl ₄] ²⁻	16'6

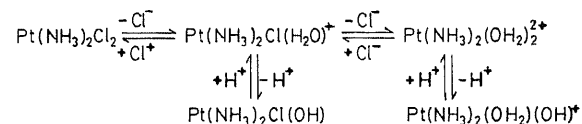
Tomada de "Mechanisms of Inorganic Reactions" (2ª ed.). F. Basolo y R.G. Pearson, (1967).

H₂O y con alcoholes (R-OH) son más estables que los de SH₂ y tioles (R-SH), debido a que la protonación afecta más al carácter blando del azufre dador que a la dureza del oxígeno.

Esto, unido a que la actividad va asociada a la existencia en el complejo de dos ligandos lábiles en cis (o un ligando lábil bidentado) justifica pensar que las reacciones del cisplatino pasen por el desplazamiento previo de los ligandos cloruro por moléculas de agua del medio.

Hidrólisis de complejos de Pt(II) en medios biológicos

Se despertó así un especial interés por el conocimiento de los equilibrios hidrolíticos de complejos de Pt(II) en el agua, el plasma y fluidos intracelulares. Los resultados revelan, en efecto, que la hidrólisis se realiza con sustitución del cloruro por agua y disociación posterior de los acuo-complejos, según el esquema siguiente:



Se forman así las especies cargadas cloroacuo- y diacuodiaminplatino(II) e hidroxocomplejos, pero conservándose siempre la estereoisomería, como ilustra la figura 6 para el complejo activo cis-dicloroetilendiamina platino(II).

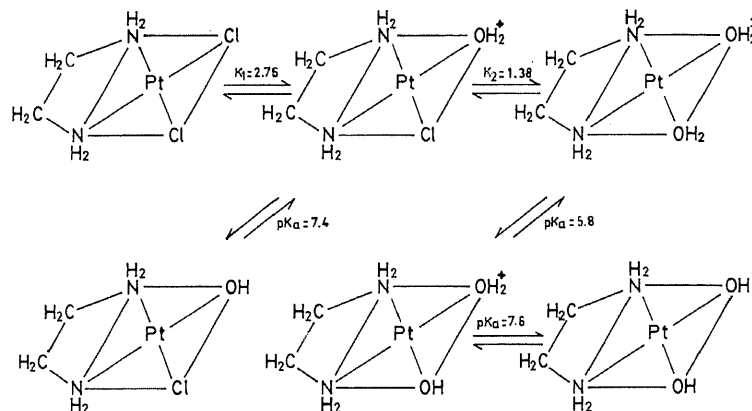


Fig. 6.- Reacciones de hidrólisis del complejo activo [Pt(en)Cl₂]

A partir de los valores de los pK_a de los correspondientes equilibrios hidrolíticos del cisplatino, y para concentraciones de ion cloruro de 103 mM y 3,5 mM, análogas a las que existen en el plasma sanguíneo y el interior de las células, se construyen los correspondientes diagramas de distribución de especies que se muestran en las figuras 7 y 8.

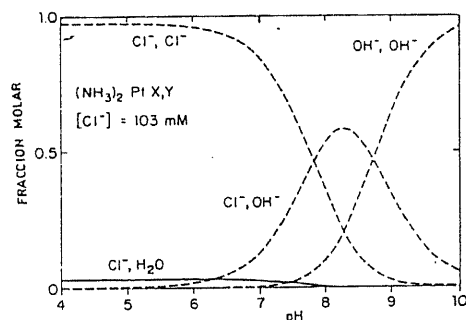


Fig. 7.- Fracción molar de diferentes especies complejas de cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{XY}]$ en un medio con $[\text{Cl}^-] = 103 \text{ mM}$. Las fracciones molares de las especies $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ no son nunca superiores a 0,015. (Tomada de "Platinum, Gold and Other Metal Chemotherapeutic". Ed. por S.J. Lippard).

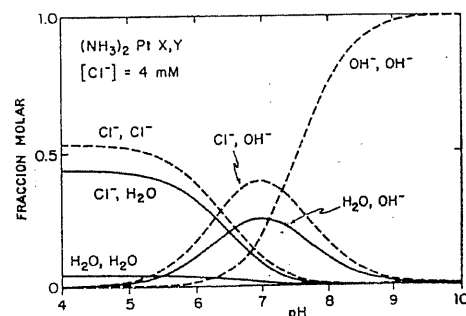


Fig. 8.- Fracción molar de diferentes especies complejas de $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{XY}]$ en un medio con $[\text{Cl}^-] = 3,5 \text{ mM}$. (Tomada de la misma referencia que la figura 7).

Su análisis revela que el ion cloruro, a la concentración del plasma y al pH fisiológico (7,2-7,4), reprime la hidrólisis, predominando las especies cis-diclorodiaminplatino(II), $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, y, en menor proporción, clorohidroxodiaminplatino(II), $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH})]$, ambas eléctricamente neutras, lo que facilita su difusión al interior de las células.

A la concentración de cloruro del citoplasma, la hidrólisis lleva a la aparición, junto a las especies sin carga, de cantidades significativas de las formas catiónicas, acuohidroxo- y, en menor proporción, acuoclorodiaminplatino(II), $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$, que deben ser las más activas, por su carga positiva y por tener agua como ligando, que es un excelente grupo saliente.

Los grupos hidroxilo no son ligandos lábiles. Su afinidad para el ion Pt(II) es del mismo tipo que la del amoníaco y su sustitución exige el paso previo a H_2O por protonación.

Su presencia plantea una complicación adicional derivada de su carácter nucleofílico, pudiendo establecer puentes y formar μ -hidroxocomplejos dímeros y trímeros, y a los que, por su considerable carga iónica e inercia química, se les adscribe el principal inconveniente que plantea el uso clínico del cisplatino, su nefrotoxicidad.

El complejo trans-diclorodiaminplatino(II) sigue un esquema hidrolítico análogo al isómero cis, conservando también su estereoquímica, pero los acu- e hidroxocomplejos resultantes no son igualmente activos o inertes.

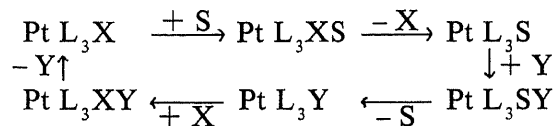
Cinética de las reacciones de sustitución

Interesa considerar también la cinética de estas reacciones que implican sustitución de ligandos, por su significación en el comportamiento general de los complejos en sistemas biológicos.

Por su carga positiva y densidad electrónica del ion, los complejos de Pt(II) pueden experimentar reacciones de sustitución de ligandos por ataque nucleofílico y electrofílico, según el esquema:



en un proceso que transcurre con considerable inercia y retención de la configuración cis-trans. Existen pruebas indirectas de que estas reacciones se realizan a través de un mecanismo asociativo con el disolvente, que implica la formación de un intermedio pentacoordinado para el que se supone una geometría de bipirámide trigonal:

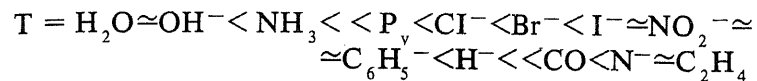


(X e Y son los ligandos saliente y entrante, respectivamente, y S el disolvente).

La reacción de sustitución sigue, en efecto, una ley de velocidad dada por la ecuación:

$v = (K_1 + K_2 [\text{Y}]) [\text{Complejo}]$ (con $K_2 \gg K_1$), donde K_1 es la constante de velocidad de primer orden que varía con el disolvente y refleja la contribución del mecanismo solvolítico, y K_2 es la constante de velocidad de segundo orden, propia de un proceso de sustitución bimolecular, cuyo valor depende de la naturaleza del ligando, Y, entrante, variando en el orden:

$\text{Y} = \text{F}^- \approx \text{H}_2\text{O} < \text{NH}_3 \approx \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{P}_y < \text{I}^- < \text{CN}^-$
conocido como "secuencia de nucleofilicidad". Este orden es similar al llamado "efecto trans-labilizante" de ligandos:



que indica el efecto ejercido por un ligando, T, en trans respecto a un grupo saliente X, en la velocidad de sustitución por un grupo entrante, Y. La sustitución de X por Y transcurre por el mencionado mecanismo asociativo que se esquematiza en la figura 9 y que implica un intermedio pentacoordinado.

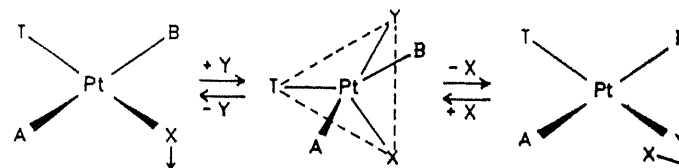
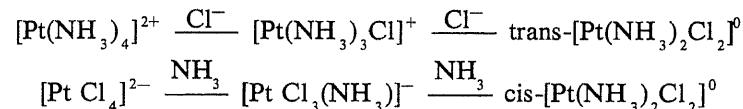


Fig. 9.-Mecanismo asociativo de sustitución de ligandos, a través de un intermedio pentacoordinado.

El efecto trans justifica el curso seguido por las reacciones:



ya que el ion Cl^- , de mayor efecto trans, dirige al segundo ion (o molécula de NH_3) entrante a la posición trans (pese a ser el cloruro un ligando más lábil que el amoníaco).

En general, el efecto trans-labilizante de un ligando T aumenta con su carácter de base blanda, con el carácter π aceptor y con su menor carácter dador σ .

Existe también un efecto cinético cis, generalmente de menor significación que el efecto trans y cuya magnitud aumenta cuando decrece el carácter básico del ligando.

Estas consideraciones de carácter inorgánico sobre la química de la coordinación del Pt(II), contempladas en conjunción con las características de los sistemas biológicos, suministran impor-

tantes bases químicas para el entendimiento del mecanismo por el que transcurren las mutaciones en biomoléculas. Pero antes de entrar en esta cuestión es preciso desarrollar unas ideas generales sobre la naturaleza y estructura del blanco principal de estas mutaciones, la molécula de DNA.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL DNA

Esqueleto molecular

El DNA es la macromolécula de la herencia, que contiene el código genético de la mayor parte de los seres vivos. Resulta básicamente de la condensación, a manera de filamento no ramificado, de un gran número de 2'-desoxirribonucleósidos, ligados por puentes fosfodiéster establecidos entre el hidroxilo 3' del azúcar de uno de ellos y el hidroxilo 5' del azúcar del adyacente. Resulta así, por repetición, la secuencia fosfato 5'-d-ribonucleósido-3'-fosfato-5'-ribonucleósido, que avanza en el sentido 5' → 3'. En la cadena cada molécula de 2'-desoxirribosa está, así, unida por el C-1' a una base púrica, Adenina (A) o Guanina (G) a través del N-9, o a una base pirimidínica, Timina (T) o Citosina (C) por el N-1.

La secuencia de bases a lo largo de la cadena polinucleótida no está, en modo alguno, restringida, siendo esta secuencia precisa la que transporta la información genética. En la figura 10 se formulan estas bases y se esquematiza un fragmento de una cadena de DNA.

La asociación de dos de estas cadenas, complementarias en la secuencia de sus bases, antiparalelas en el sentido de su desarrollo (5' → 3' y 3' → 5') y con enrollamiento plectonómico a lo largo de un eje común, conduce a la molécula de DNA, que muestra así un esqueleto externo de unidades desoxirribosa-fosfodiéster,

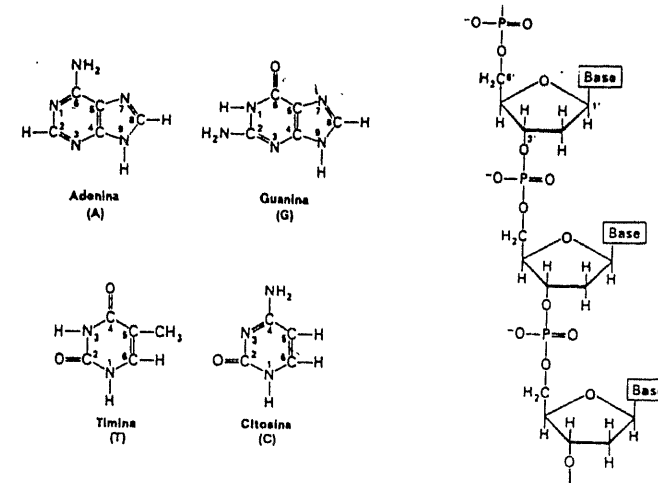


Fig. 10.- Fórmula de las principales bases púricas y pirimidínicas y esquema de un fragmento de cadena de DNA.

con las bases púricas y pirimidínicas señalando al interior de la hélice y apiladas, con sus planos perpendiculares al eje del enrollamiento y casi perpendiculares a los planos del azúcar.

La asociación entre cadenas está estabilizada por puentes de hidrógeno entre pares de bases que, por requerimiento de los puentes y por factores estéricos, se establecen específicamente entre adenina-timina y guanina-citosina. Existe también una estabilización adicional que nace del apilamiento columnar de las bases.

La figura 11 muestra el esquema de apareamiento deducido por Watson y Crick, entre los pares de bases A-T y G-C, y la asociación entre cadenas del DNA.

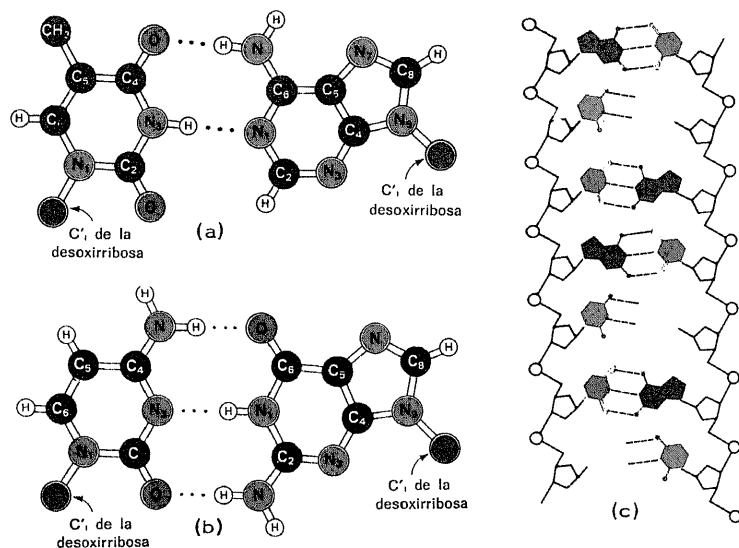


Fig. 11.- Modelo de apareamiento de pares de bases: (a) Adenina-Timina; (b) Guanina-Citosina; (c) Asociación de dos cadenas complementarias. (De "Bioquímica". L. Stryer. Ed. Reverté).

Niveles estructurales y polimorfismo estructural del DNA

Además de la "estructura primaria", dada por la secuencia de bases, y la "estructura secundaria" que nace de la asociación descrita de dos cadenas complementarias y antiparalelas, en arrollamiento plectonémico, en el DNA se da una "estructura terciaria" en las superhélices del DNA circular o plasmidios de células eucariotas, y una "estructura cuaternaria" que corresponde al ordenamiento que se da en el núcleo de células eucariotas, donde fragmentos de la doble hélice se asocian a proteínas (histonas) para dar lugar a la cromatina y después a los cromosomas.

La estructura tridimensional de la molécula de DNA es, además, sensible a los cambios conformacionales del anillo de 2'-desoxirribosa, definidos por el desplazamiento principal de los átomos C-2' y C-3' respecto al plano de los átomos C-1', C-4' y O. Cuando este desplazamiento de los átomos C-2' o C-3' se realiza hacia el mismo lado del C-5' la conformación se denomina "C-2'endo" ó "C-3'endo", respectivamente, y cuando se produce hacia el lado opuesto, "C-2'exo" o "C-3'exo". (En la conformación "C-2'endo" el carbono C-2' se desplaza 0,5 Å sobre el plano del anillo hacia el carbono C-5' y el C-3' unos 0,2 Å en sentido opuesto). La figura 12 representa esquemáticamente estas conformaciones.

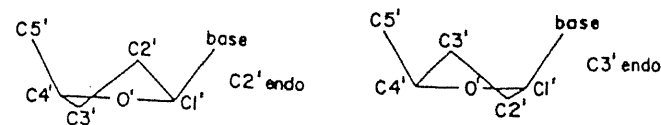


Fig. 12.- Representación esquemática del plegamiento del anillo de desoxirribosa en nucleotidos.

Esta y otras circunstancias relativas a factores externos, como salinidad, temperatura y pH del medio, determinan un marcado polimorfismo estructural en el DNA, del que las formas más representativas son, sin duda, las denominadas A y B, ambas en α -hélice, destróginas.

La más frecuente, la B-DNA, es la conocida estructura de Watson y Crick que se ilustra esquemáticamente en la figura 13 y que requiere restos de desoxirribosa con la conformación C-2'endo.

El diámetro de la hélice en esta forma B es de 20 Å, y la separación entre pares de bases adyacentes y perpendiculares al eje es de 3,4 Å, con rotación de 36°, de modo que la estructura se repite cada diez restos por cadena, a intervalos de 34 Å.

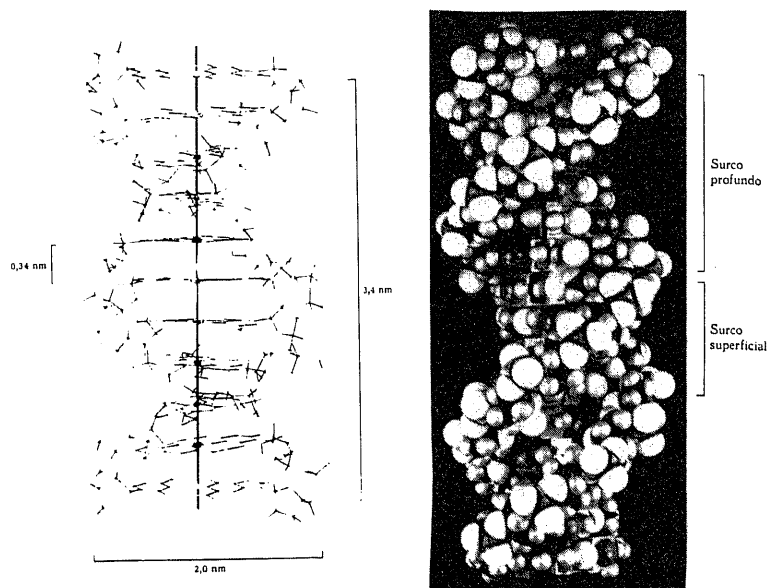


Fig. 13.- Representación esquemática de una doble hélice de DNA y modelo espacial mostrando los dos tipos de surcos, mayor y menor. La estructura es repetitiva a intervalos de 34 Å, que corresponden a 10 residuos en cada cadena. (Tomada de "Bioquímica". A.L. Lehninger. Ed. Omega S.A.).

Esta forma, que es la de mayor importancia biológica, genera dos tipos de ranuras en la α -hélice, una mayor o surco helicoidal, de 11,7 Å, y otras más estrecha, de 5,7 Å, las dos de casi la misma profundidad (8,5 y 7,5 Å, respectivamente). De esta forma las posiciones, en el surco mayor, N-7 y O-6 (N-6), de las bases guanina y adenina y las posiciones O-4 (N-4) de las bases timina y citosina, son muy accesibles al ataque químico.

El cambio del anillo de la desoxirribosa a la conformación C-3' endo modifica los parámetros de la α -hélice a 28 Å y 11 restos por vuelta, originándose la forma A del DNA, con el plano de las bases inclinado unos 20° con respecto al perpendicular al eje de

la hélice. Esto hace que el surco menor, de 10 Å, sea poco profundo (3-4 Å) y bastante profundo el mayor (12-13 Å) y con anchura entre 10-20 Å.

Funciones biológicas

Para valorar las consecuencias biológicas de la interacción de los complejos inorgánicos con el DNA interesa referirse también, aunque sea de forma sucinta, a algunas funciones biológicas esenciales de esta macromolécula.

De singular interés es la *replicación*, que se realiza con la ruptura de los puentes de hidrógeno, seguida de la separación de las cadenas, actuando entonces cada una como plantilla para la síntesis, a partir de ella misma, de una nueva cadena compañera, con formación de dos pares, en un proceso que se denomina semiconservativo. El fenómeno está controlado por las DNA-polimerasas y se realiza en trozos (fragmentos de Okazaki) que se unen entre sí rápidamente por enlaces covalentes por acción de la DNA-ligasa.

La *transcripción* o copia de una cadena de DNA (por fragmentos) para dar la cadena de RNA-mensajero, con una secuencia de bases complementaria, proceso que está controlado por la RNA-polimerasa.

Y la *reparación*, o reconstrucción del DNA lesionado por fracturas de una hebra o de la doble hélice a causa del doblado, pérdida de bases al cambiar el pH, agentes químicos del entorno, o por acción de radiación X o ultravioleta, que provocan frecuentemente la dimerización de dos restos de timina adyacentes. Este importante proceso, que protege la integridad de la macromolécula, se realiza por diferentes mecanismos en los que interviene la acción de la DNA-polimerasa I y, posteriormente, la DNA-ligasa.

Propiedades fisicoquímicas

Es interesante también recordar algunas propiedades fisicoquímicas del DNA para entender los resultados de los estudios "in vitro" de sus interacciones con iones metálicos y complejos.

Quizá la de mayor interés sea la *desnaturalización*, que se produce por pHs extremos en las disoluciones de DNA, por exposición a agentes químicos y, sobre todo, por la temperatura. El proceso se traduce en la separación de la doble hélice, por rotura de puentes de hidrógeno y de las interacciones de apilamiento de bases, pasando de la estructura nativa a formas monofilares, con uniones al azar.

La desnaturalización se realiza en dos etapas, siendo la separación de las hebras, en la primera, solo parcial, manteniéndose un segmento corto de la estructura duplohelicoidal, con al menos doce pares de bases sin disociar y con los segmentos desligados adoptando una conformación cambiante. Si el proceso no ha pasado de esta etapa, la doble hélice se reconstruye por enfriamiento para formar un duplex completo por retorno a la conformación nativa, de mínima energía potencial.

En la segunda etapa se produce la separación completa de las hebras que, por enfriamiento rápido, se doblan sobre sí mismas en un proceso de falsa renaturalización que lleva a segmentos duplohelicoidales intracatenarios.

La desnaturalización va asociada a una disminución de la viscosidad de las disoluciones y acompañada de un efecto hipercrómico o incremento de la absorción a 260 nm. que constituye una medida del fenómeno.

La representación, frente a la temperatura, del incremento de absorción, ΔA , da una curva (figura 14) que, por la naturaleza cooperativa de las muchas interacciones que desaparecen, tiene un cambio brusco que recuerda la fusión de un compuesto orgánico. La temperatura de desnaturalización se acostumbra a

designar, por ésto, como "punto de fusión", T_m , que representa aquella a la que se alcanza el 50% de desnaturalización. Su valor varía para diferentes tipos de células, aumentando directamente con el contenido en los pares de bases guanina-citosina, que son los de mayor estabilidad por unirse por enlaces de hidrógeno.

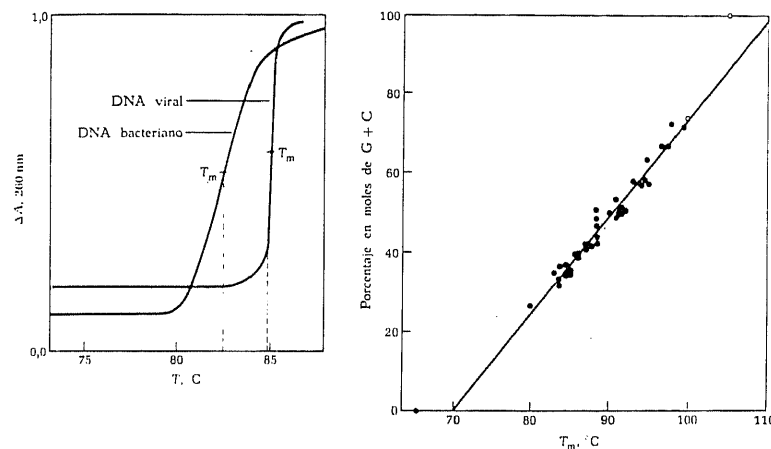


Fig. 14.- Puntos de fusión (T_m) de DNA (viral y bacteriano) y su relación con el contenido en pares de Guanina-Citosina. (De "Bioquímica". A.L. Lehninger. Ed. Omega S.A.).

El valor de T_m es, pues, una medida fisicoquímica de la estabilidad del DNA. Cuando las macromoléculas interaccionan con complejos metálicos el valor T_m se afecta notoriamente, habiéndose desarrollado un interesante método de espectrofotometría diferencial ultravioleta para investigar la interacción de complejos inorgánicos con DNA, fundado en que las bandas a 270 nm y 295 nm, en espectros diferenciales de DNA tratado, se deben a un cambio en la estructura secundaria del DNA nativo, con modificación en la distribución de la densidad electrónica de sus bases. La relación de absorbancias (diferenciales), $\Delta A_{270} / \Delta A_{290}$, constituye así una medida de la interacción del complejo

con las bases, alcanzando el cociente valores próximos a 2 en platinaciones con cisplatino, y del orden de 1 para el trans-DDP y complejos que no tienen actividad antitumoral.

Estas ideas, expuestas a un nivel elemental, permiten abordar el objetivo fundamental de esta lección: el conocimiento del estado actual de los modos de acción de complejos de Pt(II) con DNA. La cuestión no es, por supuesto, sencilla, dada la extraordinaria complejidad del ligando, habiendo precisado el esfuerzo de equipos multidisciplinarios, con especialistas en Química de la Coordinación y en otras disciplinas más relacionadas con el planteamiento e interpretación de los resultados de experiencias "in vitro" e "in vivo", esenciales para la obtención de conclusiones.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE COMPLEJOS DE PLATINO CON EL DNA

El conocimiento de los mecanismos de la acción antitumoral de complejos inorgánicos es de gran interés porque puede marcar las pautas que sirvan para el diseño de nuevos agentes antineoplásicos, más activos y de menor toxicidad que el cisplatino.

Esta es la razón del gran esfuerzo que se viene realizando, desde el descubrimiento de Rosenberg, en muchos laboratorios del mundo, dirigido a establecer modelos estructurales que informen sobre los modos de acción de estos complejos.

Los resultados apuntan siempre a que la acción antitumoral tiene su razón en las interacciones de los complejos con los constituyentes del DNA, por lo que interesa analizar, aunque sea brevemente, las posibilidades de unión de los grupos fosfato, del azúcar y de las bases, con cationes metálicos.

Interacciones de los constituyentes del DNA con cationes y complejos

Sin duda, el mayor número de lugares reactivos en la molécula de DNA se da en la porción básica, que contiene átomos de nitrógeno amídico y nitrógeno u oxígeno hexocíclicos con capacidad de formar enlace covalente con cationes de metales pesados. Son estas, sin duda, las interacciones más importantes y mejor estudiadas en compuestos de metales con nucleósidos y nucleótidos, siendo los centros de metalación más singulares los siguientes:

Compuesto	Posición normal de coordinación	Posición adicional
Adenosina	N-7	N-1
Guanosina	N-7	O-6, N-1
Citidina	N-3	N-2, O-4
(Uridina)	N-2	O-2, O-4

En adenosina y guanina, en disolución neutra, las posiciones N-7 y N-1 son centros de metalación igualmente favorecidos, pero a pH ácido decrece la capacidad de coordinación del N-1 de la adenosina por su protonación. La intervención del N-1 en interacciones por enlaces de hidrógeno entre bases favorece también la posición N-7 para la coordinación.

La metalación en pirimidinas tiene lugar, casi exclusivamente, por el N-3.

La figura 15 ilustra la unión de guanosina al resto etilendiaminaplato(II), $Pt(en)^{2+}$, en el complejo $[Pt(en)(Guanosina)_2]^{2+}$.

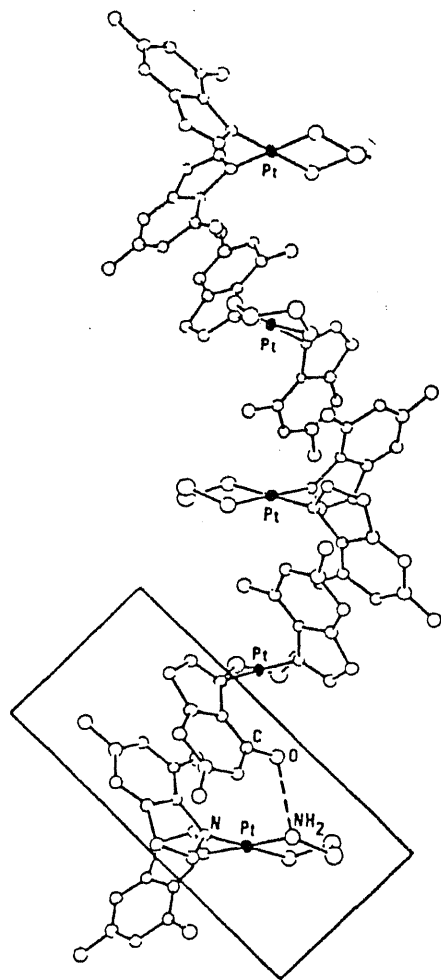


Fig. 15.-Fragmento de la espiral formada por unidades de $[\text{Pt}(\text{en})\text{guanosina}]_2^{2+}$. El resto $\text{Pt}(\text{en})^{2+}$ se une a la guanosina por coordinación al átomo de N-7 de una base, y al O-6 de la adyacente por enlace de hidrógeno con un grupo amino del ligando. (Se han omitido los anillos de ribosa).

(Tomado de "Nucleic acid-metal ion interaction". Ed. por T.G. Spiro.

En ella se observa, además de la coordinación del grupo $\text{Pt}(\text{en})^{2+}$ al N-7 de la base, la unión al oxígeno hexocíclico por enlace de hidrógeno. Estos átomos de oxígeno de purinas y pirimidinas participan muchas veces de forma selectiva en las interacciones al catión, pese a que la afinidad por cationes pesados de un átomo, electronegativo y duro, como el oxígeno no pueda equipararse a la del nitrógeno. Ejemplos de estas uniones selectivas a través del oxígeno son los azules de platino-pirimidina, formados por incubación de cisplatino con pirimidinas sustituidas, o sus análogos como los azules cis-diaminplatino-uracilo y cis-diaminplatino- α -piridona, de cuya descripción prescindiremos por razones de brevedad.

Pero pese al excelente carácter de ligandos de las bases púricas y pirimidínicas, los complejos de metales pesados con nucleósidos y nucleótidos tienen también un importante componente de carácter iónico que surge por interacciones del catión con el grupo fosfato aniónico, y que deben también considerarse a la hora de analizar la reacción de complejos con ácidos nucleicos. Estas interacciones representan, al menos, pasos intermedios importantes en el establecimiento de la unión definitiva del complejo a la biomolécula.

Menos interés tienen las interacciones con el anillo de ribosa, habiéndose comprobado la existencia de sólo algunos complejos, como un quelato Cu-nucleótido formado, a pH superior a 8,5, por coordinación del Cu(II) a los grupos 3'- y 5'-hidroxilo del azúcar.

Estas ideas, someramente descritas, tienen su confirmación directa en el análisis estructural de rayos X y son del mayor interés para la interpretación de los mecanismos de acción de los complejos de platino(II) con el DNA.

Experiencias "in vitro"

El establecimiento de estas interacciones es un hecho generalmente aceptado. Infinidad de experiencias "in vitro" revelan que los complejos de platino(II) reaccionan, en procesos lentos de 6, 12 o más horas, con el DNA nativo a dosis muy bajas, que expresadas por la relación, r , de platino (o complejo) a base (o nucleótido) son del orden de $r \leq 0,05$.

La estereoespecificidad ya mencionada, caracterizada por los altos niveles de actividad de los isómeros cis, y la no actividad de los correspondientes complejos trans, hizo pensar además que las interacciones del complejo, o alguna de sus formas resultantes de la hidrólisis, exigen posiciones reactivas en el DNA con conformación adecuada para la estereoquímica cis.

En apoyo de estas interacciones están los resultados obtenidos en ensayos encaminados a determinar la capacidad de células amnióticas, AV_3 humanas, para la síntesis de proteínas, RNA (transcripción) y DNA (replicación) por medida de la incorporación de los correspondientes derivados tritiados ^3H -leucina, ^3H -uridina y ^3H -timidina. Dosis de cisplatino de $5 \mu\text{M} \approx 1 \text{ ppm}$, análogas a las que se encuentran en células tumorales animales tratados con la dosis terapéutica, inhiben a las pocas horas la replicación del DNA de forma selectiva y persistente, pero no la síntesis proteica o de RNA, que se mantienen prácticamente en el mismo nivel que el de las células del control (Figura 16).

En otra experiencia en la que se estudia la relación entre la supervivencia de células HeLa (medida por su capacidad de formar colonias) y la cantidad de cis- ó trans-DDP unido al DNA (por medida del platino extraído de las células) se encuentra, como muestra la figura 17, que se precisan niveles de platinación más altos de trans- que de cis-DDP para lograr una disminución análoga de la supervivencia, lo que no debe estar motivado por una dis-

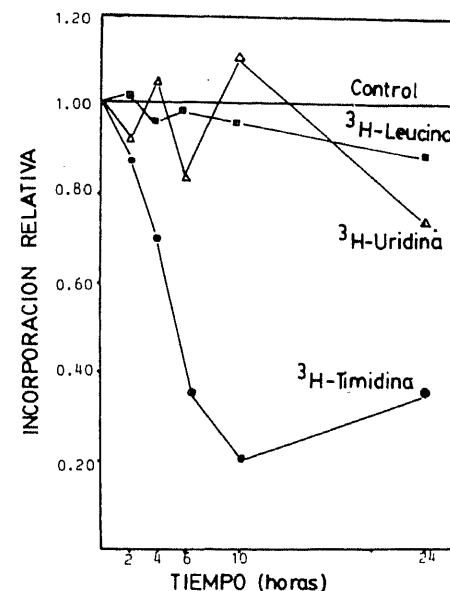


Fig. 16.- Efecto del cisplatino en la síntesis de macromoléculas, en cultivos de células amnióticas con una concentración de complejo ($\mu\text{M} \approx 1 \text{ ppm}$) similar a la encontrada en células tumorales de animales tratados con una dosis terapéutica. La síntesis del DNA se mide por la incorporación de timidina tritiada.

(De B. Rosenberg; Plat. Met. Rev., 15,3 (1971)).

tinta capacidad de los isómeros para atravesar las membranas sino por su distinto poder de reacción con el DNA.

Se ha medido también en otra experiencia el porcentaje de inhibición de la replicación del DNA del virus (SV40) de células renales de mono por acción de cis- y trans-DDP, encontrando que en muchos casos depende, como muestra la figura 18, de la concentración de platino en el medio, pero siendo mucho más activo el cisplatino, que detiene ya la replicación en un 75% a la concen-

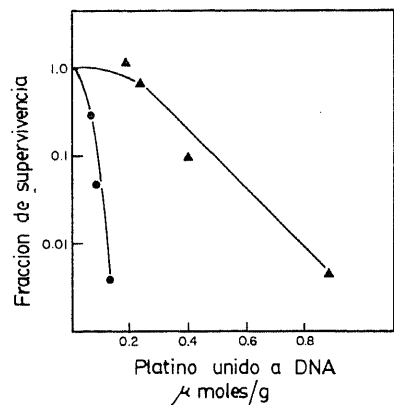


Fig. 17.- Relación entre la supervivencia de células HeLa tratadas con cis-DDP (●) y trans-DDP (▲) y la magnitud de la platinación del DNA aislado de cultivos paralelos.

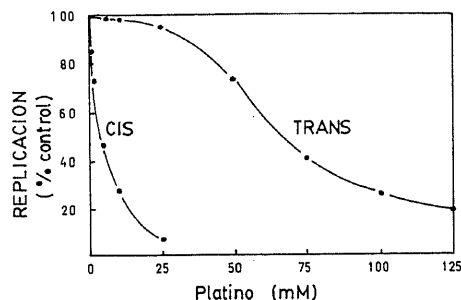


Fig. 18.- Inhibición (%) de replicación del DNA viral por acción de cis- y trans-DDP (virus SV40 en células renales de mono). (Tomado de "Biochemistry", 24 (1985)).

tración de $10\mu\text{M}$ y paraliza por completo la acción de las DNA-polimerasas a concentraciones próximas a $25\mu\text{M}$, para las que es inactivo el trans-DDP.

Los hechos experimentales revelan la existencia de interacciones complejo-DNA e importantes diferencias en el proceso entre los dos isómeros, lo que debe tener su origen en un distinto modo de interacción de ambos compuestos, o de sus especies activas intermedias, con los grupos funcionales de la macromolécula ligando. En ambos casos debe darse la unión de los complejos a la doble hélice, tras la destrucción de enlaces de hidrógeno para dejar libres posiciones de coordinación por las que se produzca la unión al platino. Pero ¿cuáles son, en cada caso, los detalles estructurales de estas interacciones? y ¿cuáles las diferencias en las formas de enlace responsables de la diferente eficacia biológica de ambos isómeros?

Modelos de interacción del DNA con cisplatino

La respuesta a estas importantes cuestiones ha preocupado y sigue preocupando mucho a los especialistas que, en base a los resultados, descritos ya en parte, sobre las interacciones de las bases o sus derivados sencillos y de oligo- y polinucleótidos con Pt(II), otros cationes y complejos, han desarrollado una serie de modelos de los que se desprenden tendencias preferenciales sobre reactividad y su dependencia estructural.

A este respecto, son importantes los resultados obtenidos por estudios potenciométricos que revelan que en la reacción del DNA con cisplatino, en determinadas condiciones, se liberan dos iones cloruro y sólo uno en la reacción con el isómero trans, hecho que habla claramente en favor de una forma diferente de coordinación, realizada siempre a través de posiciones ocupadas por ligandos lábiles.

Se admite con carácter general que, por su polaridad negativa, los puentes 3'-5' fosfodiéster del armazón externo del DNA ejercen una atracción sobre las especies catiónicas complejas de Pt(II), formadas a expensas del compuesto inicial, si bien por su carácter de ligando lábil y saliente, incluso más que el agua, los grupos fosfodiéster ceden fácilmente los restos $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ o análogos a otros grupos más básicos de la macromolécula.

Hay que fijar, entonces, la atención en las bases nitrogenadas que son las que, al pH fisiológico (7.2-7.4), aportan los grupos coordinantes más apropiados. La misma secuencia de nucleofilicidad encontrada para los nucleótidos 5'-monofosfato, en la que el lugar más avanzado corresponde a la guanosina-monofosfato seguido de adenosina-monofosfato y, a mayor distancia, por citosina-monofosfato y timidina-monofosfato, refuerza aún más la capacidad preferente de coordinación de los restos $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ o análogos a la porción básica de la molécula de DNA.

Como se indicó anteriormente, las posiciones de coordinación preferente de las bases son, salvo circunstancias particulares, el N-7 en las bases púricas (A y G) y el N-3 en las bases pirimidínicas (T y C), sin que puedan olvidarse otros átomos que representan posiciones de coordinación adicionales. El carácter preferencial para la coordinación del N-7 de las bases púricas debe estar exaltado por el hecho de estar expuesto directamente al medio, en el surco mayor de la doble hélice de la forma B del DNA, y no implicado en la formación de enlaces de hidrógeno.

En base a numerosos estudios en compuestos modelo, usando poderosos métodos de RMN, difracción de rayos X, e incluso estudios inmunoquímicos, se han propuesto una serie de posibles modos de interacción del cisplatino con el DNA, razonablemente aceptables. Para su propuesta fue especialmente importante la observación de que el complejo produce en la unión al DNA la separación y acortamiento de la doble hélice, fenómeno este último impedido cuando la platinación se lleva a cabo en pre-

sencia del intercalador bromuro de etidio. El hecho es indicativo de que el grupo $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ no sólo puede establecer uniones entre posiciones de coordinación próximas sino también más alejadas en la cadena, lo que introduce la posibilidad de enlaces a posiciones de coordinación de bases diferentes. Tomando en consideración estas circunstancias, se han propuesto diversos modos de reacción de los que mencionamos a continuación los más significativos:

1.- La quelación por unión simultánea del resto $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ a los centros nucleofílicos de una misma guanina, situación no permitida al isómero trans, frente al que la guanina actúa como ligando monodentado, según muestra la figura 19.

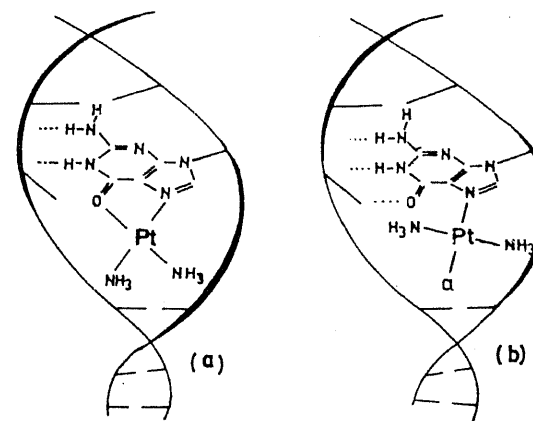


Fig. 19.- Esquemas de reacción con guanina de las especies hidratadas del: (a) $\text{Cis-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ y (b) $\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$. (Tomada de J.K Barton y S.J. Lippard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 313, 686 (1978) (modificada)).

El esquema ha sido muchas veces sugerido en base a propiedades de compuestos modelo, pero no confirmado por estudios estructurales de complejos de platino con guanina, siendo el que ha

planteado la mayor controversia. Estudios muy recientes de Luigi G. Marzilli, en los laboratorios del Anorganisch-Chemisches Institut de la Technische Univesität de Munich, orientados a esclarecer el problema, parecen hablar de hecho en contra de este interesante mecanismo de quelación que explicaría el por qué de la actividad anticancerígena del cisplatino como consecuencia de la lesión que produce la quelación en la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno con el nitrógeno amínico de la citosina (ver figura 11). Si el quelato no es destruido o alterado antes de la replicación, la guanina se vería obligada a una asociación forzada con timina lo que, en procesos de replicación sucesivos, llevaría a la mutación de la asociación $GC \xrightarrow{a} AT$, predicción confirmada en estudios con bacterias y células de mamíferos por Beck y Zwelling, respectivamente.

El esquema de quelación señalado podría informar también sobre la acción selectiva del isómero cis frente a células tumorales si se admite que al menos ciertos cánceres, como los producidos por agentes alquilantes, tienen su origen en lesiones del carcinógeno en el O-6 que no pueden ser reparadas antes que se conviertan en células cancerosas. Las lesiones del cisplatino en el O-6 de guanina de células normales serían reparadas antes de la replicación, pero no en las células tumorales, con deficiencias en el proceso reparador.

2.- Otro esquema de unión bifuncional del cisplatino supone la formación de un quelato por enlace entre bases suficientemente próximas de dos cadenas distintas de la doble hélice del DNA. Este modo de quelación no ha encontrado gran apoyo experimental en compuestos modelo, aunque se sabe que una pequeña fracción de las platinaciones del DNA se realiza por el establecimiento de puentes intercadenas. Se han propuesto como posiciones de coordinación los átomos de nitrógeno amínico de moléculas contiguas de adenina, uniéndose el complejo en la forma que se ilustra en la figura 20.

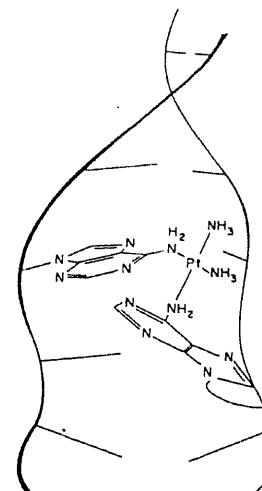


Fig. 20.- Esquema de quelación del resto $cis-Pt(NH_3)_2^{2+}$ a dos unidades contiguas de adenina de cadenas distintas. (Id. Figura 19).

El modelo es sugestivo para interpretar la inhibición de la replicación, pero no tiene el suficiente soporte experimental. Se sabe, sin embargo, que en ensayos "in vitro" con células incubadas con cis- y trans-DDP ambos isómeros muestran un poder comparable de formar enlaces intercadena, mientras que "in vivo" el isómero cis tiene una capacidad diez veces mayor que la del trans para la misma dosis de platino.

Compuestos modelo, cis- o trans- $[Pt(NH_3)_2GC]^{2+}$ (donde G y C son guanina y citosina con los átomos N-9 y N-1 bloqueados por radicales metilo o etilo en lugar de por d-ribosa) sugieren la formación de puentes entre el N-7 de guanina y el N-3 de citosina, debiendo causar el cisplatino una perturbación estructural más importante en la molécula de DNA. De hecho, en todos los complejos cis- $[Pt(NH_3)_2AB]$ de estructura conocida, las bases adoptan una orientación que lleva a ángulos diedros muy abier-

tos, mientras que en los complejos trans las bases siguen siendo coplanares.

3.—Más probable parece ser la quelación puente entre dos bases distintas de una misma cadena o quelación puente intracadena, mecanismo muy sugestivo que sólo puede establecerse con los isómeros cis. La platinación puede realizarse implicando en la coordinación a los átomos N-7 de dos bases púricas (G y/o A) contiguas, como muestra el esquema de la Figura 21.

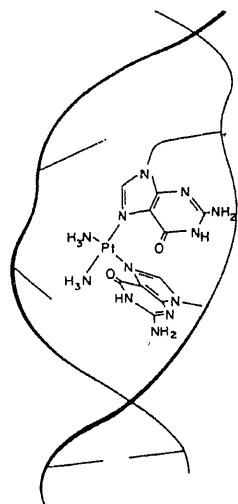


Fig. 21.- Esquema de quelación del resto $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ a dos unidades contiguas de guanina de una misma cadena. (Id. Figura 19).

La quelación puente intracadena de una agrupación $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ debe causar una gran perturbación estructural en el DNA, pues requiere importantes ángulos diedros entre los planos de las bases implicadas. Este hecho y la coincidencia de la distancia que separa las dos posiciones en cis del complejo con la distancia de empaquetamiento entre pares contiguos de bases ha

despertado grandes expectativas sobre este modelo de platinación.

El esquema está, de hecho, apoyado en interesantes estudios de compuestos modelo y se piensa que sea ésta tal vez la principal lesión que los complejos antitumorales causen en el DNA.

Estudios inmunoquímicos de aductos cis-DDP-DNA apoyan también este mecanismo de interacción. Se ha visto, en efecto, que si se inyecta en animales DNA con cisplatino ligado se desarrollan anticuerpos, específicos para los aductos cis-DDP-DNA pero no para los aductos con el isómero trans y que pueden utilizarse como utensilio para el estudio de las interacciones Pt-DNA. Investigaciones realizadas con homo- y heterocopolímeros, tales como poli(dG), poli(dC), poli[d(GC)], poli[d(GC)] y poli[d(AG)], poli[d(TC)] utilizando estos anticuerpos mono y policlonales demuestran que la principal causa antigénica es la unión intracadena cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 \text{d}(\text{GpG})]$ y, en menor extensión, la unión d(ApG). Los anticuerpos reconocen el DNA platinado con diversos cis-diclorocomplejos de Pt(II), lo que demuestra que estos complejos, biológicamente activos, forman enlaces intracadena d(GpG) y d(ApG).

Asimismo, recientes estudios estructurales han llevado a la resolución de la estructura de algunos oligonucleótidos platinados con el grupo cis-diaminplatino(II), con resultados que apoyan el último esquema de coordinación propuesto. Así ocurre con los obtenidos en la investigación del desoxi-fosfato- $5'$ -Guanosina- $3'$ -fosfo- $5'$ -Guanosina-diaminplatino(II), $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 / \{\text{d}(\text{pGpG})\}]^+$ cuya estructura se esquematiza en la figura 22, y para el que los hechos más significativos son los siguientes:

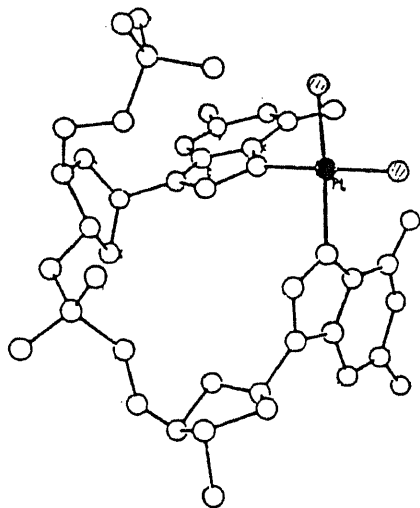


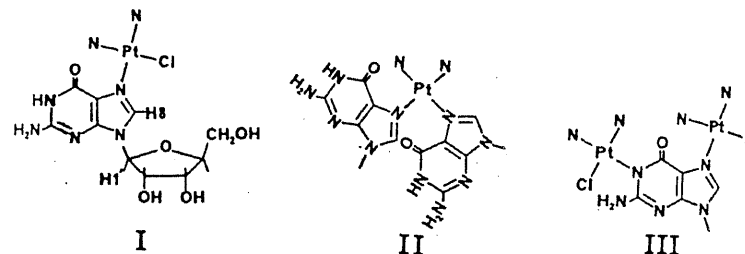
Fig. 22.- Estructura molecular del aducto $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ $\{\text{d}(\text{pGpG})\}$ (una de las cuatro moléculas de la celda unidad). (De *J. Am. Chem. Soc.* 109, (1987)).

La coordinación del grupo $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ a los N-7 de dos nucleósidos de guanina adyacentes para dar un anillo quelato de 17 miembros, produciendo esta quelación intracadena una compresión en el esqueleto que obliga al anillo desoxiribosa del nucleósido 5' a adoptar la conformación C 2'-endo propia de la forma A del DNA. Al mismo tiempo se produce también una perturbación en la orientación de los planos de las bases de guanina, que dejan de ser paralelos para formar un diedro de 76,2 a 86,7 grados, según la unidad elegida de las cuatro que forman la celda elemental. La fuerte perturbación local producida en la estructura del DNA puede ser determinante de la actividad antitumoral del cisplatino. Estudios realizados con otros oligonucleótidos platinados, con tres, cuatro y hasta 12 unidades de nucleótido, llevan a los mismos resultados, el paso a la conforma-

ción C 3'-endo y la unión del resto $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ a los N-7 de dos nucleósidos de guanina adyacentes.

Estos y otros datos revelan, por tanto, que el cisplatino establece "in vitro" e "in vivo", fundamentalmente quelaciones puente intracadena, según las secuencias $\text{d}(\text{GpG})$ y $\text{d}(\text{ApG})$, es decir, puentes tipo 1,2 entre los átomos N-7 de dos bases púricas de nucleósidos adyacentes de una misma cadena. Estudios estructurales, y en especial de RMN, de aductos de $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ con nucleósidos y nucleótidos de guanina realizados por Reedijk, Marcilli y Gronenberg, demuestran también la formación de aductos monofuncionales de fórmula $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{GMP})]$ con el platino ligado al N-7 (I) y que se forma junto a un aducto 1,2 con el resto $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ puenteando a dos unidades de guanina (II).

En los mismos estudios se ha puesto de manifiesto la formación de otro aducto monofuncional con dos unidades de $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^+$ unidas a un mismo nucleósido o nucleótido (Guo ó GMP), a través de los N-7 y N-1, (III). (Ver fórmulas I, II y III).



Interacciones del DNA con trans-DDP

Aunque las investigaciones estructurales se han centrado casi totalmente en aductos del cisplatino con DNA en razón de su actividad biológica, desde hace algún tiempo se presta también

cierta atención a los modos de unión en aductos trans-DDP-DNA, ya que pueden ayudar a prescindir de algunos aspectos del mecanismo molecular del isómero cis. Se sabe que el trans-DDP experimenta el mismo proceso de hidrólisis y forma enlaces intercadena análogos al isómero cis, pero su tendencia a formar puentes intracadena es menor.

Estudios de las formas de unión del trans-DDP a polinucleótidos, con las porciones de guanina separadas por un nucleótido intermedio, (d(GpTpG) o d(GpCpG)), revelan que los aductos contienen siempre uniones 1,3 intracadena, con la secuencia d(GpNpGpNG), donde N es el nucleótido interpuesto (A, C o T), lo que lleva a anillos de 23 miembros, mayores que los de 17 formados por el cis-Pt(NH₃)₂²⁺. En la figura 23 se representa un fragmento de la estructura cristalina del aducto [Pt(NH₃)₂{d(ApGpGpCpT)}] en el que se observa el quelato 1,3 intracadena de 23 miembros, por unión de cis-[Pt(NH₃)₂]²⁺ al N-7 de adenina(1) y al N-7 de guanina(3). El nucleósido interpuesto es, en este caso, la guanosina(2). La distorsión conformacional en el anillo de ribosa debe ser menor en este caso, y presumiblemente la lesión estructural en el DNA sea más fácil de reparar que la causada por el cisplatino.

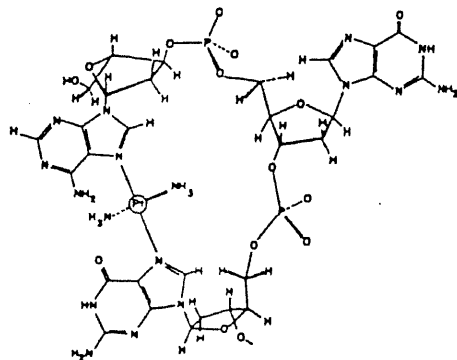


Fig. 23.- Fragmento de trans-[Pt(NH₃)₂{d(ApGpGpCpT)}].
Platinación sobre d(ApGpG). (N7-A(1), N7-G(3)).

Hasta el momento no se han encontrado anillos quelato 1,2 del trans-[Pt(NH₃)₂]²⁺ con bases adyacentes de una misma cadena, pudiendo ser estas diferencias en la regioespecificidad y estereoespecificidad de ambos isómeros la causa de su distinto comportamiento biológico.

ESTUDIOS CON OTROS METALES

De la exposición anterior pudiera obtenerse la falsa idea de que los estudios sobre la acción antitumoral de complejos inorgánicos se han reducido esencialmente a los compuestos del platino.

Sin embargo, las investigaciones con complejos de otros cationes se iniciaron ya bastante antes del descubrimiento de Rosenberg. Así, en 1947 se sintetizan y ensayan ftalato-complejos de Co(II), Ni(II), Fe(II), Cu(II) y Mn(II), y butilftalato-complejos de Cu(II), Ni(II) y Co(II), algunos con cierta actividad antileucémica y activos frente a tumores sólidos.

En 1957, Balo y Banga, tomando como base la teoría de que el metabolismo oxidativo está reprimido en las células tumorales, buscaron complejos autooxidables de metales esenciales, con ácido ascórbico y metabolitos del ciclo de Krebs como ligandos, capaces de promover el mecanismo de la oxidación e inhibir así el crecimiento del tumor.

Otros muchos compuestos, entre ellos complejos aminados de Co(III) y Cr(III) preparados por investigadores japoneses, se ensayaron en los años cincuenta frente a diferentes tumores. Pero los estudios racionales sobre complejos con otros metales distintos del platino no se inician hasta que se descubre la actividad biológica y se empiezan a conocer los mecanismos de acción

del cisplatino. Sin embargo, las investigaciones realizadas hasta la fecha con complejos de otros metales son menos importantes que las de complejos de platino, siendo en éstos donde se han logrado los avances más significativos sobre relaciones estructura-actividad. Estos estudios son, de hecho, los que han estimulado a los investigadores a la búsqueda de nuevas sustancias, tomando como base supuestos deducidos para los complejos de platino, como el que compuestos muy inertes deben ser poco activos y que compuestos muy reactivos deben interactuar con las biomoléculas antes de alcanzar los lugares donde han de ejercer su acción. En el diseño de nuevos compuestos se manejan, pues, ideas básicas de la Química de la Coordinación, pudiendo señalarse, entre otras, las siguientes:

– Que la fuerza de los enlaces en complejos de cationes con un mismo ligando crece al pasar de la 1ª a la 3ª serie de transición, de forma que los metales más pesados serán los que determinen lesiones de más difícil reparación.

– Que por su carácter blando los iones de metales pesados forman los complejos más estables con ligandos con átomos dadores polarizables.

– Que la inercia a la sustitución de ligandos en complejos de metales de transición crece al avanzar de la 1ª a la 3ª serie (los complejos de iones de la 2ª y 3ª series de transición son demasiado inertes lo que justifica su no intervención en funciones metabólicas).

De todo lo anterior se desprende que la mayor parte de los complejos potencialmente activos serán de metales de la mena del platino, tales como Rh(III), Ru(II), Ir(III), Pt(IV), Ru(III) y Os(IV), y dentro de los de geometría plana cuadrada (d^8), además del Pt(II), los formados por Pd(II), Au(III), Ru(I), Ir(I) y Ni(II) (este último demasiado lábil).

Estas cuestiones, determinantes de la estabilidad y reactividad de un compuesto, son de la mayor significación a la hora de enju-

ciar la posibilidad de alcanzar el blanco donde ha de ejercer su acción antitumoral. Otras propiedades, como solubilidad en agua y liposolubilidad, han de ser también tenidas en cuenta como condicionantes del paso, a través de la membrana, al interior de la célula y de la posibilidad de su eliminación por vía renal.

Todas ellas se han puesto en juego en el diseño de complejos de potencial actividad antitumoral con metales como rodio, paladio, rutenio, iridio, cobre, cobalto, hierro, cinc, oro, etc. Sin duda, los más numerosos son los trabajos sobre actividad anticancerígena de complejos de rodio, posiblemente por el descubrimiento de la filamentación bacteriana que producen muchos compuestos del tipo $\text{trans}[\text{RhX}_2\text{L}_4]\text{Y}$, (L = piridina, piridina sustituida o un ligando bidentado como etilendiamina, 2,2'-bipiridilo ó 1,10-fenantrolina). Se observó que la filamentación parece estar relacionada con el carácter lipofílico de los complejos. Su estructura trans contrasta con la configuración cis exigida en complejos de platino, habiéndose realizado algunos estudios sobre formas de unión a componentes celulares, de los que, por razones de tiempo, sólo mencionaremos lo que se conoce para complejos tetra- μ -carboxilato de dirodio(II), de fórmula:

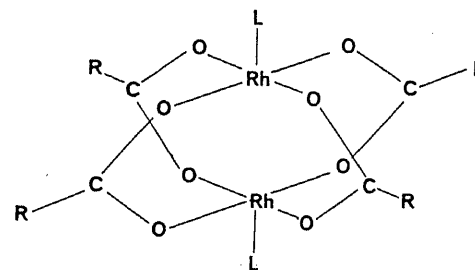


Fig. 24.- Estructura de complejos tetra- μ -carboxilato de dirodio(II). L son ligandos axiales y R la cadena carbonada unida a los grupos carboxilato.

donde L representa ligandos axiales y R la cadena carbonada unida al grupo carboxilato. Los complejos forman aductos por coordinación con nucleófilos en las posiciones axiales, son activos en ensayos "in vivo" frente al tumor ascítico de Enrich en ratones blancos Swiss, en especial cuando se asocian a la arabinosil-citosina.

La investigación de la interacción de estos carboxilato-complejos de rodio con macromoléculas biológicas revela que su enlace se establece con ligandos con nitrógeno dador y en las posiciones axiales. Ensayos en ratones con bitirato de rodio(II) y propionato de rodio(II) revelan la inhibición de más del 90% de la síntesis del DNA a las 24 horas de la incorporación.

Muchas más investigaciones se han realizado con complejos de rodio, cuya descripción se omite por razones de tiempo.

Sin embargo, y como final de esta exposición, hemos creído de interés hacer referencia a algunos de los resultados obtenidos con Pd(II), un catión d^8 como el Pt(II) pero de la segunda serie de transición. La química de la coordinación de ambos iones es análoga en términos de sus estados de oxidación, números de coordinación, geometría asociada a cada estado de oxidación y afinidad por ligandos similares. Así, los complejos de Pd(II) son también de estereoquímica plano-cuadrada, aunque algo menos estables en el sentido cinético y termodinámico que los de Pt(II). El orden de reactividad para complejos de los iones, d^8 , isoelectrónicos, Ni(II), Pd(II), Au(III) y Pt(II) es el siguiente:

Ni(II)	Pd(II)	Au(III)	Pt(II)
$5 \cdot 10^6$	10^5	10^4	1

En consecuencia, la mayor labilidad de los complejos de paladio lleva a pensar que sean menos prometedores e inferiores a los de Pt(II) como agentes anticancerígenos.

Para esclarecer estas hipótesis se han ensayado una serie de complejos análogos a los de Pt(II), como $[Pd Cl_2 en]$, $[Pd Cl_2$

$(Me_4 en)]$, etc. frente a E. coli en medio de cultivo "C" y que se comportan como bacteriostáticos a bajas concentraciones, observándose filamentación sólo con $[Pd Cl_2 en]$ a concentración próxima a la dosis letal.

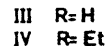
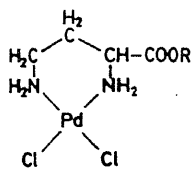
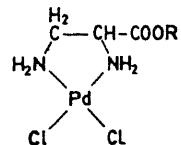
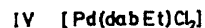
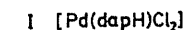
Otros muchos complejos de Pd(II), con ligandos como hidracina, piperidina, dimetilglioxima, etc. se han ensayado también frente a cultivos bacterianos y tumores, con resultados, casi siempre, contradictorios. Su, casi general, inactividad se ha interpretado como debida a la rápida reactividad de los grupos salientes, lo que ha llevado a la preparación de sustancias con ligandos de labilidad más moderada. Se han aislado, en efecto, hidroxocomplejos monómeros y oligómeros con actividad antitumoral, en especial las especies dímeras y trímeras que son, a su vez, menos tóxicas que el monómero.

Complejos con los grupos lábiles sustituidos por un ligando, como malonato y otros grupos bidentados, son también activos, en extensión a veces comparable o mayor que la del cisplatino.

Los resultados descritos nos animaron a proyectar una investigación, realizada ya, en gran parte, en los Laboratorios de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia, consistente en aislar cis-dicloro-complejos de Pd(II) (siguiendo directrices paralelas a estudios realizados sobre complejos de Pt(II) por Iñagaki y cols.) con ligandos quelato que, además de no plantear problemas de incompatibilidad fisiológica a la dosis que se empleen, permitieran conocer la influencia de la liposolubilidad en la cinética de su posible actividad, así como comparar la actividad de complejos cargados y neutros.

Se centró, por ello, la atención en una familia de cuatro cis-dicloro-complejos, quelados con los α, ω -diaminoácidos, DL-2,3-diaminopropiónico (dapH) y DL-2,4-diaminobutírico (dabH) y sus correspondientes ésteres etílicos, que se sintetizaron por primera vez y se caracterizaron, por análisis y técnicas

fisicoquímicas, como sustancias que responden a las fórmulas siguientes:

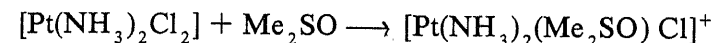


Es de esperar que las formas esterificadas, eléctricamente neutras, más permeables para las membranas celulares, sean biológicamente más activas que las formas ácidas, que a pH 4,5 existen ya como formas aniónicas [Pd(dda)Cl₂]⁻. Ambas formas, ácidas y esterificadas, se comportan, sin embargo, de la misma forma a pH más alto, formando hasta pH 8 clorohidroxocomplejos y, a pH más alto, dihidroxocomplejos, por intercambio de los ligandos cloruro.

Las cuatro sustancias ejercen ya, a una concentración próxima a micromolar, un marcado efecto inhibitorio en el desarrollo de un cultivo de *E. coli*, que es completo para una concentración de 75 μM. El compuesto cis-dicloro-2,4-diaminobutirato de etilopaladio(II), a dosis de 50 μM, conduce a formas polinucleadas, de aspecto filamentosas, fenómeno característico de complejos antitumorales, aunque la filamentación no implique siempre actividad antitumoral.

Estos resultados justificaron investigar también el efecto parasiticida de los complejos sobre cultivos "in vitro" de formas epimastogóticas de *Tripanosoma Cruzi*, con un resultado que fue, en principio, extrañamente negativo, lo que despertó nuestro interés por las condiciones en que se habían realizado las experiencias. Al conocer que se había utilizado como disolvente dimetilsulfóxido, pensamos que la sustancia podría haber sustituido a algún ligando cloruro, lábil, por unión por el átomo de azu-

fre, de carácter blando, modificando el posterior comportamiento biológico de los complejos. Aconsejamos utilizar, por ello, un medio acuoso de cloruro como disolvente, comportándose todos los complejos como muy activos en estas nuevas condiciones. Curiosamente, con posterioridad a estos hechos, durante 1987, ha aparecido una investigación que estudia la cinética a 37° de la sustitución de cloruro por Me₂SO, en cis- y trans-DDP, y que revela la sustitución de un ion cloruro según la reacción:



con una vida media para los isómeros de 60 y de 8 minutos, respectivamente. En el isómero cis la reacción con Me₂SO prosigue para formar otros productos por rotura de enlaces Pt-NH₃, a causa del efecto cinético trans labilizante del Me₂SO unido por el átomo de azufre.

Este relato se incluye aquí para llamar la atención de los investigadores que generalmente utilizan Me₂SO como disolvente en estudios biológicos. Muchas de las experiencias sobre actividad biológica de complejos se han realizado en estas condiciones y han catalogado, sin duda, como inactivas a sustancias que realmente no lo serán.

Los porcentajes de inhibición logrados por el complejo cis-(dicloro-2,4-diaminobutirato de etilo)paladio(II) frente a *Tripanosoma Cruzi* son de un 100% a las 24 horas, a dosis de 100 μg/ml del complejo, actividad parasiticida que es superior a la del cisplatino.

Con el estímulo de estos resultados se amplió la investigación de los complejos al estudio de su reactividad "in vitro" frente a DNA de distintas procedencias (esperma de salmón sonificado, de estreptomicas sp. y humano), comparando los efectos sobre la desnaturalización y renaturalización (por la disminución en T_m e hiperromicida (H%)) con los producidos por el cisplatino, así

como frente a cromatina aislada de eritrocitos de pollo. El complejo con 2,4-diaminobutirato de etilo se estudió también “in vivo” en su actividad sobre el DNA cromosómico de las glándulas salivares de larvas de mosca *Drosophila hydei*, así como en la consiguiente inhibición de la transcripción cromosómica, es decir, en la formación de híbridos DNA-RNA.

Los resultados obtenidos permiten destacar, ante todo, la reactividad inmediata de los complejos de paladio, frente a la inercia del cisplatino, en las reacciones con el DNA. Se aprecia además que el complejo con 2,4-diaminobutirato de etilo y los otros complejos de Pd(II) son entre 100 y 250 veces más efectivos que el cisplatino (tabla 2) y producen una desestabilización de la estructura secundaria del DNA en doble hélice, favoreciendo su desdoblamiento en un mecanismo global de acción análogo al del cisplatino, pero cinéticamente mucho más rápido.

TABLA 2

Parámetros de desnaturalización de DNA nativo y en presencia de $[\text{Pt}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$ y $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$		
	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	H (%)
DNA nativo	68,9	33,5
DNA-Pd ($r = 0'0005$)	68,9	28,4
DNA-Pd ($r = 0'0010$)	65,7	24,4
DNA-Pd ($r = 0'0015$)	47,8	11,0
DNA-Pd ($r = 0'0020$)	40,6	10,1
DNA-Pd ($r = 0'0025$)	ND	ND
DNA-cis-DDP ($r = 0'25$)*	65,7	35,4
DNA-cis-DDP ($r = 0'25$) ⁺	64,9	28,2

T_m : Temperatura de desnaturalización de la molécula de DNA.

H : Hiperchromicidad.* Incubación de 15 minutos. ⁺ Incubación de 48 h.

Nota: El efecto del compuesto de paladio es independiente del tiempo de incubación.

Los ensayos de la cinética de la renaturalización del DNA revelan, además, que la inhibición de este proceso es mayor cuando el complejo de Pd(II) actúa sobre DNA nativo que cuando lo hace sobre DNA desnaturalizado. Los complejos de Pd(II) son activos no sólo frente al DNA nativo sino también frente al DNA unido a las proteínas, a juzgar por los resultados de los estudios con cromatina aislada de eritrocitos de pollo.

Muy interesante son los resultados obtenidos por microinyección del complejo de Pd(II) con 2,4 diaminobutirato de Et (10^{-6}M) en larvas de la mosca *Drosophila hydei*, que revelan que los complejos actúan también sobre el DNA cromosómico, afectando al ordenamiento estructural del asociado a proteínas, induciendo, como muestra la figura 25, la formación de hinchamientos o expansiones (“puffs”) alcanzando al material genético de las células de organismos superiores.

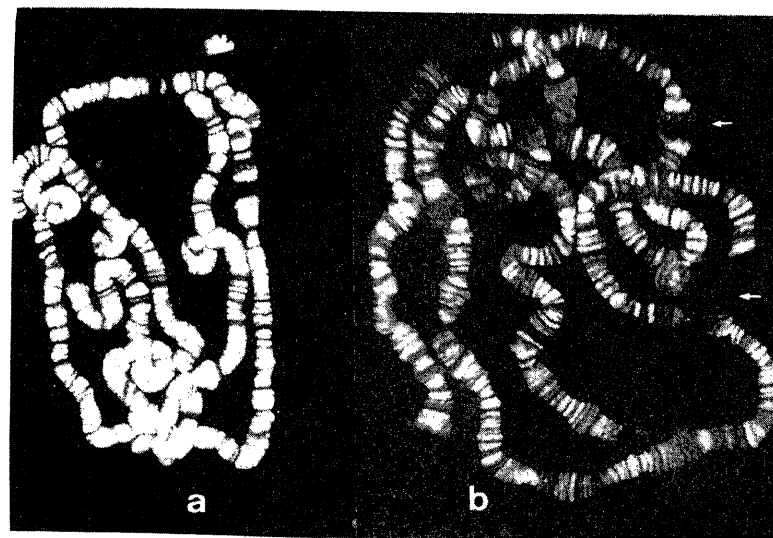


Fig. 25.- Cromosomas de *Drosophila*: (a) Estado normal. (b) Puffs formados por tratamiento con $[\text{Pd}(\text{dab Et})\text{Cl}_2]$ (marcado con la flecha).

Todos los resultados señalan a un mecanismo similar al de los complejos de Pt(II), y a que los complejos de Pd(II) deben ser también agentes antitumorales.

Pero antes de realizar un "screening" de la actividad de los complejos investigados de paladio(II) frente a diferentes tumores, sólidos y líquidos, era preciso obtener datos sobre niveles de toxicidad de las sustancias. Para ello se realizaron ensayos con lotes de ratones blancos Swiss de 25 g. de peso, a los que, por inyección intraperitoneal, se les suministraron dosis crecientes del complejo cis-(dicloro-2,4-diaminobutirato de etilo)paladio(II), observando una toxicidad muy baja, hasta el punto de que fue imposible determinar los valores de DL_{50} , pues los límites de solubilidad en agua exigían, para proseguir en el aumento de la dosis, volúmenes de disolución no tolerables por los animales. Es obvio, sin embargo, que el complejo es mucho menos tóxico que el cisplatino, lo que abre interesantes expectativas, ya que la quimioterapia con complejos de Pt(II) viene seriamente limitada por la nefro- y hematotoxicidad, aún a dosis terapéuticas. Se estimó, por ésto, de interés analizar las posibles lesiones morfológicas causadas en animales por nuestro producto, para lo que se trataron dos lotes con dosis de 2,66 mg/Kg y 26,6 mg/Kg de peso, sacrificando los animales a los 5 días, comparando los hallazgos histopatológicos con los producidos por dosis idénticas de cisplatino en un lote control.

Ninguno de los productos produce, a la dosis baja, lesiones visibles por microscopía óptica en los órganos estudiados (riñón, hígado, bazo).

Sin embargo, dosis de 26,6 mg/Kg de cisplatino provocan, a nivel córtico-medular, la destrucción de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales, sin fragmentación de la membrana basal, con pérdida del borde en cepillo de los túbulos y formación de cilindros granulares e hialinos a nivel de túbulos colectores, sin afectación de éstos. Los glomérulos aparecen

indemnes, todo ello compatible con el diagnóstico de una necrosis tubular aguda.

Sin embargo, el tejido renal de ratón tratado con nuestro complejo de paladio no muestra ninguna de las lesiones mencionadas, conservándose intacto el epitelio, con el borde en cepillo.

Dosis de 26,6 mg/Kg de cisplatino producen también en el bazo una drástica disminución de megacariocitos (células multinucleadas PAS positivas) así como una franca depleción linfoide, mientras que el bazo de animales tratados con el complejo de paladio no muestra diferencia significativa con el de animales del lote control, no tratados.

Los hechos experimentales reseñados son, en conjunto, sorprendentes, y despiertan una enorme inquietud por conocer el comportamiento de estos complejos neutros y esterificados de paladio frente a diversos tumores líquidos o sólidos, implantados en animales. En esta fase se encuentra el trabajo que ocupa a las personas implicadas en esta investigación, y que constituyen un grupo abierto, interdisciplinar, en el que colaboran miembros de los Departamentos Universitarios de Química Inorgánica, Microbiología y Parasitología, en la Facultad de Farmacia, y de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia, en la Facultad de Medicina (Universidad de Granada), así como del Centro de Biología Molecular del CSIC (en la Universidad Autónoma de Madrid).

Fue precisa esta colaboración multidisciplinar al modo de la establecida por el Profesor Barnett Rosenberg, descubridor de los complejos de platino para el tratamiento del cáncer.

Como muestra de reconocimiento público debo mencionar, en justicia, a las personas que hicieron posible la obtención de estos resultados.

A mi hija, María Luisa, que realizó sobre este tema su Tesis Doctoral dirigida por mí, y por los Profesores J. Niclós Gutiérrez y

M.^a T. Fernández Martínez, del Departamento de Química Inorgánica.

A la Profesora M. Ferrer Moreno del Departamento de Microbiología y a los Profesores A. Osuna Carrillo de Albornoz y M.C. López López, del Departamento de Parasitología.

Al Profesor F. O'valle Ravassa, del Departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia y al Prof. de Investigación Dr. C. Alonso, del Centro de Biología Molecular del CSIC.

Dentro de este año se cumplirán los veinte de la primera evidencia de la acción anticancerígena de los complejos de platino, y una década de la aprobación de su uso clínico. Mucho se ha avanzado en el corto espacio de tiempo transcurrido, aunque todavía no haya respuestas definitivas al mecanismo de la acción antitumoral de los complejos inorgánicos.

Para avanzar en este campo es clara la necesidad de la colaboración de equipos multidisciplinares, en los que tendrán mucho que decir también los químicos inorgánicos.

Afortunadamente es cada vez mayor la apertura de los equipos de investigación a colaboraciones de este tipo y que, a mi juicio, debieran ser promovidas, para el desarrollo de grandes temas de trabajo, por los equipos universitarios de gobierno.

Se aprovecharía, de esta forma, el gran potencial científico de la Universidad, aunando esfuerzos para el desarrollo de temas a los que vale la pena entregarse plenamente.

HE DICHO

