

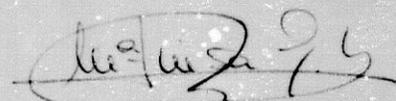
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA INORGANICA

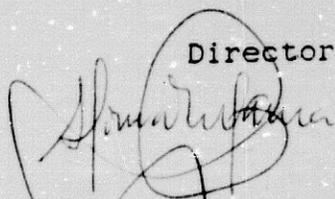
ESTUDIO QUIMICO Y ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA POTENCIAL DE
CIS-DICLOROCOMPLEJOS DE PALADIO(II) CON α , ω -DIAMINOACIDOS
Y SUS ESTERES ETILICOS

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL
presentada por la Licenciada
M^a Luisa González Moles para
el Grado de Doctor en Farma-
cia por la Universidad de
Granada.



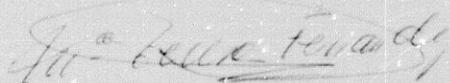
M^a Luisa González Moles

Director



Salvador González García.

Co-Directores



M^a Teresa Fernández Martínez



Juan Nicolás Gutiérrez

Granada, Julio de 1.990.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 19 89 a 19 90

Folio

Número

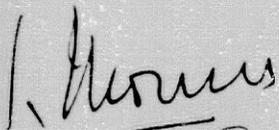
Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.^{ña} MARIA LUISA GONZALEZ MOLES, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "ESTUDIO QUIMICO Y ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA POTENCIAL DE CIS-DICLOROCOMPLEJOS DE PALADIO (II) CON α , ω -DIAMINOCIDOS Y SUS ESTERES ETILICOS"

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, éste le calificó de Apto con honores.

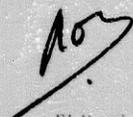
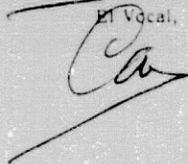
Granada, 27 de noviembre de 1989

El Secretario del Tribunal,

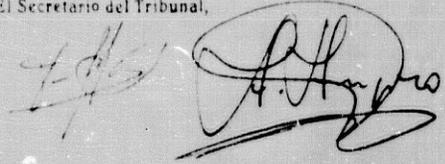
EL PRESIDENTE



El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,

Firma del Graduado,



INVESTIDURA . . . En el día de la fecha se ha conferido a D. _____ el Grado de Doctor en la Facultad de _____, conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, de _____ de 19 _____

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, de _____ de 19 _____

El Catedrático Secretario,

V.º B.º
EL DECANO,

SALVADOR GONZALEZ GARCIA, CATEDRATICO DE QUIMICA INORGANICA DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA INORGANICA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICO: Que D^a Maria Luisa González Moles ha realizado en el Departamento de Química Inorgánica, bajo mi dirección y con la co-dirección de los Profs. Drs. D^a M^a Teresa Fernández Martínez y D. Juan Nicolás Gutiérrez, el trabajo que, con el título de "ESTUDIO QUIMICO Y ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA POTENCIAL DE CIS-DICLOROCOMPLEJOS DE PALADIO(II) CON α , ω -DIAMINOACIDOS Y SUS ESTERES ESTILICOS", presenta para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada.

Granada, Julio de 1.990.



Salvador González García

*A mis padres, a Agustín y
a nuestros hijos.*

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han colaborado a hacer posible la finalización de este trabajo que marca un jalón importante en mi formación. Entre ellas, quiero destacar, en primer lugar, a mi padre que, con su experiencia de muchos años, supo diseñar el esquema de este trabajo en sus aspectos químicos y biológicos. Sus acertados consejos me animaron siempre a proseguir, en circunstancias a veces difíciles, en la labor de laboratorio.

Al Prof. Dr. D. Juan Nicolás Gutiérrez y a la Prof. Dra. D^{ca} M^{ca} Teresa Fernández Martínez a cuyo lado aprendí el rigor que exige el trabajo científico. A los dos expreso mi reconocimiento por su colaboración en la interpretación de resultados y preparación de esta memoria.

A todos los compañeros del Departamento de Química Inorgánica (Facultad de Farmacia), en especial a los Drs. Sánchez Santos, González Pérez, Matilla Hernández, Tercero Moreno, etc. que, de una forma u otra, han colaborado en la discusión de los resultados.

El carácter multidisciplinar de esta investigación obliga, de forma especial, a expresar el reconocimiento público a Departamentos y personas que hicieron posible la obtención de muchos de los resultados que aquí se incluyen.

Así, la Prof. Dra. Ferrer Moreno, del Dpto. de Microbiología, los Profs. Dres. Osuna Carrillo de Albornoz, del Dpto. de Parasitología, M.C. López López, del Instituto López Neira de Parasitología, el Prof. de Investigación Dr. C. Alonso, del Centro de Biología Molecular del CSIC, el Prof. Dr. O'Valle Ravassa, del Dpto. de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia, merecen para mí el agradecimiento más sincero,

por su importante colaboración en la problemática biológica de esta Memoria.

Por último, mi gratitud al personal de Administración y Servicios del Dpto. de Química Inorgánica (Facultad de Farmacia) por su exquisita disposición en aquellos aspectos que eran de su competencia.

Finalmente, mi gratitud también a D. Antonio Yudes, que tanto esmero puso en la labor mecanográfica de este trabajo.

A todos, muchas gracias.

Tesis Doctoral M.L. Gonzalez Moles.

I N D I C E

	<u>Pag.</u>
<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>PARTE A: ANTECEDENTES Y OTRAS CONSIDERACIONES</u>	12
I. ACCION ANTICANCERIGENA Y OTROS EFECTOS BIOLOGICOS	13
I.1. Relaciones estructura-actividad antitumoral en complejos de platino.....	22
I.2. Bases inorgánicas de las propiedades antitumo- rales y otros efectos biológicos de complejos de platino.....	28
I.3. Bases biológicas de la actividad de complejos de platino: Estructura y propiedades del DNA	37
I.4. Modos de reacción de complejos de platino con el DNA: Estado actual.....	46
I.5. Esterificación de aminoácidos en la síntesis de análogos del cis-DDP.....	71
II. COMPLEJOS DE PALADIO CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTITUMORAL .	77
II.1. Antecedentes	78
II.2. Recientes avances e interés del presente estudio	81
<u>PARTE B: MATERIALES Y METODOS.</u>	90
I. METODOS DE SINTESIS	91

I.1. Diclorhidrato de 2,3 diaminopropionato de etilo (dap-Et ₂ HCl)	91
I.2. Diclorhidrato de D,L-2,4-diaminobutirato de etilo (dab-Et-2HCl)	91
I.3. Cis-dicloro (D,L-2,3-diaminopropiónico) paladio(II) cis-[Pd(dapH)Cl ₂]	92
I.4. Cis-dicloro (D,L-2,4-diaminobutirico) paladio(II) cis-[Pd(dab-H)Cl ₂]	93
I.5. Cis-dicloro (D,L-2,3-diaminopropionato de etilo) paladio(II) cis-[Pd(dap-Et)Cl ₂]	93
I.6. Cis-dicloro (D,L-2,4-diaminobutirato de etilo) paladio(II) cis-[Pd(dab-Et)Cl ₂]	93
I.7. Productos y reactivos	94
II. TECNICAS EXPERIMENTALES FISICOQUIMICAS	95
II.1. Estudio potenciométrico y conductimétrico	95
II.1.1. Equipos de valoración	95
II.1.2. Valoraciones potenciométricas	96
II.1.3. Valoraciones conductimétricas	96
II.1.4. Productos y reactivos	97
II.2. Espectros IR	97
II.2.1. Preparación de las muestras	97
II.2.2. Estudio de los ligandos y de los complejos ..	97
II.3. Estudio de la estabilidad térmica	98
II.4. Otras determinaciones	98
III. ESTUDIOS BIOLÓGICOS	99

III.1. Estudio microbiológico	99
III.2. Estudio parasitológico	101
IV. ENSAYOS CON DNA, CROMATINA Y CROMOSOMAS	106
IV.1. Ensayos "in vitro" con DNA y cromatina	106
IV.2. Ensayos "in vivo" con cromatina y cromosomas	109
V. ENSAYOS TOXICOLOGICOS	111
<u>PARTE C: RESULTADOS Y DISCUSION</u>	115
I. CARACTERIZACION DE LOS LIGANDOS.....	116
I.1. Valoraciones potenciométricas y conductimétricas ...	116
I.2. Espectro de infrarrojo	131
II. PROPIEDADES DE LOS COMPLEJOS DE PALADIO(II).....	139
II.1. Espectros IR y estabilidad térmica.....	139
II.2. Comportamiento potenciométrico y conductimétrico ...	152
III. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	170
IV. RESULTADOS PARASITOLÓGICOS	174

V. RESULTADOS TOXICOLOGICOS	176
VI. ACTIVIDADES FRENTE A DNA, CROMATINA Y CROMOSOMAS	178
VI.1. Ensayos "in vitro" con DNA y cromatina:.....	179
a) Resultados de espectrofotometria diferencial ultravioleta	181
b) Cinética de la desnaturalización del DNA	184
c) Efecto sobre la renaturalización del DNA	190
d) Cinética de la desnaturalización de cromatina...	195
e) Consideraciones adicionales.....	195
VI.2. Ensayos "in vivo" con cromatina y cromosomas.....	197
VI.3. Consideraciones generales.....	200
VII. CONSIDERACIONES FINALES	203
CONCLUSIONES	206
BIBLIOGRAFIA	215

INTRODUCCION

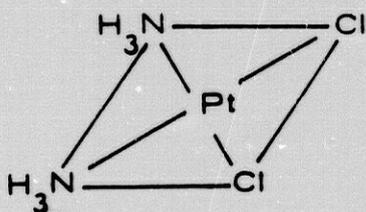
=====

Uno de los frentes más activos que mantiene el hombre en su guerra abierta contra la enfermedad es, por supuesto, la lucha contra el cáncer. En la actualidad, la prevención del cáncer es más un deseo que una realidad. La extirpación quirúrgica o la irradiación de tumores sólo aportan soluciones limitadas, tropezando con dificultades insalvables cuando existe invasión de órganos nobles o cuando, a través de la sangre o del sistema linfático, un tumor primitivo produce focos metastásicos o tumores secundarios. Sobre esta base, la poliquimioterapia surge como una necesidad para el tratamiento farmacológico del cáncer. Tras la introducción de las "mostazas nitrogenadas" para el tratamiento de leucemias a finales de los años 40, una intensa labor investigadora perseguía el descubrimiento de agentes antitumorales con una actividad más selectiva frente a un amplio espectro de cánceres. Fruto de este esfuerzo investigador son los cerca de treinta potentes compuestos antitumorales, no exentos de efectos secundarios

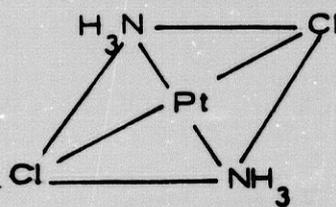
indeseables, que se usan en la poliquimioterapia del cáncer. Tales sustancias pertenecen a ocho amplias categorías farmacológicas como son, los agentes alquilantes, productos naturales, antibióticos, derivados de nucleósidos, antifolatos, inhibidores de la mitosis, esteroides y compuestos de coordinación de platino(II).

Aunque el estudio de compuestos de coordinación como potenciales agentes anticancerígenos se inició en la década de los años 40, los descubrimientos de la actividad biológica de complejos cloro-aminados de platino (1965)¹ y, en concreto, de las propiedades antitumorales del cis-diclorodiaminplatino(II) (cis-DDP o cis-platino) frente a leucemia L1210 en ratones (1968)² por el prof. Barnett ROSENBERG y colaboradores se reconocen en la comunidad científica internacional como el comienzo de la reciente historia de los compuestos de coordinación en la quimioterapia del cáncer. Se trata, además, de una curiosa historia donde el fenómeno sorprendente y casual desempeña un papel tan destacado como su acertada interpretación científica. Lo sorprendente fue la filamentación de Escherichia coli (hasta alcanzar unas 300 veces su longitud normal de 2-5 μ) en un medio con cloruro conteniendo 2 electrodos de platino, entre los que se accionaba el paso de una corriente eléctrica. El acierto de Rosenberg (1965)¹ estuvo en no atribuir el fenómeno a la corriente eléctrica (cuando lo que proyectaba era realmente investigar los efectos de campos eléctricos y magnéticos sobre la división celular), sino explicar, y demostrar después, que tal filamentación

bacteriana era debida a muy pequeñas cantidades de cloro-complejos aminados de platino(II,IV), producidos por electrolisis o por descomposición fotoquímica de éstos. Nuevas experiencias demostraron que el principal causante de la filamentación del colibacilo era el cis-DDP, mientras que su isómero geométrico trans-DDP resulta prácticamente inactivo a las mismas dosis.



cis-DDP



trans-DDP

Los primeros estudios sistemáticos de la actividad biológica de los cloro-complejos de platino pusieron de manifiesto dos circunstancias de particular relevancia, con vistas a su potencial actividad como antitumorales. De una parte, la estrecha correlación entre los efectos biológicos (terapéuticos y/o toxicológicos) y la reactividad de los cloro-complejos de platino con el DNA, resultando mucho más activo el cis-DDP que su isómero trans. Por otro lado y pese a la inercia química de las uniones $(\text{NH}_3)_2\text{Pt-DNA}$, las lesiones causadas en la superestructura del DNA son susceptibles de ser reparadas por los conocidos mecanismos enzimáticos (más o menos sofisticados) de que disponen las células para reconstruir esta

crucial biomolécula. Estas y otras circunstancias, relacionadas con la estabilidad conformacional del DNA, han impulsado extraordinariamente la investigación de las interacciones de iones metálicos con los ácidos nucleicos (DNAs, RNAs) y con sus constituyentes. Paralelamente, también se han visto fomentados (no siempre con un planteamiento típico) los estudios de la interacción de complejos de platino o de otros metales de transición con estas macromoléculas y con las biomoléculas que las integran.

La bibliografía original directa o indirectamente relacionada con las propiedades antitumorales de complejos de platino y de otros metales es extraordinariamente variada y abundante². En ella se hace referencia desde las más sistemáticas correlaciones estructura química-actividad biológica o antitumoral, hasta problemas relacionados con la toxicidad, efectos de complejos sobre el sistema inmunitario, potencial mutagenicidad y carcinogenicidad de complejos a dosis normalmente subterapéuticas o, también, a propiedades biológicas (antibacterianas, antivirásicas, etc.) que con frecuencia, aunque no necesariamente, manifiestan los complejos con actividad antitumoral. Una revisión de tan diversificada información científica se resiste a la formación, cada vez más especializada, de la mayor parte de la población científica, aunque, por fortuna y por la vigencia del tema, se dispone de autorizadas y constantes revisiones⁴⁻¹¹ de uno o varios de los aspectos mencionados. La lectura de estas fuentes de revisión y, en lo posible, de artículos originales muestra, además del

estado actual de este apasionante campo de investigación, una serie de generalizaciones, criterios y planteamientos que, aún entendiéndose como constante objeto de renovación, armonizan con cierta coherencia la labor realizada y, lo que no es menos importante, apuntan las directrices que, salvo sorpresas, polarizan las futuras investigaciones a corto y medio plazo en el referido contexto.

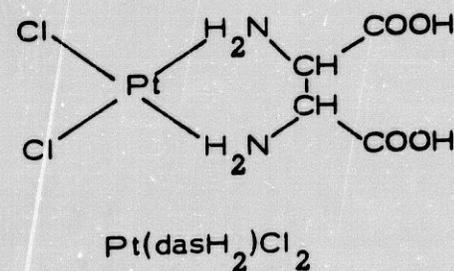
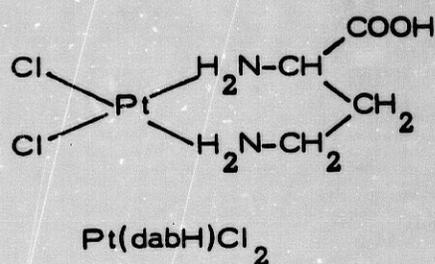
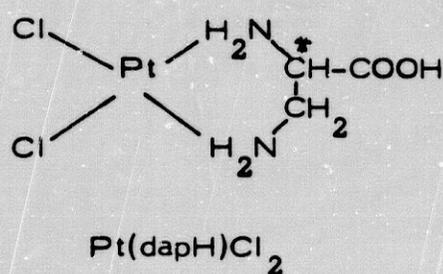
Se admite sin ambigüedad, por ejemplo, que el cis-DDP es mucho más activo que el trans-DDP⁷⁻¹⁰, hasta el extremo de que este último carece de propiedades biológicas significativas a dosis para las que cis-DDP es un agente antitumoral frente a un marcado amplio espectro de cánceres. Existía una notable evidencia de que la reacción de ambos isómeros con DNA tenía múltiples aspectos comunes⁷⁻¹⁰, aunque se manifiestan con muy distinta intensidad. Sin embargo, la idea apuntada desde hace cierto tiempo por Rosenberg (1978)⁸ de que "sólo las reacciones que puede dar el complejo cis-, pero no el trans-, deben ser probablemente significativas", no ha sido más que recientemente verificada (en parte), mediante estudios cristalográficos (1985, 1987) de los productos de reacción de cis- y de trans-DDP con una serie de oligo-desoxi-nucleótidos cuidadosamente diseñada¹².

El cis-DDP no es activo frente a todo tipo de tumores, pero los mayores inconvenientes que plantea su uso están más bien relacionados con su toxicidad, sobre todo renal⁷. Curiosamente, buena parte de esta toxicidad se explica

por la formación de μ -hidroxo-complejos, dimeros y trimeros, cargados y extremadamente inertes, siendo así que la "inercia" de los complejos de platino(II), 10^5 - 10^6 veces mayor que en los análogos de paladio(II), se ha aceptado como "condición necesaria" para obtener la perseguida actividad biológica. Un comentario hecho por Cleare⁴ en este sentido hace tiempo (1974), en una de las primeras revisiones sobre "Complejos de metales de transición en la quimioterapia del cáncer", y mantenido después por Cleare e Hydes (1980) parece haberse dejado sentir. Sin embargo, recientes investigaciones de Gill (1984) demuestran que determinados complejos de paladio(II) muestran una actividad antitumoral frente al sarcoma ascítico-180J, superior a la del complejo análogo de platino(II).

Algunos de los complejos de paladio(II) encontrados activos por Gill contienen ligandos bidentados (diaminas, dicarboxilatos). El uso de quelantes, sobre todo de diaminas, sustituyendo en este caso a las moléculas de amoníaco (ligandos inertes) en cis-DDP, es un criterio muy difundido en la síntesis de nuevos complejos potencialmente antitumorales, como procedimiento que garantiza la disposición cis- de los ligandos inertes y lábiles en un complejo plano-cuadrado de platino(II) y, por tanto, que impone la configuración o geometría molecular que se presume va a resultar de mayor actividad. Además, otro argumento que se considera "a priori" favorable es el uso de ligandos "naturales", es decir, moléculas biológicas (como los aminoácidos) o fácilmente metabolizables (como los

dicarboxilatos) que, en caso de desplazarse del entorno del metal en el complejo, resulten "fisiológicos" o al menos no causen problemas de toxicidad. Así, siguiendo el criterio de usar diaminas quelantes como ligandos inertes y la sugerencia de D.R. Williams de incorporar aminoácidos a quelatos metálicos que pretendan usarse con fines clínicos, Inagaki, Kidani y colaboradores (1980) prepararon cis-diclorocomplejos de platino(II) con los diaminoácidos 2,3-diaminopropiónico (dapH), 2,4-diaminobutírico (dabH) y 2,3-diaminosuccínico (dash₂).



La coordinación de estos diaminoácidos al platino(II) debe exaltar la fuerza ácida de sus grupos carboxílicos, dando por disociación especies de carga iónica negativa (con dificultad para difundir a través de membranas biológicas y,

sobre todo, con una considerable pérdida de capacidad para atacar al DNA), por lo que Inagaki, Kidani y cols. prepararon e investigaron también los dicloro-complejos de platino(II) análogos con los correspondientes ésteres etílicos de los diaminoácidos. Este interesante estudio comparativo reveló que los dicloro-complejos de platino(II) con diaminoácidos y sus ésteres etílicos producen una interacción con el DNA, semejante en la forma, pero más intensa en los productos esterificados (eléctricamente neutros). Esta idea de esterificar los grupos carboxílicos de aminoácidos (y péptidos), para mejorar después sus quelatos de dicloroplatino(II) "neutros", ha sido fomentada, entre otros, por el profesor Wolfgang Beck y cols. (1980).

Estas y otras muchas consideraciones deben tenerse en cuenta a la hora de plantearse la realización de un trabajo en el campo de los compuestos de coordinación de platino o de otros metales como potenciales agente antitumorales. Pero sobre todas estas u otras consideraciones, que después guardarán una relación más o menos evidente con nuestro proyecto, surge una imperiosa necesidad, tanto más insalvable cuanto más amplio sea nuestro objetivo, que es la colaboración en equipo multidisciplinario. Esta es, desde luego, una necesidad que surgió desde un principio y que el propio Rosenberg (1980)² expresaba así: "Nos enfrentábamos, entonces, a una serie de interrogantes cuyas respuestas eran requeridas con urgencia y precisaban de experta competencia en Química de la Coordinación, Bioquímica, Biofísica, Biología Molecular,

Fisiología, Patología, Farmacología, Microscopia Electrónica, Inmunología y, finalmente, en Medicina Clínica..."

En una palabra, es preciso contar con el más amplio abanico de disciplinas de la Química y Biología. Esta circunstancia se pone, claro está, de manifiesto en la bibliografía, pero se siente de forma aún más tangible en reuniones científicas internacionales, como la III Conferencia Internacional sobre Química Bioinorgánica (Noordwijkerhont, Holanda, 1987)^{12.13} o los llamados "Meeting Satelites"^{14.15}.

El presente trabajo fue proyectado en el Departamento de Química Inorgánica (Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada) como apropiado para iniciar las investigaciones sobre complejos con potencial actividad antitumoral, en el sentido antes indicado. Forma parte de una investigación más amplia realizada por parte del equipo que dirige el Prof. D. Salvador González García, en dicho Departamento. La realización motivó la participación activa de personal investigador de los Departamentos de Microbiología, Parasitología y Anatomía Patológica, de la propia Universidad, y también, la valiosa colaboración de científicos del Centro de Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Madrid.

El objetivo esencial del presente estudio consistía en la preparación de diclorocomplejos de paladio(II) con α , ω -diaminoácidos y con sus ésteres etílicos y la caracterización de sus propiedades químicas y biológicas como potenciales

agentes antitumorales. Los resultados obtenidos, en este sentido, por los metodos descritos en la parte B, se presentan y discuten en la parte C, sobre la base de los antecedentes y otras consideraciones que se resumen en la Parte A de esta Memoria.

PARTE A: ANTECEDENTES Y OTRAS CONSIDERACIONES

I.- ACCION ANTICANCERIGENA Y OTROS EFECTOS BIOLOGICOS
DE COMPLEJOS DE PLATINO.

Filamentación de Escherichia coli sp. 14.16-18

El descubrimiento de las propiedades antitumorales de cis-diclorodiaminplatino(II) (cis-DDP, cisplatino) no fue inmediato, ni tampoco algo esperado. Según las palabras del actor principal de esta escena de la Historia de la Ciencia, el Prof. Barnett Rosenberg, todo llegó a raíz de su traslado (1961) desde el Departamento de Física de la Universidad del Estado de Michigan donde, atraído por una serie de microfotografías de células en fase mitótica de su división, pensó en estudiar la influencia de campos y corrientes eléctricas y campos magnéticos en la multiplicación celular¹⁰. Desde muy pronto, los acontecimientos iban a dirigir sus investigaciones y la de muchos otros en un sentido mucho más atractivo. En el curso de una serie de experiencias preliminares encaminadas a poner a punto un equipo de cultivo continuo, dotado de electrodos de platino y un medio de cultivo "C" conteniendo cloruro amónico*, se hacía pasar una corriente eléctrica por el medio en que se desarrollaba un cultivo de Escherichia coli en fase de crecimiento estacionario. En tales condiciones, entre otros efectos, se observó uno ciertamente conocido, pero inesperado.

* El medio "C" tiene NH_4Cl (2g/l), Na_2HPO_4 (3g/l), NaCl (3g/l), MgCl_2 (0.01 g/l) y Na_2SO_4 (0.026 g/l)⁴.

Como consecuencia de una inhibición de la división celular, aunque no de su crecimiento, las bacterias (colibacilos) de 2.5 μ m de longitud, daban lugar a filamentos de hasta 300 veces su longitud normal (figura 1). Este fenómeno se había descrito como debido a los efectos de factores externos, como la luz UV, cambios en la temperatura o la presión osmótica del medio, transferencia a un medio no usual, y a la acción de algunos compuestos orgánicos (azul de metileno, penicilina)⁴.

El acierto de Barnett Rosenberg estuvo, desde luego, en no atribuir el fenómeno a la acción de la propia corriente eléctrica (influencia que de hecho proyectaba estudiar), sino a la formación de trazas de productos que se originarían por electrolisis en el propio medio de cultivo. Una larga serie de experiencias¹⁰ le llevaría a demostrar esta interpretación, estableciendo que los agentes responsables de la filamentación bacteriana eran los complejos cis-diclorodiaminplatino(II) (cis-DDP o cis-platino) y cis-tetraclorodiaminplatino(IV) (cis-TDP), mientras que los correspondientes isómeros trans-DDP y trans-TDP eran inactivos a las mismas dosis ensayadas (5-10 ppm). En contraste con el comportamiento de estos compuestos eléctricamente neutros, complejos iónicos (cargados), como el tetracloroplatinato(II) de amonio, $(\text{NH}_4)_2 [\text{Pt}^{2+}\text{Cl}_4]$, eran bactericidas muy potentes.

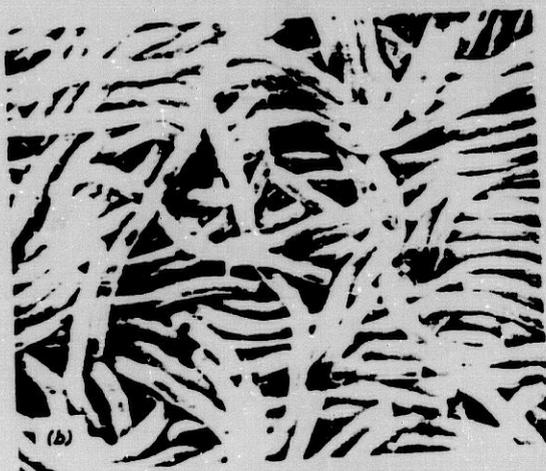


Figura 1.- Fotografías de microscopio electrónico de barrido
(a) Cultivo normal de E. coli; (b) Filamentación de E. coli
producida por adición al medio de cultivo de unas pocas partes
por millón de cis-diclorodiamino-platino(II). Reproducida de la
ref. 8.

Como otros efectos biológicos de los complejos de platino, el fenómeno de la filamentación es dependiente, entre otras condiciones experimentales, de la dosis que en el medio existe del complejo capaz de causarla (figura 2). Esta circunstancia debe contemplarse con prudencia a la hora de valorar la correlación entre la capacidad de un complejo para inducir tal filamentación bacteriana y su potencial actividad antitumoral.

Actividad lisogénica sobre E. coli (bacteriofago- λ).

Otro efecto biológico importante que ejerce el cis-DDP fue descubierto poco después, al investigar su acción sobre cultivos de E. coli previamente infectados con el virus bacteriofago- λ ¹⁷. Estas bacterias lisogénicas, que incorporan la información genética (DNA vírico) a su DNA, manteniéndola inhibida y multiplicándola durante muchas divisiones, desbloquean el genoma vírico por la acción del cis-DDP y, en consecuencia, desarrollan la infección viral hasta sufrir la lisis celular (actividad lisogénica) (figura 3).

Actividad antitumoral

El avance trascendental se produjo cuando en 1968 se ensayaron los complejos de platino, que producían filamentación en cultivos de E. coli y tenían actividad lisogénica frente a la bacteria infectada por el bacteriofago- λ , frente a tumores

standar líquidos (como la leucemia 1210) y sólidos (como el sarcoma 180), en ratones, encontrando que eran activos a dosis del orden de 8 mg/kg de peso de animal² (figura 4). La dosis letal al 50% (LD₅₀) del cis-DDP se había estimado en 13 mg/kg de peso, mientras que 8 mg/kg de peso no resultaba letal. Otras experiencias análogas indicaban que complejos neutros geoméricamente análogos al cis-DDP, eran también activos, mientras sus isómeros trans- resultaban ineficaces^{4, 16}. Una gran cantidad de experiencias sistemáticas de tipo farmacológico (**screening**) llevó a la aprobación del uso clínico del cis-DDP (1979) para el tratamiento de tumores humanos, sobre todo, de tumores de testículos y de ovarios.

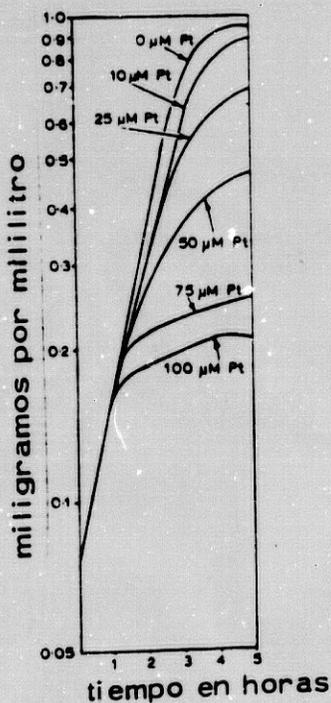


Figura 2.- Crecimiento y filamentación (estimados por turbidimetría) de un cultivo de E coli tratado con cis-DDP (10-100 μM Pt equivalen a 2-20 ppm)^{4, 16}

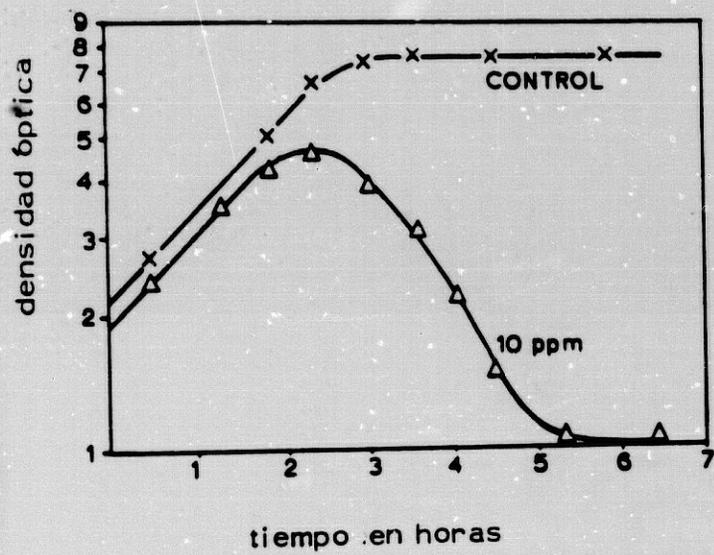


Figura 3.- Curvas de crecimiento de una cepa lisogénica de *E. coli* (bacteriófago- λ) en ausencia y en presencia de cis-DDP⁴⁻¹⁶.

CONTROL



Tratado, a los 8 días, con 8 mg/Kg de $\text{cis-Pt(II)(NH}_3)_2\text{Cl}_2$



Figura 4.- Fotografías periódicas de dos ratones con tumor sólido Sarcoma 180. El ratón (hembra) de arriba (nº 52) pertenece al control negativo (no tratado) y murió el día 21, cuando el tumor pesaba 3 gr. El ratón (hembra) de abajo (nº 61) formaba parte del lote tratado el día 8 con una inyección intraperitoneal de cis-diclorodiaminplatino(II). La regresión de su tumor era completa seis días después y murió casi tres años mas tarde por causas relacionadas con la edad (ref. 18)

Toxicidad y fenómenos de resistencia¹⁹

Los ensayos clínicos con cis-DDP revelaron también efectos secundarios indeseables, entre los que destaca una considerable toxicidad renal aguda, con necrosis de túbulos renales. También se apreció cierta toxicidad sobre la médula osea, el bazo, el oído y el sistema digestivo. De semejantes efectos colaterales no están exentos otros compuestos antitumorales y, en consecuencia, la bibliografía aporta una variada serie de estrategias encaminadas a paliar estos inconvenientes. Así, la toxicidad renal o nefrotoxicidad del cis-DDP, en líneas generales superior a la de otros agentes antitumorales, se compensa en parte con perhidratación del paciente, con administración lenta (sueroterapia) y usando una terapia combinada de éste y otros compuestos anticancerígenos (poliquimioterapia).

Al margen de los problemas de toxicidad, se sabe que determinados pacientes (o sus tumores) desarrollan fenómenos de "resistencia" al tratamiento con cis-DDP, en cierto modo comparables a los fenómenos de resistencia de determinadas cepas bacterianas a los antibióticos. De hecho, la resistencia de un tumor al cis-DDP se relaciona con la capacidad de su células para "reparar" las lesiones que éste le produce en el DNA.

Los problemas de toxicidad y de "resistencia" que plantea el uso del cis-DDP han estimulado al estudio de otros compuestos análogos, aunque por el momento sólo el (ciclobutano-1,1-dicarboxilato) diaminplatino(II) o carboplatino ha sido autorizado, como alternativa clínica del cisplatino, por sus menores efectos colaterales de toxicidad.

I.1. Relaciones estructura-actividad antitumoral en
complejos de platino

La mayor parte de la labor de síntesis, hecha de modo sistemático, tuvo lugar en la década de los años setenta, y su principal objetivo fue establecer unas reglas empíricas sobre las correlaciones estructura-actividad antitumoral. Este trabajo, ciertamente influenciado por los resultados de Rosenberg y otros con clorocomplejos de Pt(II) y Pt(IV), se orientó a la síntesis de series análogas de complejos de platino en las que se sustituían o los ligandos inertes (amoníaco) por otras aminas (alifáticas, aromáticas, alicíclicas) o los ligandos lábiles (cloruro) por otros similares (otros haluros, nitrato, carboxilatos, etc.) en la estructura del complejo tomado como prototipo o término de comparación (las más de las veces, el cis-diclorodiaminplatino(II)). De acuerdo con lo indicado en la introducción de esta memoria, en este tipo de estudios se consideró la introducción de ligandos bidentados quelantes, tanto lábiles (dicarboxilatos, tales como oxalato, malonato, ciclobutano-1,1-diaminociclohexano, etc.). Estas síntesis, planteadas sobre la sólida base que aportaba la conocida química de la coordinación del platino, era seguida de un amplio programa de ensayos biológicos, tanto con cultivos bacterianos y de células de distinta procedencia, como con animales de experimentación (sobre todo ratones) portadores de un tumor standarizado, según diversos protocolos difundidos por el National Cancer Institut (USA).

De los referidos estudios se desprenden las siguientes "reglas empiricas" para la correlación estructura química-actividad antitumoral:

- 1.- Los complejos de platino activos son de geometría plano-cuadrada, con platino(II), u octaédrica, con platino(IV).
- 2.- La actividad antitumoral requiere la presencia de al menos dos ligandos lábiles (tipo cloruro) en cis- y de dos posiciones de coordinación ocupadas por ligandos inertes (tipo amoniaco) también en disposición cis-.
- 3.- Los complejos de Pt(II,IV) (plano-cuadrados, octaédricos) con dos ligandos inertes en trans- son inactivos a las dosis que resultan eficaces sus correspondientes isómeros cis-.
- 4.- La electroneutralidad de los complejos favorece su actividad antitumoral, mientras que complejos análogos cargados suelen ser demasiado tóxicos.
- 5.- La actividad antitumoral de los complejos de platino suele corresponderse con su capacidad para inducir la filamentación en bacilos Gram negativos (como E. coli) a dosis algo inferiores a las terapéuticas, aunque la filamentación no implica siempre actividad antitumoral.

6.- En general, existe mejor correlación entre las propiedades antitumorales y la actividad lisogénica de complejos de platino.

Como para muchas otras generalizaciones de tipo biológico, se conocen excepciones a estas reglas. Con todo, los resultados obtenidos en cada caso deben considerarse con la debida precaución, sobre todo examinando críticamente las "condiciones experimentales" (preparación de disoluciones, electrolitos del medio, administración, dosis, etc.) en que se han obtenido¹².

Actividad antitumoral-reactividad frente al DNA.

Aún desconociéndose los detalles del mecanismo molecular responsable de la actividad antitumoral del cis-DDP y otros complejos de platino, sus efectos biológicos indicaban claramente que su acción estaba esencialmente relacionada con su reactividad con los ácidos nucleicos y, básicamente, con el DNA.

1.- El fenómeno de la filamentación bacteriana a dosis subterapéuticas indicaba el bloqueo de la división celular, aunque no el crecimiento del DNA (único en bacterias) y de otras funciones, como la síntesis de proteínas, etc. Además, cuando se "lavaban" los filamentos bacterianos y se pasaban a un medio de cultivo (libre de complejos de

platino), los filamentos se dividían en bacilos de dimensiones normales, no sólo fragmentándose por sus extremos, sino a lo largo de todo el filamento. Este modo de "regeneración" de la capacidad de división celular establece una interesante diferencia entre el modo de acción de los complejos antitumorales de platino y las mostazas nitrogenadas, cuya filamentación bacteriana sólo se restituye por los extremos.

- 2.- La "actividad lisogénica" de los complejos de platino antitumorales implica su capacidad de desbloquear el DNA vírico incorporado al bacterioma de la célula infectada que estaba en cierto modo velado, desencadenando la invasión vírica y la lisis celular.
- 3.- La "reparación" del DNA es un mecanismo que permite a las células normales protegerse eficazmente de las platinaciones en condiciones a las que se afectan las células tumorales. La capacidad de un tumor para desarrollar mecanismos enzimáticos que reconstruyan el DNA dañado por complejos de platino explica los conocidos fenómenos de "resistencia", al menos en términos simples (reacciones inmunológicas pueden resultar también operativas).
- 4.- Otros efectos biológicos de complejos antitumorales de platino que evidencian su acción a nivel del DNA, propios también de otros agentes antitumorales que actúan sobre esta biomolécula, como los productos alquilantes del tipo

del sulfato de dimetilo, con sus moderadas propiedades mutagénicas y carcinogénicas⁹⁻¹⁹. En efecto, a dosis subterapéuticas, el cis-DDP estimula la aparición de mutantes en cultivos microbianos y celulares y, en tal sentido, induce la producción de células precancerosas, que desarrollan tumores "benignos", que pueden en parte "malignizarse".

Establecida la correlación estrecha entre la reactividad frente al DNA y las propiedades antitumorales (y otros efectos biológicos) del cis-DDP y sus análogos, surgen un buen número de preguntas que, en definitiva, cuestionan ¿hasta qué punto la composición del complejo (ión metálico y su estado de oxidación, ligandos lábiles y/o inertes, configuración o geometría molecular) o de las especies que, en su caso, pueda originar en sistemas biológicos, condicionan su reactividad frente al DNA (y por tanto, su actividad antitumoral, su toxicidad, la resistencia relativa de células sanas y/o tumorales y otros efectos biológicos)?.

Durante bastantes años sólo se disponía de unas ideas básicas, pero muy limitadas, que bosquejaban la(s) respuesta(s) de esta cuestión esencial. Un abrumador acúmulo de informaciones puntuales puede haber desviado muchas miradas del camino que hoy se entiende como más simple y directo¹². Recientemente, los resultados (aún incompletos) más esperanzadores se han producido en torno a un examen minucioso del antagonismo de la reactividad de los isómeros cis- y

trans-DDP frente al DNA. Los resultados obtenidos en este sentido deben racionalizarse sobre las bases inorgánicas y biológicas que condicionan tal reactividad.

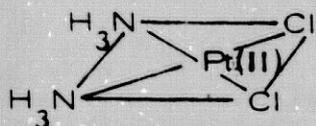
I.2. Bases inorgánicas de las propiedades antitumorales
y otros efectos biológicos de complejos de
Platino^{4.21.22}.

Los efectos biológicos y las propiedades terapéuticas de los complejos de platino pueden explicarse en términos "inorgánicos", siempre teniendo presentes las restricciones que a la química de los iones de este elemento (y de otros) imponen los sistemas biológicos, por sus propias características de temperatura, fuerza iónica y composición de los electrolitos de fondo, el pH y su regulación, la compartimentación celular (permeabilidad de biomembranas), componentes químicos, etc. De los dos estados de oxidación más estables del platino(II y IV) el moderado ambiente reductor de muchos sistemas biológicos favorece la significación biológica del platino(II).

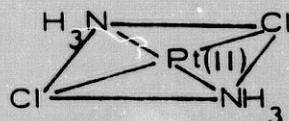
Geometría de los complejos.

La química de la coordinación del platino(II), con configuración electrónica $[Xe] 4f^{14}5d^8$, es una de las mejor conocidas y se caracteriza básicamente por sus complejos plano-cuadrados, diamagnéticos, estables desde el punto de vista termodinámico y con una considerable inercia cinética para procesos de sustitución de ligandos, que permite estudiar con cierto detalle los correspondientes mecanismos de reacción. Aunque se conocen algunos ejemplos con coordinación octaédrica y de pentacoordinación con geometría de bipirámide trigonal, la inmensa mayoría de los complejos de platino(II) son

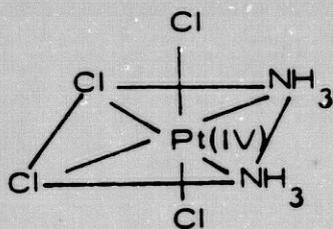
plano-cuadrados, tal como cabe esperar del diagrama de niveles de energía del campo de los ligandos (figura 5). La inercia de los complejos plano-cuadrados de Pt(II) y la inhibición de la coordinación axial respecto de esta geometría se explican por la marcada extensión espacial de sus orbitales 5d (protegidos de la atracción nuclear por el subnivel $4f^{14}$ entre otros electrones internos) y, también, por la gran diferencia energética entre los orbitales $5d_{xy}$ y $5d_{x^2-y^2}$ (vacío). Todos los complejos penta-coordinados de Pt(II), con estructura química conocida, tienen geometría bipiramidal-trigonal, en contraste aparente con la geometría de pirámide tetragonal que se prevee a partir de la figura 5. También en los procesos de sustitución de ligandos en complejos plano-cuadrados de Pt(II) se admite la formación de ligandos de un intermedio pentacoordinado con geometría de pirámide-trigonal, en vez de pirámide tetragonal, de base cuadrada. Esta circunstancia se explica en unos casos por el efecto estabilizante de la geometría de bipirámide trigonal por coordinación de, al menos, un ligando aceptor π , ya que los diagramas de la figura 5 no tienen en cuenta esta contribución.



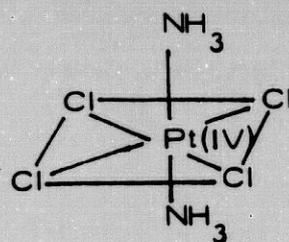
cis-DDP



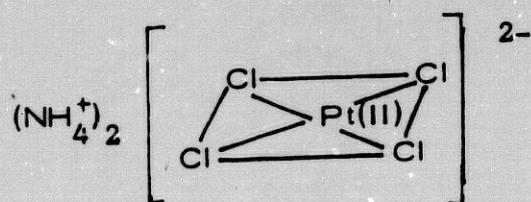
trans-DDP



cis-TDP



trans-TDP



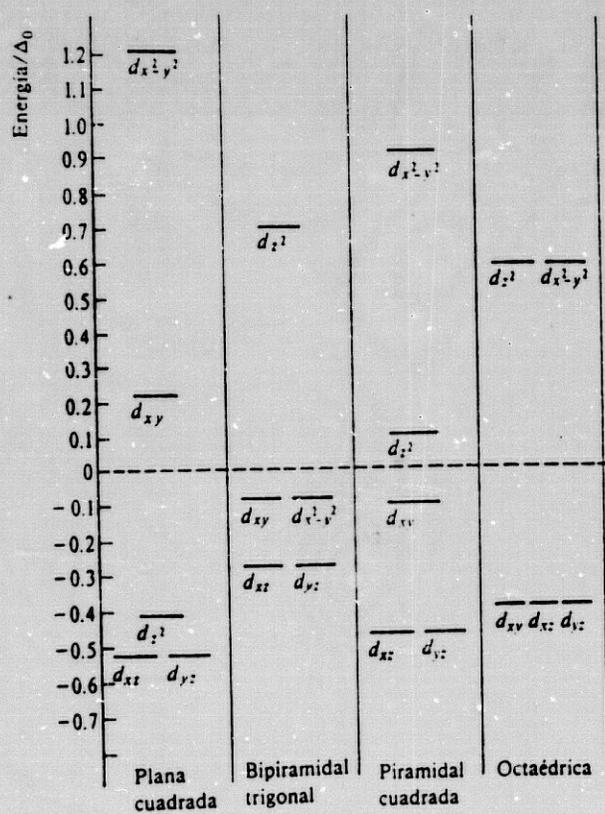
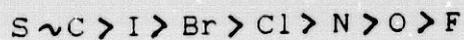


Figura 5.- Diagrama de desdoblamiento de orbitales en complejos de diferentes geometrias.

Afinidades platino-átomos dadores

El platino(II) se coordina con ligandos dadores σ y π y también, con aceptores π . Su comportamiento, en este sentido, lo clasifica como un ión de la clase b de Ahrland o un ácido blando de Pearson, que prefiere coordinarse con átomos dadores voluminosos y polarizables, según la secuencia general:



Así, los sulfuros o tioles ionizados ($R-S^{\ominus}$) y los ticteteres (R_2S) forman complejos de Pt(II) más estables que los correspondientes alcóxidos ($R-O^-$) y los éteres (R_2O). No obstante, la estabilidad de sus complejos con los iones hidrógeno-sulfuro (SH^-) e hidróxido (OH^-) es comparable, y el agua y los alcoholes ($R-OH$) dan complejos de Pt(II) más estables que SH_2 y los tioles ($R-SH$). Estas aparentes anomalías se atribuyen a los efectos de la protonación de los ligandos, que afecta al carácter de base blanda del azufre dador más que a la "dureza" del oxígeno dador.

Ligandos con átomos dadores que tienen la requerida densidad electrónica en orbitales de simetría apropiada pueden actuar como puentes entre dos o más iones platino(II). Así, el ión hidróxido forma μ -hidroxo-complejos de Pt(II) en medios moderadamente básicos o fuertemente alcalinos, dando

hidroxo-puentes inertes, con las consiguientes repercusiones en sistemas biológicos.

Estabilidad termodinámica

La estabilidad de los complejos de platino se corresponde razonablemente bien con lo esperado para el comportamiento de ácido blando de sus iones. La formación de posibles isómeros geométricos cis-, trans- de Platino(II) está controlada cinéticamente, pero generalmente los isómeros trans- son más estables desde el punto de vista termodinámico que los cis-. La transformación cis-trans-DDP tiene $\Delta H^\circ = -3\text{kcal/mol}$.

Los quelatos de platino(II) con anillos de cinco o seis átomos son generalmente más estables que los complejos análogos con ligandos monovalentes, tanto por razones termodinámicas (entrópicas y entálpicas) como cinéticas (formación y apertura de anillos quelato).

Aunque las experiencias "in vitro" e "in vivo" con complejos de Pt(II) ó Pt(IV) no evidencian cambios de estado de oxidación, desde el punto de vista preparativo, en que muchas veces se parte de $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$, los procesos de desproporción de Pt(II) a Pt(0,IV) y las reacciones de adición oxidativa a complejos de Pt(II) para dar complejos de Pt(IV) tienen cierto interés.

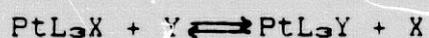
La estabilidad termodinámica de un complejo de platino(II) está relacionada estrechamente con su reactividad frente a una eventual reacción de sustitución de ligandos, por las "influencias cis- y trans-" que, en definitiva, determinan cual será el ligando "saliente", aunque sin informar sobre la velocidad del proceso. A este respecto, se sabe que la "influencia trans-" es siempre más marcada que la cis- y que, para complejos con ligandos dadores- σ , existe una buena correlación entre la "influencia trans-" (o tendencia de un ligando a debilitar el enlace Pt-ligando en disposición trans-) y el denominado "efecto cinético trans" o efecto trans-labilizante (correspondencia que no se observa con ligandos π -enlazantes). La citada correlación hace que con frecuencia las "influencias cis/trans" sean referidas como "efectos termodinámicos cis/trans", con el consiguiente riesgo de inducir a confusión.

Cinética de las reacciones de sustitución

Los aspectos cinéticos de los complejos de platino, sobre todo de los plano-cuadrados de Pt(II), tienen una gran repercusión sobre su comportamiento general en sistemas biológicos y, en particular, sobre el mecanismo de sus reacciones con DNA.

Los complejos de platino(II) pueden dar reacciones de sustitución de ligandos por ataque nucleofílico (dada la carga positiva del metal) o electrofílico (por la considerable

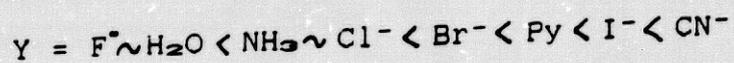
densidad electrónica del centro metálico). Las tres características más notables de tales procesos son, la moderada o considerable inercia con que ocurren, la retención de la configuración cis-trans y el mecanismo asociativo con que tienden preferentemente a producirse a través de un intermedio pentacoordinado (que se supone con geometría de bipirámide trigonal). En general la reacción de sustitución



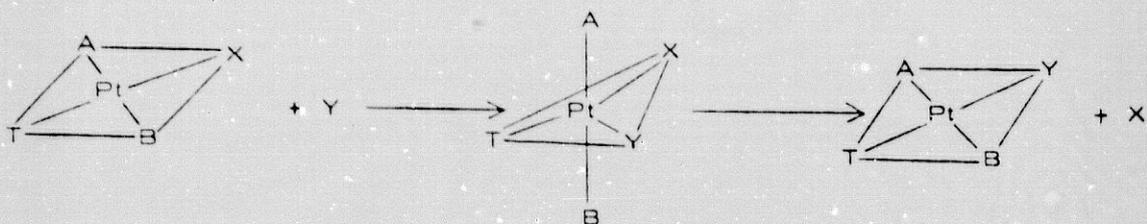
donde X e Y son los ligandos saliente y entrante, respectivamente, siguen una ley de velocidad

$$v = (K_1 + K_2[\text{Y}]) (\text{complejo}) \text{ con } K_2 \gg K_1$$

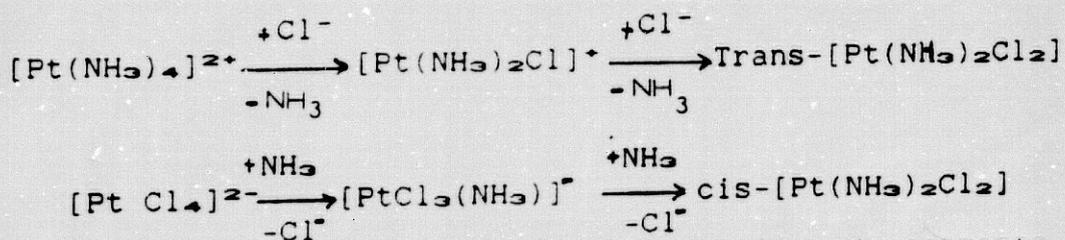
K_1 es la velocidad específica que refleja la contribución de un mecanismo solvolítico y depende del disolvente; K_2 es la constante de velocidad de segundo orden propia de un proceso de sustitución bimolecular y depende de la naturaleza del ligando entrante Y, según la secuencia general



que se conoce como "secuencia de nucleofilicidad". Semejante orden de ligandos se ha establecido en base al "efecto trans-labilizante" de ligandos T, indicativo de la mayor o menor velocidad con que será sustituido el grupo saliente X (en trans respecto a T) por el ligando entrante Y



Como consecuencia del efecto trans-labilizante, se tienen las siguientes reacciones de interés preparativo:



donde se refleja que el ion Cl^- dirige al ligando entrante a la posición trans mejor que lo hace el amoníaco, a pesar de ser el Cl^- mejor grupo saliente (ligando más lábil) que el amoníaco.

Las relaciones entre propiedades de los ligandos y su capacidad de producir el efecto trans no son simples, pero en general un ligando T ejerce mejor efecto cuanto mayor es su carácter de base blanda y de aceptor- π , y cuanto menor es su capacidad de dador- σ .

Estas y otras consideraciones generales de la química de la coordinación aportan las nociones químicas inorgánicas

que posibilitan un entendimiento del mecanismo de los efectos biológicos de los complejos de platino, sin más que considerarlas en conjunción con las bases biológicas de los sistemas en que deben actuar.

I.3. Bases biológicas de la actividad de complejos de platino:
Estructura y propiedades del DNA~~23-26~~.

Los ácidos desoxirribonucleicos son las macromoléculas de la herencia que contienen el código genético en las células de la mayor parte de los seres vivos. Las células procariotas (sin membrana nuclear, como las bacterias) tienen sólo una enorme molécula de DNA, con repeticiones de su código genético. En las células eucariotas (con membrana nuclear) el ordenamiento estructural del material genético es bastante más sofisticado y forma parte de los cromosomas. En estas células existe también DNA extranuclear, de bastante menor envergadura, generalmente en formas circulares superenrolladas, que se denominan plásmidos o plasmidios.

Esqueleto molecular

Básicamente, una molécula de DNA consiste en la asociación de dos cadenas complementarias de desoxirribonucleótidos. Cada una de estas cadenas consta de una secuencia de desoxirribonucleótidos que han condensado en un esqueleto externo de unidades desoxi-ribosa-fosfodiéster, donde cada molécula 2'-desoxirribosa se une por C-1' a una base púrica (Adenina o Guanina) por N-9 ó a una base pirimidínica (Timina o Citosina) por N-1. La complementariedad de las dos cadenas de una molécula de DNA resulta de la asociación emparejada de bases complementarias púrica-pirimidínica (A-T,

G-C) en la región interna del esqueleto de unidades d-ribosa-fosfodiéster. Por tanto, una cadena DNA consta de una serie de 2'-desoxi-ribonucleósidos, unidos por puentes 3',5'-fosfodiéster. Cada desoxi-ribonucleótido se une a través del hidroxilo-3' de su resto desoxi-ribosa al 5'-fosfato del siguiente desoxi-ribonucleótido, formándose el puente 3',5'-fosfodiéster y, por repetición, la cadena fosfato-5'-d-ribonucleósido-3'-fosfato-5'-ribonucleósido...., que avanza en el sentido 5'→3'. Una molécula de DNA resulta de la asociación de dos de estas cadenas complementarias (en la secuencia de sus bases), antiparalelas (en el sentido de su desarrollo)* y en una doble hélice con arrollamiento plectonémico, (es decir, que no permite separar las cadenas sin antes desenrollarlas).

Niveles estructurales del DNA

En un sentido práctico, las moléculas de DNA adoptan varios niveles de ordenamiento estructural que conviene distinguir.

La descripción 5'→3' ó 3'→5' de una cadena de DNA es arbitraria, pero la asociación de dos cadenas se hace de forma antiparalela, de manera que si una tiene el grupo fosfato-5' en un extremo, la otra tiene el grupo fosfato-3' en ese mismo extremo.

La "estructura primaria", que viene dada por la secuencia de bases. La "estructura secundaria", que corresponde a la asociación de sus dos cadenas complementarias y antiparalelas, en arrollamiento plectonémico. La "estructura terciaria", o "superenrollamiento", que se da en las superhélices del DNA circular o plasmidios de células eucariotas o en el DNA de microorganismos (células procariotas). Este ordenamiento, de enorme significación biológica²⁴, proporciona un mecanismo de "compresión" que permite acomodar una molécula de 1.4 mm de longitud (aproximada) en una célula de alrededor de $1 \times 3 \mu\text{m}$ (E.coli). La "estructura cuaternaria" corresponde al ordenamiento estructural que, por ejemplo, se da en el DNA del núcleo de células eucariotas, donde determinados fragmentos de la doble hélice se asocian con 8 proteínas básicas (ricas en lisina) llamadas "histonas", dando lugar a los nucleosomas, que se repiten a lo largo del DNA como las "cuentas" de un rosario o las "perlas" de un collar. En células procariotas la molécula de DNA (única) se envuelve de proteínas en estructuras "nucleosómicas", procariotas. En las eucariotas, la asociación de otras proteínas al DNA nucleosómico da lugar a la cromatina y, después, a los cromosomas.

Poliformismo estructural del DNA⁹⁻¹⁰⁻²³

La estructura tridimensional de una molécula de DNA es sensible a múltiples factores, sobre todo a la conformación

que adoptan los restos de 2'-desoxiribosa, a la secuencia de las bases y a factores externos, entre los que figuran la salinidad, la temperatura y el pH del medio. Otros factores que afectan al ordenamiento estructural del DNA son las interacciones con proteínas y con iones metálicos. Estas circunstancias determinan un marcado poliformismo estructural, del que se tiene un conocimiento razonablemente preciso. Las citas resumen las características de las formas A y B más representativas, ambas dextrógiras (α -hélices) y en las ref. 25 y 30 se dan datos de otras formas (C,D,Z) de DNA.⁹⁻¹⁰

La más frecuente es la forma B, que corresponde a la conocida estructura en α -hélice de Watson y Crick y requiere que los restos de desoxi-ribosa adopten la conformación C-2'-endo*. En ella los pares de bases complementarias se asocian en el interior de la α -hélice en forma coplanar y con sus planos perpendiculares al eje de la α -hélice. Los planos de sucesivos pares de bases complementarias resultan superpuestos a una distancia de 3,4 Å, de modo que los diez restos por cadena que contiene una vuelta dan un espaciado/vuelta de 34 Å. Se generan así dos tipos de ranuras, el llamado surco helicoidal (o ranura mayor) de 11,7 Å y la ranura menor de 5,7 Å. Esta conformación hace más accesible el ataque químico a nivel del surco helicoidal, en las posiciones N-7 y O-6 (N-6) de las bases púricas Guanina (Adenina) y las posiciones O-4(N-4) de las bases pirimidínicas Timina (Citosina)⁹⁻¹⁰.

*Por convenio, la conformación C-2'endo (o C-3'endo) representa la desviación del átomo C-2' (o C-3') de d-ribosa hacia el mismo lado que la base unida a C-1 o el fosfato unido a C-5', todo ello respecto al plano definido por C-4' ó C-1'.

La forma A surge a partir de la B, con el cambio conformacional de la desoxiribosa de C-2'endo a C-3'endo, con las consiguientes alteraciones de los parámetros de la α -hélice, que ahora tiene 11 restos por vuelta, de 28 Å de espaciado, y unas dimensiones de amplitud variable para el surco helicoidal (10-20 Å) y de ranura menor (~ 10 Å). Los pares de bases dejan de ser coplanares y mantienen una inclinación de unos 20° respecto al eje de la α -hélice. La forma A es más vulnerable a diversos ataques químicos que la B. Las otras formas estructurales del DNA (C,D,Z) son conocidas con menor detalle y, en concreto, la forma Z surge en situaciones de elevada salinidad del medio y requiere la repetición de la secuencia d(G-C)¹².

Funciones biológicas

Por lo que respecta a los efectos que producen las "platinaciones" en el DNA y sus consecuencias biológicas, interesa recordar que esta macromolécula desempeña su papel de "molécula de la herencia", implicada, a grandes rasgos, en tres funciones biológicas esenciales. La "replicación" que, previa separación de parte de sus cadenas y por un conocido mecanismo de "cremallera" controlado por las DNA-polimerasas, permite la duplicación del DNA por biosíntesis de las cadenas complementarias a cada una de las constituyentes de la molécula precursora. La "transcripción" o copia de una sola cadena del DNA (por fragmentos) para dar RNA-mensajero, proceso controlado

por las RNA-polimerasas, y la "reparación" o reconstitución del DNA, importante proceso que protege la integridad del DNA, que puede haberse lesionado por distintos caminos. En esta delicada función intervienen las enzimas DNA-polimerasas y DNA-ligasas.

Propiedades físico-químicas²²

Algunas propiedades físico-químicas del DNA tienen un notable interés para los estudios "in vitro" de su interacción con iones metálicos o sus complejos. Entre ellas destaca, como indicativo de la desestabilización del DNA, la llamada "desnaturalización" que corresponde a la separación de sus cadenas por rotura de sus enlaces de hidrógeno y de las uniones por otras fuerzas intermoleculares. La desnaturalización puede ser parcial o total y se logra por calentamiento de una suspensión de DNA. La renaturalización es siempre lenta y sólo resulta posible cuando la desnaturalización parcial deja al menos un tramo continuo de 12 pares de bases. Si la separación de las dos cadenas de una molécula de DNA (nativo) ha sido completa, la renaturalización es imposible, pero suele dar lugar a una falsa renaturalización, en que determinados fragmentos de una cadena se arrollan sobre sí mismos.

La desnaturalización del DNA se conoce comúnmente como "fusión", ya que se acompaña de un importante descenso de la viscosidad del medio (entre otras cosas). El "punto de fusión" o "temperatura de melting (T_m)" es, entonces, la temperatura a la que se alcanza estadísticamente el 50% de

desnaturalización (lo que no debe confundirse con la completa separación de las dos cadenas en la mitad de las moléculas). Tanto la "curva" de fusión* como el valor T_m (de la inflexión) son características de cada tipo de DNA. El punto de fusión del DNA guarda cierta correspondencia directa con el contenido de pares de bases G-C (siempre que se trate de suspensiones de DNA con igual pH y fuerza iónica del medio). Esta constante es, además, muy sensible a las interacciones del DNA con iones metálicos, complejos y otras moléculas.

* La "amplitud" de estas curvas se define convencionalmente como el rango de temperatura que corresponde a una desnaturalización (2σ) del 15,8 al 84,2%.

Otra propiedad fisico-química que muestra interesantes cambios con la desnaturalización total o parcial del DNA es la llamada comunmente "cromicidad". Se conoce desde hace tiempo que la rotura de los enlaces de hidrógeno y otras uniones intermoleculares, que implica la desnaturalización del DNA, se traduce en un aumento del 20 al 60% de su absorbancia de luz UV a 260nm, respecto a la absorbancia del DNA nativo a igual concentración. Se ha encontrado, en condiciones fisico-químicas estrictamente comparables, una buena correlación entre la hipercromicidad debida a la desnaturalización y el porcentaje de pares A-T de DNAs de distinta procedencia. También las medidas de absorbancia a 260 nm en función de la temperatura se utilizan convencionalmente como método para obtener las "curvas de fusión" del DNA.

Sobre la base de esta propiedad espectral, INAGAKI y KINDANI²⁷ han desarrollado un método de espectrofotometría diferencial ultravioleta para el estudio del modo de interacción de complejos de platino con DNA. El método está fundamentado en que las bandas a 270 nm y 295 nm que se observan en estos espectros diferenciales de UV, de DNA tratado con un complejo respecto al DNA nativo, se deben a un cambio en la estructura secundaria del DNA y a un cambio en la distribución de la densidad electrónica de las bases del ácido nucleico. En este sentido, entre sus resultados concluyen que la relación de absorbancias (diferenciales) A_{270} / A_{290} puede usarse como una medida del efecto sobre la estructura

secundaria del DNA debido a la platinación de sus bases. Este parámetro alcanza valores del orden de 2 para complejos de platino con reconocida actividad antitumoral, como cis-DDP, mientras que ronda el valor de la unidad para complejos de platino análogos que no tienen propiedades antitumorales, como trans-DDP.

I.4. Modos de reacción de complejos de platino con el DNA:

Estado actual.

La complejidad estructural del DNA se refleja, por supuesto, en sus múltiples posibilidades de interaccionar o reaccionar con iones metálicos y complejos⁶⁻¹². En este sentido, el prof. Stephen J. LIPPARD ha señalado que "el DNA es posiblemente el ligando polidentado más complicado entre los investigados por los químicos de la coordinación"¹².

En el estudio de los modos de reacción de complejos antitumorales de platino (y de otros metales) con DNA, se han llevado a cabo una enorme serie de experiencias "in vitro" e "in vivo", generalmente por equipos de investigación multidisciplinarios.

La interacción de complejos antitumorales de platino (y análogos) con DNA nativo "in vitro" produce, en líneas generales, una disminución de la temperatura de fusión o T_m (a la que se produce el 50% de "desnaturalización"), un aumento de la cromicidad a 260nm (efecto hiperocrómico) y, por lo tanto, una disminución de la "cromicidad por desnaturalización térmica" del DNA previamente platinado. Otras consecuencias son un ligero efecto batocrómico (aumentando λ_{max} unos cuantos nanómetros) y una disminución de la viscosidad^{9,10}. Todos estos fenómenos se aprecian siempre a dosis muy bajas, que

convencionalmente se expresan por "r", la relación de platino (o de complejo) por base (o nucleótico) del DNA (normalmente con $r < 0.05$)¹⁰. Se trata, por consiguiente, de compuestos activos o muy efectivos¹⁹⁻²⁰. Sin embargo, sus reacciones son siempre lentas, debiendo registrarse los efectos a distintas horas, ya que los "efectos" más marcados resultan a las 6, 12 o más horas de reacción⁹⁻¹⁰. Además, estos efectos son dependientes de la concentración ("r") hasta tal extremo que pueden tener signo contrario cuando el complejo se adiciona a dosis bajas o muy bajas¹⁰. En cualquier caso, los "efectos" comunmente observados se explican en conjunto como debidos a una desestabilización estructural del DNA, sobre todo a nivel de la estructura secundaria.

Especies activas de los complejos de platino frente al DNA²²⁻²⁹

En la reactividad "in vitro" e "in vivo" de un complejo de platino con el DNA existen otros factores de suma importancia (al margen de su propia estructura) que determinan las especies activas. Se trata, en esencia, de sus posibles reacciones con el disolvente y con otros componentes del medio. En este sentido, las reacciones de hidrólisis desempeñan un papel destacado en medios acuosos, entre los que figuran el plasma y la sangre o los fluidos intracelulares. A este respecto, la química de los complejos de platino en medio acuoso viene determinada, sobre todo, por reacciones de hidrólisis (como la sustitución de cloruro por agua), de disociación de

acuocomplejos (para dar hidroxocomplejos) y de oligomerización (sobre todo por formación de μ -hidroxocomplejos dimeros o trimeros, con ligandos hidroxopuente)²².

Existe una abundante información sobre la química en medio acuoso de varios complejos de platino(II), entre los que figuran, por supuesto, cis- y trans-DDP.

En la química acuosa de cloro-complejos de platino(II) debe tenerse presente que el ion cloruro es siempre un grupo saliente mejor que el amoníaco, pese a que éste ejerce un efecto trans-labilizante más efectivo. Así, los isómeros cis- y trans-DDP, que se hidrolizan de acuerdo con el esquema de la figura 6, con retención de su estereoisomeria, producen, como primer producto, las especies cis- y trans- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$, más bien que los correspondientes isómeros $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, cis- y trans-dicloro.

Se conocen con bastante precisión las constantes de los equilibrios de hidrólisis (sustitución de Cl por H_2O) y los pKa de las acuo-cloro, acuo-hidroxo y diacuo-especies que se producen en medios acuosos a partir de cis- o trans-DDP y de algunos complejos análogos. Estos datos permiten construir los diagramas de distribución de especies en el sistema, donde se ilustran los efectos de dos importantes variables, el pH y la concentración de Cl (fig. 7). Así, por ejemplo, los diagramas de distribución de cis- o trans-DDP a la concentración de Cl del plasma sanguíneo (103 mM) o del interior de las células (4 mM)

y para distintos valores del pH, revelan que a pH fisiológico (pH=7.2 a 7.4) las especies predominantes en el plasma son las dicloro- e hidroxocloro-diaminplatino(II), ambas eléctricamente neutras. En el interior de las células, además de las especies no cargadas clorohidroxido-, dicloro- y dihidroxo-diaminplatino(II), existen cantidades significativas de las formas catiónicas acuohidroxido- y acuocloro-diaminplatino(II), que deben ser más reactivas.

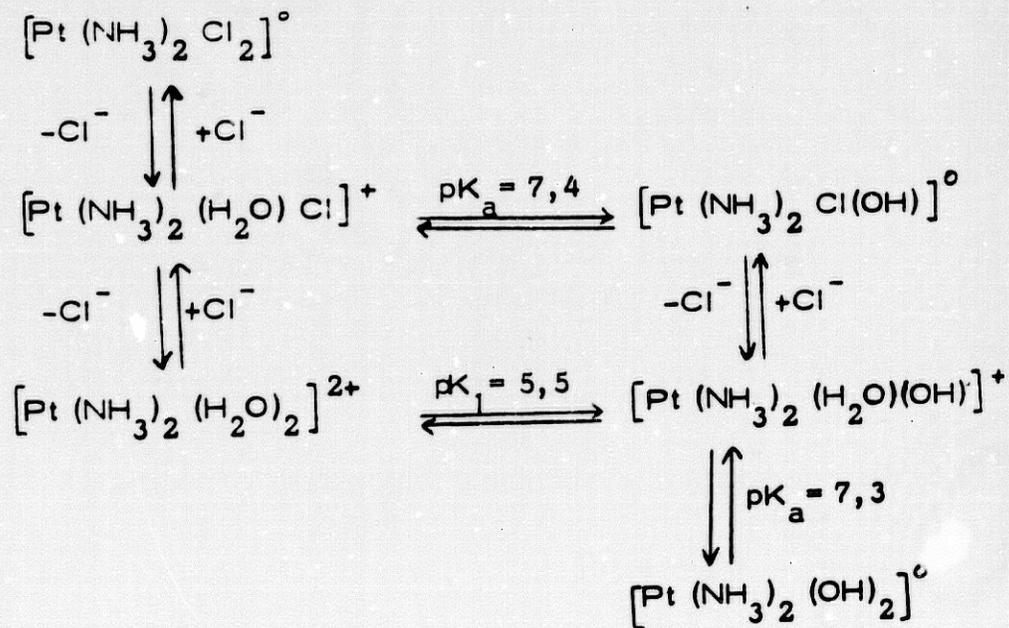
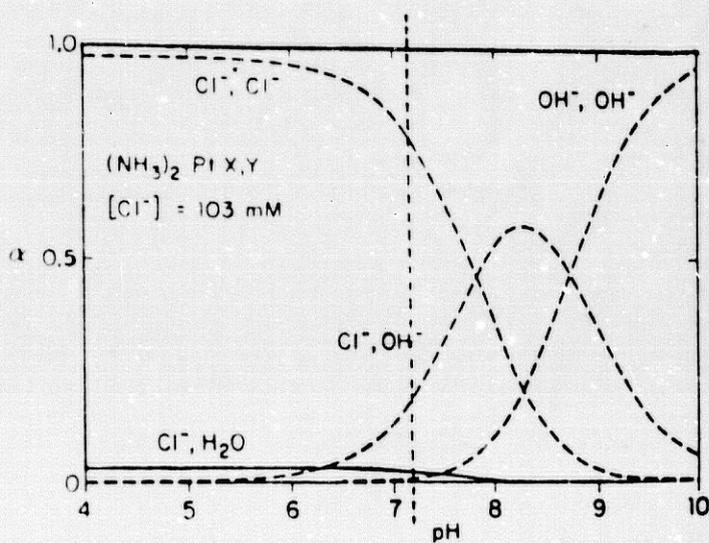


Figura 6.- Esquema general de hidrólisis de cis- y trans-DDP

PLASMA
SANGUINEO



INTERIOR
CELULA

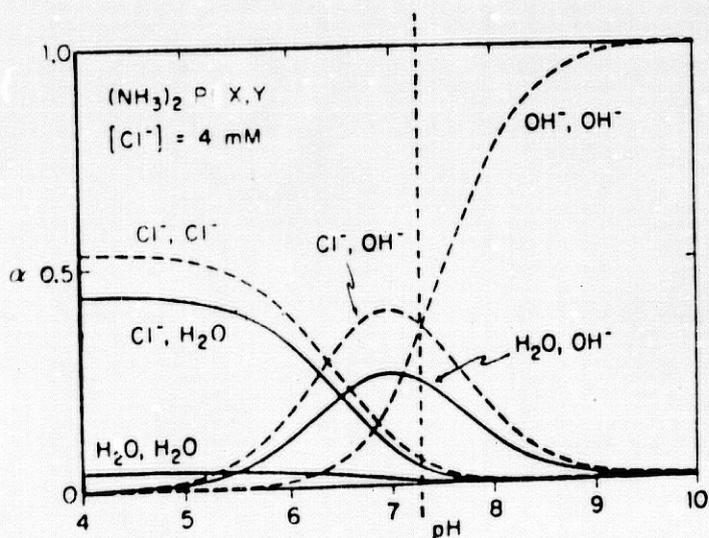


Figura 7.- Diagrama de distribución de especies en la hidrólisis de DDP, en plasma sanguíneo y en el interior de las células.

Estos resultados revelan, en general, que el ion cloruro inhibe de forma eficaz los procesos hidrolíticos de cis- y trans-dicloro-complejos de platino(II) en medios como el plasma sanguíneo, desde donde las especies no cargadas deben difundir con facilidad, a través de las membranas biológicas, al interior de las células. En medios intracelulares, las especies cargadas deben ser las formas más activas ya que, además de su carga positiva, tienen al menos una molécula de agua que se comporta como un excelente grupo saliente. Por el contrario, los grupos hidroxilo no son buenos ligandos salientes y, de hecho, sólo se sustituyen con facilidad tras protonarse para dar sus correspondientes acuo-complejos.

Existe, además, una complicación adicional debida a que el ion hidróxido unido a platino(II) es un buen nucleófilo y puede actuar como grupo-puente, dando dimeros y trimeros que, en bastantes casos, se han podido cristalizar y caracterizar estructuralmente por difracción de rayos X. También los espectros RMN de Pt-195 revelan la formación de un dmero y un trimero en la hidrólisis de bis(nitrato) (trans-1-2-diaminociclohexano) platino(II), $[\text{Pt}(\text{dach})(\text{NO}_2)_2]$, que han sido aislados y caracterizados (figura 8). Este tipo de μ -hidroxocomplejos de platino son relativamente estables frente a la protonación y, por tanto, aún más inertes que los hidroxocomplejos monómeros. Por su considerable carga iónica y por su extraordinaria inercia química, se les hace responsables de la nefrotoxicidad del cis-DDP (y complejos análogos), el mayor inconveniente que plantea su uso clínico.

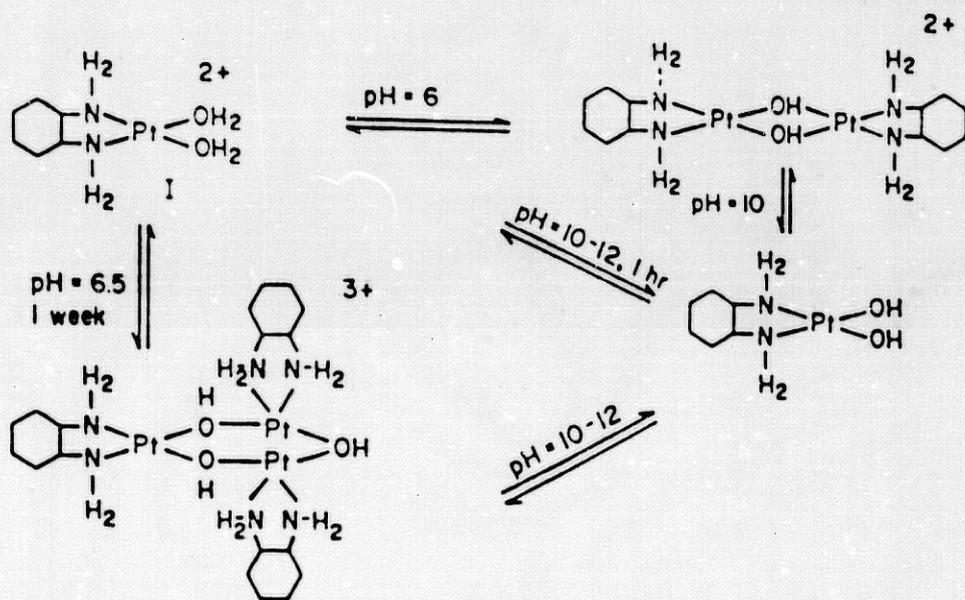


Figura 8.- Oligamerización de hidroxocomplejos en la hidrólisis de $[\text{Pt}(\text{trans-dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$.
 Dach = 1,2-diaminociclohexano.

Mecanismos de acción de cis-DDP y trans-DDP frente al
DNA.

El hecho de que ambos isómeros cis- y trans-DDP experimenten el mismo esquema hidrolítico (conservando su estereoquímica cis/trans), no implica que las especies "acuó" e "hidroxo" resultantes sean igualmente activas o inertes. Existe una abundante evidencia experimental, "in vitro" e "in vivo", que revela sustanciales diferencias cuantitativas y cualitativas en la reactividad de ambos complejos o de sus productos de hidrólisis. En una experiencia típica se seguía la incorporación de los derivados tritiados ^3H -Leucina, ^3H -Uridina y ^3H -Timidina como indicativos de la capacidad de síntesis de proteínas, de RNA (transcripción) y de DNA (replicación), respectivamente, en un cultivo de células amnióticas humanas (figura 9). La presencia de $5.0 \mu\text{M}$ de cis-DDP en el medio puso de manifiesto una efectiva inhibición de la replicación a las pocas horas, mientras que la síntesis protéica o de RNA no se afectaba significativamente (hasta bastante después). En otra experiencia representativa se pone de relieve que el porcentaje de inhibición de la replicación del DNA del virus (SV40) en células renales de mono por acción de cis-DDP y trans-DDP (figura 10) depende de la concentración de complejo de platino en el medio, siendo mucho más efectivo el cis-DDP, que detiene la acción de las DNA-polimerasas por completo a concentraciones del orden de $50 \mu\text{M}$. A dosis mayores ambos isómeros llegan a inhibir la replicación, la transcripción y la síntesis protéica.

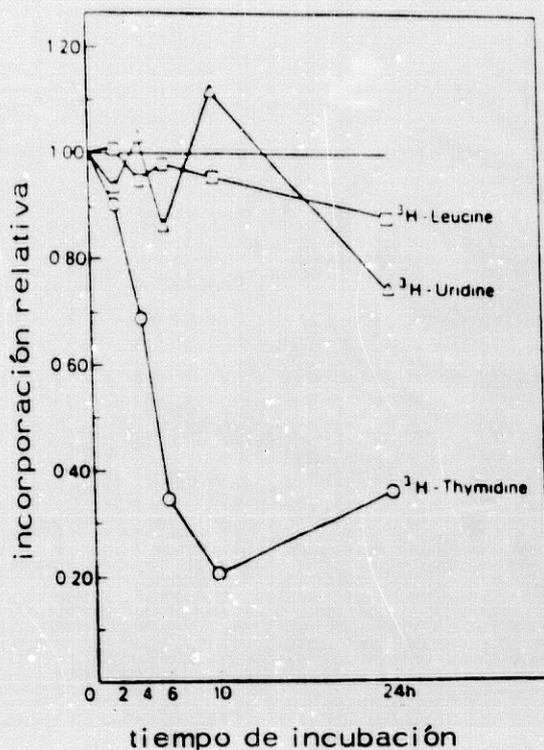


Figura 9.- Efectos de incubación del cis-DDP ($5 \times 10^{-6} M$) en cultivo de células amnióticas humanas¹⁸.

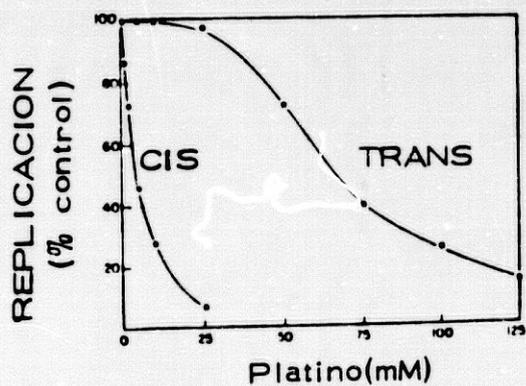


Figura 10.- Inhibición (%) de replicación del DNA viral por acción de cis- y trans-DDP a distintas concentraciones (DNA viral SV40 en células renales de mono)¹²

La diferente eficacia biológica del cis- y trans-DDP debe tener su origen en su distinta capacidad para reaccionar con el DNA y, por tanto, en el desigual modo en que sus correspondientes "especies activas" interaccionen con los grupos funcionales del DNA como ligando. A este respecto, se admite con carácter general que los puentes, 3'-5'-fosfodiéster del esqueleto externo del DNA, por su polaridad negativa, ejercen una atracción electrostática sobre las especies catiónicas complejas de platino, si bien después, por ser un ligando incluso más lábil o saliente que el agua, cede fácilmente los restos $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ (o análogos) a otros grupos dadores del DNA (o al medio intracelular). También los oxígenos del resto de d-ribosa son lábiles y, de ellos, los oxígenos O-3' y O-5' sólo pueden coordinarse con impedimento estérico.

A pH neutro o fisiológico (7,2-7,4) las bases nitrogenadas del DNA aportan los grupos coordinantes más apropiados. Numerosísimos estudios con compuestos modelo que van desde las bases Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) y Citosina (C) o derivados sencillos hasta oligo- y plinucleótidos de cadena simple o doble, con platino(II) y con otros iones metálicos, han aportado una abundante información de reactividad y estructural, que revela unas marcadas tendencias preferenciales. Salvo circunstancias particulares, las posiciones de coordinación preferentes de las bases de DNA son los átomos de nitrógeno N-7 de las bases púricas (A y G) y los N-3 de las bases pirimidínicas (T y C), aunque también existen otros átomos o grupos con opción a la coordinación, como son el N-1 de A y G y el O-6 de ésta última ⁷⁻¹⁰.

Una observación importante es la secuencia de nucleofilicidad establecida para los nucleósidos-5-monofosfato, donde las posiciones más avanzadas corresponden a la Guanosina-monofosfato (GMP) y adenosina-monofosfato, en este orden, seguidas de lejos por CMP y más aún por TMP. Esta secuencia acentúa más, si cabe, la afinidad entre restos como $\text{cis-}[\text{Pt(II)(NH}_3)_2]^{+2}$ y los átomos N-7 de G y A.

Como consecuencia de los estudios de compuestos modelo, se han postulado una serie de posibles modelos de interacción cis-DDP-DNA, razonablemente aceptables para compuestos análogos.

- 1.- Quelación "N-7-0-6" con una misma Guanina. Este modo es compatible con la preferencia de cis-DDP y complejos análogos por DNA rico en pares de bases complementarias G-C. Este tipo de quelación ha sido varias veces sugerido en base a propiedades (más que estructuras) de compuestos modelo, aunque los resultados cristalográficos de más de diez complejos de platino conteniendo guanina no aportan el deseado apoyo experimental. e. 10

- 2.- Quelación-puente inter-cadenas. Este modo de unión se supuso inicialmente entre grupos amino N-6 de Adeninas de distinta cadena del DNA (suficientemente próximas), aunque no encontró evidencia experimental en compuestos modelo. Se sabe, sin embargo, que una pequeñísima fracción de las "platinaciones" del DNA son puentes intercadenas que se supusieron responsables de la inhibición de la replicación, hipótesis que cada vez resulta más difícil de mantener. Otros compuestos modelo, del tipo cis- o trans-[Pt(NH₃)₂GC]²⁺ (donde G y C indican, en tal caso, guanina y citosina con sus nitógenos N-9 y N-1, respectivamente, bloqueados por metilo o etilo, en vez de d-ribosa) sugieren que tales puentes pueden formarse entre N-7 de G y N-3 de C, siendo además previsible que la perturbación estructural del DNA causada por el resto cis-[Pt(NH₃)₂]²⁺ sea considerablemente más significativa que la debida a la correspondiente forma trans. De hecho, en todos los complejos tipo cis-[Pt(NH₃)₂AB] de estructura conocida, las bases A y B

forman siempre grandes ángulos diedros, mientras que las bases en el catión $\text{trans-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{GC}]^{2+}$ son coplanares.

3.- Quelación-puente intra-cadena. Este tipo de platinaciones puede llevarse a cabo particularmente implicando a los átomos N-7 de dos bases púricas (guanina y/o adenina) adyacentes en la misma cadena del DNA. El atractivo de este tipo de interacción reside, entre todo, en que sólo puede llevarse a cabo por la forma $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, y no por la trans . Además, es evidente que la quelación-puente intra-cadena de una agrupación $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ como ésta requiere grandes ángulos diedros entre las bases implicadas, por lo que causará una gran perturbación estructural del DNA. Interesantes estudios de compuestos modelo, que se comentan más adelante, apoyan este modo de interacción como la principal lesión que los complejos antitumorales de platino causan sobre el DNA.

Existen otros posibles modos, como la unión monovalente (Pt-base) o las uniones puente DNA-Pt-proteína que, si bien deben afectar menos a la estructura del DNA, muy posiblemente ocurran como etapas iniciales de la reacción de $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ y sus analogos con DNA. Datos obtenidos en el análisis de los productos de hidrólisis enzimática de DNA tratado con cis- y $\text{trans-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, "in vitro" e "in vivo", apoyan estas ideas. En la Tabla I se resume la información deducida de ensayos de hidrólisis enzimática (por nucleasas) del DNA "platinado" con cis- o $\text{trans-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ y

posterior purificación cromatográfica (HPLC) de los aductos cis- o trans-diamin-platino(II) con diversos desoxiribonucleótidos, que se caracterizan por RMN.

Los datos de la Tabla I revelan que el isómero activo cis-DDP forma abundantes aductos por quelación intra-cadena, dando puentes de tipo-1,2 con el fragmento cis-diaminplatino(II) quelando a dos guaninas adyacentes o a una base adenina y otra guanina, también adyacentes, en secuencias de (ApG), de la misma cadena polinucleotídica, siendo mucho menos frecuentes otras formas de platinación, como las quelaciones-puente intra-cadena de rango superior (puentes tipo-1.3 y otras), las quelaciones inter-cadena, las platinaciones monofuncionales o los puentes DNA-proteína. Por razones estéricas, el isómero inactivo trans-DDP no puede formar puentes intra-cadena de tipo-1,2, con el fragmento trans-diaminplatino(II) quelando a dos bases adyacentes, aunque si origina puentes tipo -1,3 sobre secuencias de (GpNpGpNpG), quelándose a dos guaninas dejando un nucleótido interpuesto N (adenina, citosina o timina). Además, el isómero trans-DDP origina quelaciones puente inter-cadena y uniones puente DNA-proteína con mayor profusión que el cis-DDP.

Los referidos estudios "cartográficos" de DNA "platinado" con cis-DDP revelan una clara preferencia del isómero activo para actuar sobre secuencias con dos o más restos de guanosina adyacentes, de la misma cadena del DNA.

Las correspondientes quelaciones-puente tipo-1,2, de corto rango, se consideran responsables del desenrollamiento que promueve el cis-DDP sobre el DNA superenrollado, ya que tal fenómeno es independiente de la presencia del bromuro de etidio (como agente de intercalación). En contraste, la acción del bromuro de etidio inhibe el acortamiento de la doble hélice del DNA por reacción con cis-DDP, por lo que se piensa que tal acortamiento está asociado a la formación de otras uniones cis-Pt(NH₃)₂-DNA de rango mayor, como los puentes tipo-1,3.

Tabla 1.- Analogías y diferencias en la reacción de cis- y trans-DDP con DNA, deducidas por análisis de los "aductos" producidos por hidrólisis enzimática del DNA "platinado"¹².

CIS-DDP

"IN VITRO"	[- QUELACION-PUENTE <u>INTRA-CADENA</u> : <u>PUENTES TIPO-1,2</u>	
		CON FRAGMENTOS d(GpG)	65%
		d(ApG)	25%
		- QUELACION-PUENTE <u>INTRA-CADENA</u> DE RANGO MAYOR <u>PUENTES TIPO,1,3 CON d(GpNpG) Y OTROS</u>	
		- QUELACION-PUENTE <u>INTER-CADENAS</u>	10%
		- COORDINACION MONOFUNCIONAL	
		- UNION PUENTE DNA-PROTEINA	
"IN VIVO"	[- QUELACION-PUENTE <u>INTRA-CADENA</u> SOBRE d(GpG)	35%
		- QUELACION-PUENTE <u>INTER-CADENA</u>	0.2%
		- UNION PUENTE DNA-PROTEINA	0.2%

TRANS-DLP

-QUELACION PUENTE INTER-CADENA Mejor que cis-DDP
-UNION-PUENTE DNA-PROTEINA

-QUELACION PUENTE INTRA-CADENA:
 PUENTES TIPO-1,2 Imposibles
 PUENTES TIPO-1,3 Abundantes, sobre
 d(GpNpGpNpG) con
 N=A,C,o T.

La diferenciación que revelan los hechos citados y otros estudios respecto al modo de unión de cis- y trans-DDP sobre DNA (y RNA) no han podido confirmarse directamente por resultados cristalográficos con ácidos nucleicos platinados, aunque se tiene cierta evidencia de tres posiciones de unión monofuncional de cis-DDP en cristales de un dodecamero "duplex" con estructura de tipo DNA-B, todas ellas localizadas en la ranura mayor y próximas a nucleosidos guanosina. No obstante, se dispone de valiosa información, en este sentido, aportada por minuciosos estudios de RMN con dinucleótidos y oligonucleótidos (de cadena simple y doble) y, también, por los resultados cristalográficos de los productos de reacción de cis-DDP con un dinucleótido.

Características estructurales de los aductos de DNA con cis-DDP

LIPPARD y cols.³¹ han establecido, por difracción de rayos X con cristal único, la estructura cristalina y molecular del aducto cis-[Pt(NH₃)₂{d(pGpG)}], que se considera actualmente como representante del principal aducto producido por reacción del cis-DDP con DNA. La figura 11 muestra la estructura de una de las cuatro moléculas cristaloquímicamente independientes que constituyen el cristal del citado aducto, donde se observa la coordinación del grupo cis-diaminplatino(II) a los átomos N-7 de las dos guanosinas adyacentes del

dinucleotido:

desoxi-(fosfato-5'-guanosina-3'-fosfo-5'-guanosina)
d(pGpG), configurando un anillo quelato de 17 miembros (quelacion tipo 1,2). La formación de este puente tipo-1,2 intracadena ejerce una compresión que induce al cambio a la configuración C3'-endo en la desoxi-ribosa del nucleosido 5', característica de la forma A del DNA, menos estable que la forma B con configuración C2'-endo en sus anillos de d-ribosa. Además, las dos bases guanina, lejos de estar paralelamente superpuestas, quedan completamente ladeadas, formando ángulos diedros de 76,2° a 86,7°, para las cuatro moléculas independientes de aducto en la red cristalina. Los enlaces Pt-N(7) de guanina tienen distancias de 2.00 a 2.04 Å, dentro del rango normal en compuestos análogos. Es interesante notar el enlace de hidrógeno entre un átomo de oxígeno del grupo fosfato 5'-terminal y un ligando amino del grupo $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, que estabiliza el quelato. Otro detalle curioso de esta estructura es la orientación cara a cara de los átomos O-6 exocíclicos de las guaninas, ambos al mismo lado del plano de coordinación del platino, bloqueando el acceso de un posible quinto ligando.²²

Los resultados de este estudio cristalográfico son particularmente interesantes por cuanto la geometría establecida para dicho compuesto en estado sólido es sustancialmente la misma que se deduce en otros estudios (RMN) en disolución para el producto de reacción del $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ con ribo- y desoxi-ribonucleóticos análogos, tales

como GpG y pGpG o d-GpG y d-pGpG, indicando una escasa significación estructural para la presencia de ribosa o desoxi-ribosa. ^{9b}

La formación de anillos quelato intra-cadena tipo-1,2 por coordinación de $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ a los átomos N-7 de dos guaninas adyacentes se ha puesto de manifiesto también con otros oligonuclótidos de cadena simple o doble. En particular, se ha establecido, por difracción de rayos X, que la quelación intra-cadena tipo-1,2 producida por cis-DDP con d(GpGpG) es estructuralmente muy similar a la representada en la figura 11 con d(GpG) ^{9a}. Este tipo de estudios revela que tal quelación debe ocasionar una considerable y persistente perturbación local en la estructura del DNA, probablemente a modo de un pliegue en el eje de la doble hélice de unos 40°-70°. Dado que esta lesión no puede ser causada por el isómero inactivo trans-DDP, se considera que puede ser la principal causante de la actividad antitumoral del cis-DDP y, en particular, de su capacidad para inhibir persistentemente la replicación del DNA a dosis muy bajas, a las que el isómero trans resulta inactivo.

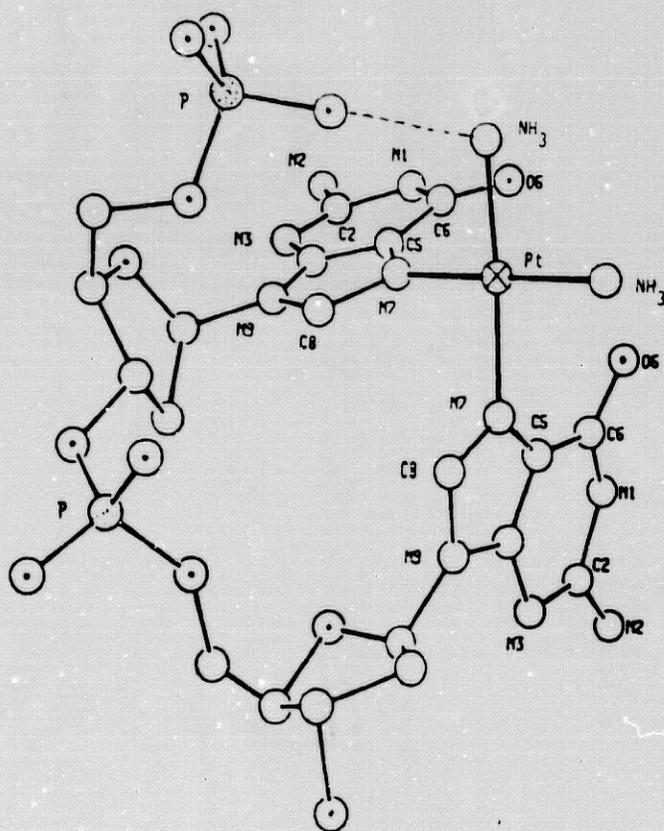


Figura 11.- Estructura de una unidad molecular de aducto $cis-[Pt(NH_3)_2(d(pGpG))]$ en su red cristalina,³¹ donde existen cuatro unidades moleculares ligeramente distintas. Con línea de trazo discontinuo se indica el enlace entre un oxígeno del grupo fosfato 5'-terminal y uno de los ligandos amoniaco.

Los fragmentos GpG no son los únicos que pueden originar quelaciones puente tipo-1,2 con $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. La reacción de cis-DDP sobre la secuencia (ApGpA) de una doble cadena conduce a la coordinación puente-1,2 con el fragmento ApG, pero no con la parte GpA. Esta circunstancia se racionaliza admitiendo la platinación inicial sobre el N-7 de G(2), que deja al átomo metálico a $\sim 3 \text{ \AA}$ del N-7 de A(3). Con todo, la formación de puentes-1,2 sobre fragmentos GpG se realiza, con carácter general, preferentemente que sobre la secuencia ApG.

Recientes investigaciones con el trinucleótido d(GpApG) revelan que el cis-platino forma también quelaciones puente tipo-1,3 con las dos guaninas (80%), además de puentes tipo-1,2 con el fragmento ApG(20%). No obstante, se sabe que éste (y otros) tipo(s) de quelato-1,3 son menos mutagénicos que los puentes-1,2 citados.

Aspectos estructurales de los aductos de DNA con trans-DDP

Siguiendo las ideas señaladas anteriormente por Rosenberg, la necesidad de diferenciar la reactividad de cis- y trans-DDP frente al DNA ha llevado a investigar también, con semejante metodología, la interacción del isómero inactivo frente a oligonucleótidos con cadena simple o doble⁹. En 1.986, REEDIJK y cols. informaban del

sorprendente resultado de un estudio de RMN y de técnicas de digestión enzimática que revelaba la capacidad para quelar del grupo $\text{trans-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ al trinucleótido $\text{d}(\text{GpTpG})^{32}$. Muy recientemente, LIPPARD³³ y cols. han ampliado estos resultados al trinucleótido $\text{d}(\text{GpCpGp})$ y al hexanucleótido de doble cadena $[\text{d}(\text{ApGpGpCpCpT})]_2$. Los citados trinucleótidos contienen el grupo $\text{trans-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ quelando a la secuencia $\text{d}(\text{GpNpG})$, formando puentes tipo-1,3, mientras que el hexanucleótido produce un derivado platinado de cadena sencilla con quelación de $\text{trans-Pt}[(\text{NH}_3)_2]$ al fragmento $\text{d}(\text{ApGpG})$, según se esquematiza en la figura 12. La información estructural disponible, en este caso³³, revela la formación de un gran anillo quelato, de 23 miembros, por coordinación puente tipo-1,3 de platino de $\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ a los nitrógenos N-7 de la adenina 5' o A(1) y de la guanina G(3), dejando la guanosina G(2) como nucleósido interpuesto. Parece claro que este tipo de puente-1,3 produce el cambio de conformación de C2'-endo a C3'-endo en la d-ribosa de G(1) o A(1) cuando está formado por $\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, aunque la constitución de tal puente por $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ no requiere que tal cambio conformacional sea completo³³. Este debate estructural debe estar relacionado con la diferente tendencia de los grupos cis- y $\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ para dar uniones quelato puente-1,3, que resulta favorecida para trans-DDP . A este respecto se ha comprobado que los quelatos 1,3 formados por $\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ son más mutagénicos que los análogos formados por $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$. No obstante, a

raíz de las experiencias se sabe también que los anticuerpos anti-nucleósidos reconocen significativamente mejor al DNA trans-DDP modificado que al DNA cis-DDP modificado. a relaciones r (complejo/nucleósido) relativamente bajas ($r \leq 0.02$)^{9a}.

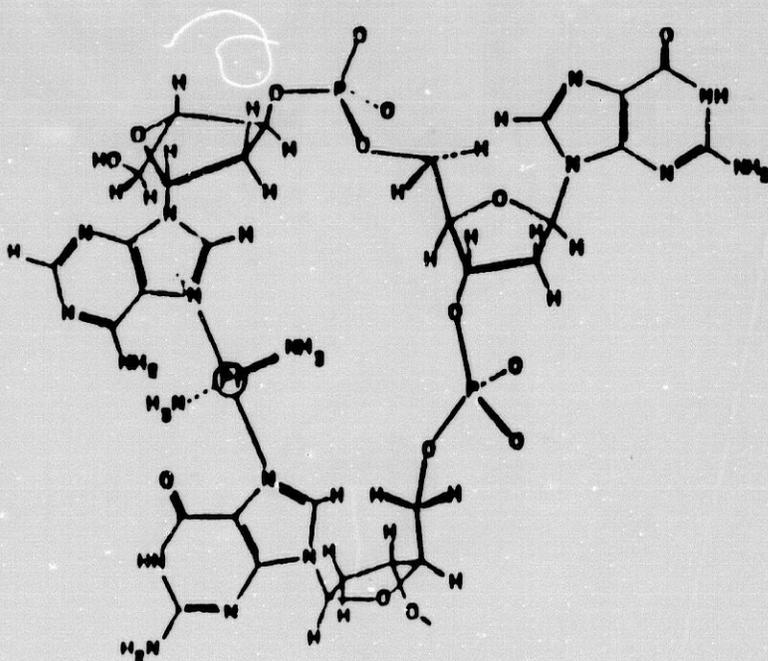


Figura 12.- Esquema del fragmento d(ApGpG⁻) plantinado en trans-[Pt(NH₃)₂{ApGpGpCpCpT}](N7-A(1),N7-G(3)). El anillo quelato de 23 miembros surge de la formación del puente tipo-1,3 intracadena por coordinación del metal del fragmento trans-(Pt(NH₃)₂)²⁺ a los átomos N7 de la adenosina-5' y de la guanina G(3), dejando la guanina G(2) como nucleósido interpuesto.

También se ha comprobado recientemente que trans-DDP produce platinaciones de DNA monofuncionales en mayor numero y con más largo tiempo de persistencia promedio que el isomero activo, cis-DDP³³. Del mismo estudio se desprende que también el trans-DDP tiene mayor probabilidad a dar uniones con DNA y un segundo ligando ajeno a éste, como puede ser la unión DNA-trans-DDP-proteína.

Estado actual

Los más recientes avances en el estudio de la reactividad de cis- y trans-DDP frente al DNA revelan que la distinta capacidad de ambos isómeros para producir el desenrollamiento y el acortamiento de la doble hélice del DNA está relacionada, cuanto menos, con la diferente regio y estereo especificidad con que los grupos cis y trans-Pt(NH₃)₂²⁺ se unen a las bases de las cadenas polinucleotídicas. Sobre estabese, que requiere evidencia experimental adicional, se entiende que el cis-DDP resulta un agente antitumoral activo a dosis para las que su isómero trans no lo es. No obstante, mayor esfuerzo investigador se prevee necesario para aclarar, entre otros, dos importantes observaciones biológicas. En primer lugar, la diferente actividad del cis-DDP sobre células normales cancerosas, lo que no puede entenderse por la distinta reactividad del complejo sobre el DNA de ambos tipos de células, sino que parece estar más bien relacionado con la

mayor eficacia de las células sanas para reparar las lesiones del DNA platinado frente a un defectuoso o ineficaz mecanismo reparador del DNA en las células tumorales, siempre menos diferenciado. Es bien conocido que la integridad del DNA en las células normales está protegida por sistemas de enzimas reparadoras, que presumiblemente pueden ser más eficaces que los de células tumorales. Los datos disponibles sugieren, también, que la acción de los mecanismos de reparación del DNA pueden también colaborar en la diferenciación. de la actividad de cis- y trans-DDP sobre el DNA "in vivo", es decir, formando parte de la cromatina en los cromosomas.

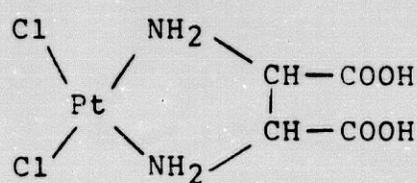
En segundo lugar, admitiendo que la toxicidad renal y para otros órganos, del cis-DDP y complejos análogos de platino es fundamentalmente debida a los oligo- μ -hidroxo-complejos, cargados y muy inertes, producidos en su hidrólisis, además de la prehidratación del paciente o de la administración simultánea de otros compuestos (dietild-tiocarbonato, tiosulfato)²², cabe pensar en cambiar sustancialmente la estrategia de síntesis del complejo antitumoral. En este sentido, una de las posibilidades que más esfuerzo investigador requiere es la de ensayar complejos análogos al cis-platino, pero con otros metales y apropiados ligandos lábiles o inertes, de forma que resulten sistemas más dinámicos y, de ese modo, se pueda evitar la formación de ese tipo de μ -hidroxo complejos inertes, dentro y fuera de la célula.

I. 5. Esterificación de aminoácidos en la síntesis de análogos del cis-DDP.

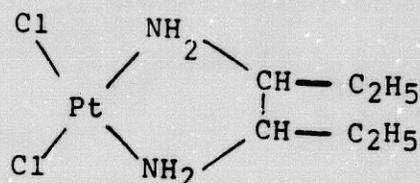
De las múltiples posibilidades que pueden practicarse en la búsqueda de análogos del cis-DDP como agentes antitumorales (antifúngico, antivirásico o parasiticida), dos directrices guardan directa relación con el presente trabajo: la sustitución de platino por paladio y la utilización de aminoácidos o sus ésteres como agentes quelantes que, en complejos de platino, actúan también como "ligandos inertes". En este último sentido, particularmente amplia y significativa ha sido la contribución del Prof. Wolfgang BECK y cols.³⁴⁻³⁶ en la preparación y estudio de las propiedades antitumorales de complejos de platino(II) con glicina y sus oligopéptidos, como tales o como ésteres etílicos. Sus resultados incluyen datos de IR para la caracterización de los complejos investigados, señalando la ausencia de apreciables diferencias en las frecuencias vibracionales de los grupos característicos en los correspondientes isómeros cis- y trans-Pt(Cl₂L₂), donde L es glicina (GlyH), glicinato de etilo o glicil-glicinato de etilo coordinados al platino por el grupo amino-terminal (como ligandos monodentados).

Por su directa relación con el presente trabajo, especial atención merece un estudio bastante reciente de INAGAKI, KIDANI y cols.³⁷ sobre la reactividad frente al DNA y la actividad antitumoral de cis-dicloro complejos de

platino(II) con los diaminoácidos 2,3-diamino-propiónico (dapH), 2,4-diaminobutírico (dabH) y 2,3-diaminosuccínico (dasH₂) y con sus correspondientes ésteres etílicos (dapEt, dabEt, dasEt₂). Los resultados de este trabajo incluyen la síntesis y el aislamiento de los complejos, datos analíticos (C,H,N) y de IR para su caracterización química y una interesante información sobre su reactividad frente a DNA (obtenida por espectroscopia diferencial UV) y sobre su actividad antitumoral frente a la leucemia L-1210 y al tumor P-388.



Pt(dasH₂)Cl₂



Pt(dasEt₂)Cl₂

El objetivo principal del referido estudio de INAGAKI y cols.³⁷ es investigar los efectos de la carga de los complejos de platino(II), indicados, sobre su reactividad frente al DNA nativo y frente a tumores "in vivo". En dichos complejos, el diaminoácido o su éster etílico en cuestión actúan como ligandos inertes, coordinando sus dos grupos amino al platino, dando lugar a un anillo quelato de cinco o seis miembros, de reconocida estabilidad. Tal quelación impone la coordinación cis-de los dos iones cloruro, como ligandos lábiles.

La figura 13 muestra los espectros diferenciales

UV de disoluciones de DNA de timo de ternera (en tampon de fosfato 0.01 M con pH=6,8 y NaCl 0.01M) tras la incubación (a 30°C, durante 4 días) con distintos complejos de platino, registrados frente a una disolución de DNA nativo como referencia. De acuerdo con los resultados de otro estudio publicado por INAGAKI y KIDANI²⁷, en los espectros considerados se observan tres contribuciones, una banda a 295 nm atribuible al cambio en la distribución electrónica de las bases, inducido por los procesos de platinación, una banda con máximo a 270-272 nm que se asocia principalmente a los cambios en la estructura secundaria del DNA, inducidos por la platinación, y una absorción hacia 248 nm que parece reflejar tanto la distribución electrónica en los restos de guanina como la estructura secundaria del DNA. Sobre esta base, la figura 13 a-c muestra la banda a 272 nm, más intensa para los complejos con el diaminoácido esterificado que para los correspondientes análogos no etilados, lo que se interpreta como una clara evidencia de que los productos neutros (con el diaminoácido esterificado) reaccionan con más intensidad frente al DNA nativo. Con todo, la semejanza de la forma de los espectros de la figura 13a-c se explica admitiendo que, en líneas generales, los complejos cargados y neutros tienen el mismo modo de reacción frente al DNA "in vitro" y que, por tanto, la carga negativa que deben tener los complejos con el diaminoácido no esterificado a pH=6,8 debe ser el origen de su menor reactividad.

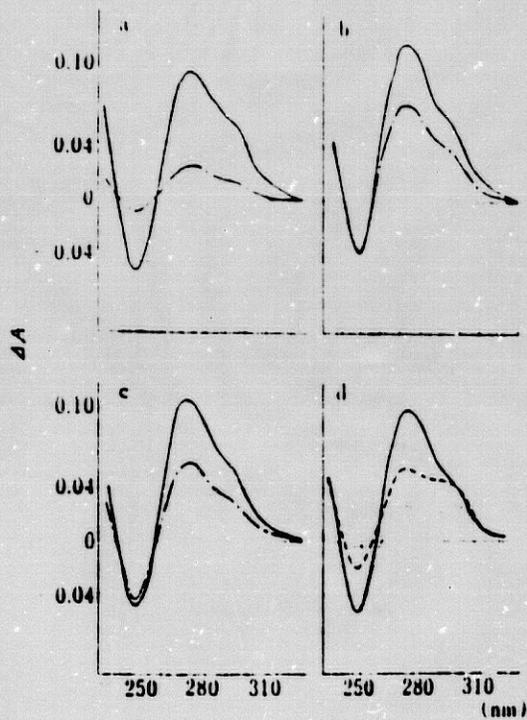


Figura 13.- Espectros diferenciales UV de varios sistemas platino-DNA ($r=0.1$) a pH=6,8, según INAGAKI y cols (reproducidos de la ref. 37).

DNA $2.36 \times 10^{-4} M$; Incubación previa = $30^{\circ} C$, 4 días

- a) — Pt(dasEt₂)Cl₂; —. — Pt(dasH₂)Cl₂
 b) — Pt(dapEt)Cl₂; —. — Pt(dapH)Cl₂
 c) — Pt(dabEt)Cl₂; —. — Pt(dabH)Cl₂
 d) — cis-DDP; —. — trans-DDP
 [Pt(NH₃)₃Cl]Cl.....

Los resultados espectrofotométricos de INAGAKI y cols.³⁷ revelan además que los efectos de los complejos de platino investigados sobre el DNA nativo dependen también de la dosis, observándose una creciente interacción lineal complejo-DNA cuando la relación platino/base $r < 0,07$. Además, tanto los productos con el diaminoácido esterificado como sus análogos no esterificados conducen a una relación $\Delta A_{272} / \Delta A_{295}$ próxima a dos (para $r < 0,1$), característica del sistema cis-DDP/DNA y comunmente observada para otros cis-dicloro-complejos de platino con actividad antitumoral.^{27, 37}

La diferente intensidad de reacción con el DNA que muestran los cis-dicloro-complejos de platino(II) con diaminoácidos y con sus correspondientes ésteres etílicos se acentúa con los resultados de su actividad antitumoral "in vivo", aportados por INAGAKI y cols.³⁷. Así, ratones hembras CDF₁, inyectados intraperitonealmente con 10^5 células de la leucemia L-1210 y tratados con complejo (días 1, 5 y 9; dosis de 6.25 a 200 mg/kg/día) o sin éste (lote control) revelan que los productos con el diaminoácido no esterificado son inactivos ($T/C(\%) < 125$) mientras que sus análogos etilados tienen una actividad antitumoral significativa ($T/C(\%) \geq 125$), aunque generalmente inferior a la de otros complejos de platino de reconocida eficacia, como cis-DDP o como Pt(1,2-diaminociclohexano)Cl₂. T/C(%) se entiende, en tumores líquidos, como el tiempo medio de supervivencia de los animales del lote tratado con complejo

respecto al lote control, expresado en porcentaje³⁶. Estos resultados y otros datos conocidos son atribuidos por INAGAKI y cols³⁷ a los efectos de la carga de los complejos inactivos o la neutralidad de los complejos activos (esterificados) asociada al ligando no saliente o inerte (diaminoácido), ya que se entiende que la carga eléctrica negativa del grupo carboxilato en el ligando inerte debe dificultar seriamente la penetración del complejo (no esterificado) en la células, al reducirse su permeabilidad a través de las membranas biológicas. Un efecto de este tipo puede no observarse cuando la carga eléctrica del complejo es debida a un ligando lábil, y a que éste puede ser fácilmente reemplazado "in vivo" por otros ligando no cargados.

II. COMPLEJOS DE PALADIO CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Dado el estrecho paralelismo existente entre la química de la coordinación del platino y del paladio, diferenciable esencialmente sólo en sus aspectos cinéticos, se comprende que la actividad antitumoral de los complejos de paladio(II), análogos a los de Pt(II), comenzó a investigarse poco después del descubrimiento de estos últimos. Sin embargo, resultados contradictorios, cuando no adversos, generaron una desalentadora opinión acerca de la posibilidad de disponer de complejos de paladio con suficiente actividad antitumoral, lo que se fundamentó en la idea de que se trataba siempre de compuestos demasiado lábiles como para preservar su integridad estructural hasta llegar al lugar de acción, es decir, al DNA de las células⁴⁻²⁰. El hecho de que la cinética de sustitución de ligandos en complejos de paladio(II) sea unas 10^5 veces más rápida que para los análogos de platino(II) ha permitido usar los primeros como un sistema modelo para el estudio de estos últimos²⁹. Además, recientemente se replanteó, con miras más amplias, la posibilidad de preparar complejos de paladio(II) con actividades biológicas diversas (anti-bacteriana, - cancerígena, -fúngica y -virásica)³⁹ y se han llegado a preparar complejos de este ion metálico con semejante o superior actividad que el cis-platino frente a determinados tumores⁴⁰

II.1. Antecedentes^{1-5, 20}

Los primeros estudios de complejos de paladio(II), análogos a los de Pt(II), frente al sarcoma S180 y al adenocarcinoma ADJ/PC61, no revelaron una actividad antitumoral significativa y, aunque algunos eran bacteriostáticos a bajas concentraciones, no se observó la filamentación de E. coli. DURING y cols obtuvieron indicios de filamentación del colibacilo en medio "C" con dosis casi letales del $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$, donde en representa la etilendiamina²⁰.

GRAHAM y WILLIAMS⁴¹ señalaron que el $\text{cis}-[\text{PdCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ reducía el sarcoma S180 y el tumor ascítico de Landschutz en un 82%, resultado puesto en duda al conocerse que también el isómero $\text{trans}-[\text{PdCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ reducía el citado tumor ascítico en un 45%, aunque era inactivo frente al sarcoma S180²⁰. KIRSCHNER y cols.⁴² han demostrado que el complejo $\text{cis}-[\text{PdCl}_2(\text{N}_2\text{H}_4)_2]$ induce la filamentación de E. coli y actúa como un potente inhibidor de la síntesis de DNA en cultivo celular del tumor standar L1210.

En ciertos casos, se ha investigado la actividad antitumoral de complejos de paladio(II), previamente aislados o presuntamente formados "in situ", conteniendo ligandos de conocidas propiedades antimetabólicas o anticancerígenas, lo que conduce a resultados que deben

contemplarse con reservas. Así, DAS y LIVINGTONE¹⁹ prepararon y ensayaron complejos de 6-mercaptipurina y tioguanina (2-amino-6-mercaptipurina) con Pd(II) activos frente al tumor L1210, aunque experiencias control revelaron que su eficacia era incluso inferior a la de los propios ligandos, lo que sugiere la posibilidad de que tal actividad se deba al ligando liberado del paladio en el interior de las células. Análogamente, CHARLSON y cols.²⁰ informaron de la actividad de la mezcla equimolar de tetracloropaladato(II) de potasio y L-glutamina frente a un tumor leucémico (P388) en hembras de ratón. En este caso, aunque no se dispone de datos control de la actividad de L-glutamina, se sabe que la L-asparaginasa y L-glutaminasa muestran actividad antitumoral.

Los resultados aquí referidos llevaron a CLEARE y cols.²⁰ a la consideración de que la sensible labilidad de los complejos de paladio(II), respecto a sus análogos de Pt(II), podría ser responsable de su escasa o nula actividad antitumoral. Esta opinión parece haberse dejado sentir en la bibliografía del tema, hasta que a finales de la década de los años setenta se empezó a pensar que los requerimientos estructurales de los complejos de paladio(II) con propiedades antitumorales no eran necesariamente los mismos establecidos para sus análogos de platino(II). Así, GRAHAM y WILLIAMS²¹, en un interesante "screening" de la actividad biológica con complejos de paladio(II,IV) y níquel(II), investigan una variada serie

de compuestos que comprende, entre otros, complejos de paladio(II) con y sin ligandos nitrogenados (NH_3 , ciclopentil- y ciclohexil-amina, aminoácidos como serina, asparagina, glutamina y D-penicilamina), un compuesto organometálico (π -alil-Pd-Cl) $_2$, y algunos complejos de paladio(IV). La determinación de la actividad antitumoral de los productos investigados incluye experiencias "in vivo" con el sarcoma S180 (tumor sólido) y el tumor ascítico de Landschutz (como tumor líquido), aportándose datos del porcentaje de inhibición $(T/C) \times 100$ y de índice terapéutico $(T.I. = LD_{50}/ID_{50})$.

WILLIAMS y cols., sobre la base de sus resultados, señalan que los compuestos de paladio antitumorales, a diferencia de los de platino, no requieren la presencia de ligandos nitrogenados en su composición y que la sustitución de platino por paladio en un complejo antitumoral dado afecta a la selectividad del tipo de tumor frente al que se muestran activos. Además, WILLIAMS y cols. señalan que los complejos de paladio sin ligandos quelantes pueden experimentar fácilmente la isomerización cis-trans y diversos procesos de sustitución de ligandos en los fluidos biológicos, donde los compuestos de Pd(IV) deben ser rápidamente reducidos a especies de Pd(II). Estas circunstancias explican que la electroneutralidad requerida para los complejos antitumorales de platino no sea un requisito para que complejos de paladio, tales como $[\text{PdCl}_6]^{2-}$ y $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ se comporten como agentes

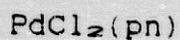
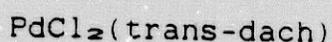
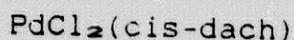
antitumorales.

II.2. Recientes avances e interés del presente estudio.

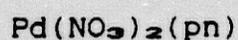
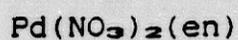
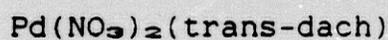
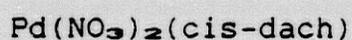
Además de una serie de estudios sobre los productos de reacción de complejos de paladio(II) con nucleótidos, nucleósidos y bases, que revelan una vez más el paralelismo entre la química de la coordinación del platino(II) y del paladio(II), en cuanto al número de coordinación, geometría y afinidad por los distintos tipos de ligandos, pese a su notoria diferente estabilidad cinética, D-S. GILL⁴⁰ ha realizado una amplia e interesante investigación sobre la actividad anticancerígena de una variada gama de productos de paladio(II) frente al sarcoma ascítico-180J, que merece ser considerada con detalle por su relación con el presente trabajo.

Con conocimiento de las más destacadas correlaciones estructura-actividad biológica en complejos de platino y de la escasa, nula o dudosa efectividad antitumoral revelada en anteriores estudios con compuestos de paladio, GILL se propuso preparar e investigar compuestos de paladio(II) con propiedades antitumorales sobre la base de moderar la labilidad de los grupos salientes. En este sentido, desarrolla o modifica la síntesis de compuestos que se agrupan convenientemente en cuatro categorías:

1.- Quelatos de cis-dicloropaladio(II) con diaminas alicíclicas (cis- y trans-1,2 -diaminociclohexano, cis-/trans-dach) o alifáticas (etilendiamina, en; 1,3-diaminopropano, pn):



2.- Quelatos de dinitrato-paladio(II) con las referidas diaminas:



3.- Un producto oligomérico con grupos hidroxopuente (probablemente trimero) de fórmula $[\text{Pd}(1,2\text{-dach})(\mu\text{-OH})]_n$, resultante de la hidrólisis alcalina (pH=6.45) de $\text{Pd}(1,2\text{-dach})(\text{NO}_3)_2$. La reacción de este producto con concentraciones fisiológicas de ion cloruro ($\sim 0,1\text{M}$) requiere unas dos semanas.

4.- Bis-quelatos de paladio(II) ternarios, con una diamina de las citadas y un dicarboxilato (oxalato, tartrato, malonato, glutarato, o ciclobutano-1,1-dicarboxilato):

Pd(diamina)(ox)

Pd(diamina)(tar)

Pd(diamina)(mal)

Pd(diamina)(glut)

Pd(diamina)(CBDCA)

Los ensayos de la actividad antitumoral realizados por GILL, en grupos de seis ratones hembras ICR,, consistian en la inyección intraperitoneal de 4×10^6 células del sarcoma ascítico-180J por ratón (lote control negativo) y de éste mas una dosis del complejo de paladio disuelto o en suspensión (en cada lote problema). Además, como control positivo se usó un lote de ratones inyectado de células tumorales y una dosis de cis-DDP(7mg/Kg). Los resultados de la actividad antitumoral se estimaron por el índice %ILS, que representa el porcentaje del incremento en el tiempo de supervivencia ("increase life span") calculado como el día medio de muertes en el lote problema menos el día medio de muertes en el control negativo, dividido por éste último y todo ello multiplicado por 100. El valor estimado para el cis-platino fue de %ILS=60-75.

Los resultados de GILL revelan que, a las dosis indicadas en la Tabla II, los complejos de paladio(II) con dach tienen un efecto anticancerígeno comparable al del cis-DDP, ensayado a una dosis estimada como la mitad de su valor de LD_{50} (=13mg/kg). Asimismo, otros datos aportados por el autor en la ref. 40 muestran que, a las dosis ensayadas, los dinitratos-complejos de Pd(II) con diaminas alifáticas (en y pn) tienen una actividad antitumoral similar o superior a la del cis-DDP, mientras que $[Pd(NO_3)_2(NH_3)_2]$ es inactivo (dosis 10-80 mg/kg) frente al tumor ascítico usado. Estos resultados indican el interés que tiene el empleo de diaminas quelantes que impidan la isomerización cis \rightarrow trans que deben sufrir los complejos de paladio(II) con ligandos monodentados en disolución. También se dispone de evidencia experimental de la influencia que tiene la estabilidad del anillo quelato diamina-paladio(II) o platino(II) en la actividad antitumoral. Así, los datos de la Tabla III muestran que los quelatos de paladio(II) con trans-1,2-diaminociclohexano son más activos que los análogos con cis-dach, de acuerdo con la mayor estabilidad termodinámica del anillo Pd(II)-trans-dach (con los sustituyentes amino de la misma categoría axial/ecuatorial en la conformación tipo silla del anillo ciclohexano) que del quelato Pd(II)-cis-dach (con ambos grupos amino de distinto tipo, uno axial y otro ecuatorial).

El estudio de GILL revela también que los complejos

de paladio(II) con dos ligandos amino en vez de una diamina-quelante son inactivos si los ligandos lábiles son también monodentados pero, sin embargo, resultan activos los compuestos de diamin-paladio(II) con un ligando lábil quelante, como los aniones dicarboxilatos, oxalato, malonato, glutarato, etc.

Estas circunstancias se explican por la rápida isomerización $cis \rightarrow trans$ de los complejos de Pd(II) con ligandos monodentados (lábiles e inertes) que puede impedirse por el carácter quelante de un ligando dicarboxilato apropiado. (TablaIV).

TABLA II.- Actividad antitumoral de complejos de paladio(II) con 1,2-diaminociclohexano frente al sarcoma 180-J

<u>Complejo</u>	<u>dosis (mg/Kg)</u>	<u>máximo%ILS</u>
$[Pd(dach)OH]_n(NO_3)_n$	80	75
$Pd(dach)(NO_3)_2$	80	65
$Pd(dach)(mal)$	150	76

TABLA III.- Actividad antitumoral de complejos de Pd(II) con cis- o trans- dach.

<u>Complejo</u>	<u>dosis (mg/Kg)</u>	<u>máximo%ILS</u>	
		<u>trans-</u>	<u>cis-</u>
$Pd(dach)(NO_3)_2$	60	81	50
$Pd(dach)(ox)$	30	46	31
$Pd(dach)(CBDCA)$	100	55	35
$Pd(dach)(mal)$	150	76	46

TABLA IV.- Actividad antitumoral de complejos de diamin-paladio(II) con ligandos lábiles monodentados y bidentados (dicarboxilatos)

<u>Complejo</u>	<u>dosis (mg/Kg)</u>	<u>máximo%ILS</u>
Pd(NH ₃) ₂ Cl ₂	50	4
Pd(NH ₃) ₂ (NO ₃) ₂	20	14
Pd(NH ₃) ₂ (ox)	50	37
Pd(NH ₃) ₂ (glut)	100	80
Pd(NH ₃) ₂ (mal)	100	50

Los datos aportados por GILL revelan que, con carácter general, no existe una estricta correlación entre las propiedades antitumorales de dinitrato complejos de paladio(II) y de platino(II) (Tabla V). En particular, GILL señala que la electroneutralidad del complejo y la moderada labilidad de los ligandos, requerida en complejos de Pt(II) antitumorales, no siempre se observa en complejos análogos de Pd(II) activos.

TABLA V.- Comparación de la actividad antitumoral de complejos de paladio(II) y sus análogos de platino(II). 40

Complejo	M=Pd	M=Pt
M(en)(NO ₃) ₂	Activo	Marginalmente activo
M(pn)(NO ₃) ₂	Activo	Marginalmente activo
M(trans-dach)(NO ₃) ₂	Activo	Activo
[M(dach)(OH)] _n (NO ₃) _n	Activo	Activo
M(2,2'-bipy)(NO ₃) ₂	Activo	Inactivo
M(NH ₃) ₂ (NO ₃) ₂	Inactivo	Marginalmente activo

De los resultados aportados por GILL se desprenden importantes observaciones de carácter general relacionadas con el presente estudio. Sin duda, la más significativa es la viabilidad de desarrollar complejos de paladio(II) con aceptable actividad antitumoral. En este sentido, GILL considera que los compuestos antitumorales de paladio pueden ser activos incluso frente a tumores gastrointestinales, para los que complejos análogos de platino(II) se muestran inactivos o, mejor, quedan inactivados por las altas concentraciones de cloruro ($\sim 0,1M$) de los jugos gástricos. Además, es evidente la necesidad de usar al menos un ligando bidentado quelando al paladio(II) y, a este respecto, parece mejor usar una diamina apropiada, que imponga la configuración cis- a los ligandos más lábiles (nitrato, cloruro). La formación de hidroxocomplejos y su posible oligomerización no debe impedir la acción de

complejos de paladio y, además, la aparición de especies cargadas no representa necesariamente la inactividad de los compuestos de paladio, dada la mayor rapidez con que se interconvierten con especies eléctricamente neutras respecto a derivados inertes de platino. Sobre esta base, el presente estudio tiene interés por ampliar los horizontes marcados por el trabajo de GILL en el sentido de incorporar diaminoácidos y sus ésteres etílicos (en vez de diaminas no fisiológicas) y de aportar datos sobre la actividad de los complejos investigados frente al DNA ("in vitro" e "in vivo") y también resultados microbiológicos, parasitológicos y toxicológicos, no contemplados por el citado autor.

PARTE B: MATERIALES Y METODOS

I. - MÉTODOS DE SÍNTESIS

I.1. Diclorhidrato de 2,3-diaminopropionato de etilo, (dap-Et.2HCl).

Se preparó tratando a reflujo, durante 24 horas, una suspensión en etanol absoluto saturado de HCl, de 5 g (2,8mmol) de dap.2HCl con agitación constante. La disolución resultante se deja reposar a temperatura ambiente, durante 24 horas, obteniéndose un polvo blanco, que se filtra y se lava repetidas veces con etanol, se seca en corriente de aire y después a vacío sobre P_4O_{10} . Rendimiento: 99%, punto de fusión $Pf(\text{descomp})=160^{\circ}C$. Análisis calculado para $C_8H_{14}Cl_2N_2O_2$: C=29,29%, H=6,88% y N=14,00%. Encontrados: C=29,37%; H=7,25%; N=13,67%. PM=205,07.

I.2. Diclorhidrato de D,L-2,4-diaminobutirato de etilo, (dab-Et.2HCl).

Se siguió un procedimiento de síntesis idéntico al descrito en el apartado anterior, obteniéndose un sólido blanco con un alto rendimiento: 99,2%; $Pf(\text{descomp}) = 182^{\circ}C$; análisis calculado para $C_8H_{14}Cl_2N_2O_2$: C=32,82; H=7,34; N=12,76. Encontrados: C=33,06; H=8,02; N=12,81. PM=219,56.

I.3. Cis-dicloro (D,L-2,3-diaminopropiónico)
Paladio(II), cis-[Pd(dap-H)Cl₂]

Para esta síntesis, y las que se describen a continuación, se siguió, con ligeras modificaciones, el método descrito en la bibliografía para complejos de platino(II) con diaminocarboxilatos y sus ésteres etílicos. Las condiciones experimentales son las siguientes: Se disuelven 0,89 g (5mmol) de PdCl₂ en unos 100 ml de HCl-0,1N, con calefacción y agitación constante. La disolución obtenida se hace reaccionar con 0,70 g (5mmol) de ligando (dap-H). HCl, que se adiciona en pequeñas proporciones hasta obtener una disolución de color amarillo claro que se deja en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Se obtiene así un polvo amarillo pálido que se filtra y lava repetidas veces con agua muy fría, hasta que el ensayo de cloruros con AgNO₃ sea negativo. A continuación se lava el precipitado con etanol y se deseca a vacío sobre P₂O₅.

Rendimiento: 93%, Pf(descomp)= 235°C. Análisis
calculado para PdC₃H₆Cl₂N₂O₂: C=12,80; H=2,87; N=9,95 y
Cl=25,20. Encontrado: C=13,10; H=2,55; N=9,74; Cl=26,34.
PM_{teor}=326,47, PM_{exp}=327,96.

I.4. Cis-dicloro (D,L-2,4-diaminobutirico)
paladio(II), cis-[Pd-dab-H)Cl₂]

Se siguió el método anterior, utilizando en la síntesis D,L-2,4-dab.HCl. Se obtuvo un polvo amarillo claro, con un rendimiento del 94%. Pf(decomp) = 238°C. Análisis calculado para PdC₄H₁₀Cl₂N₂O₂: C=16,26; H=3,41; N=9,48; Cl=24,00. Encontrado: C=16,32; H=3,09; N=9,09; Cl=24,39. Pm_{teor} = 295,45. Pm_{exp.} = 300,12.

I.5. Cis-dicloro (D,L-2,3-diaminopropionato de etilo)
paladio(II), cis-[Pd(dap-Et)Cl₂].

Se hacen reaccionar 2 g (11,3mmol) de PdCl₂ disuelto, en caliente, en 50 ml de HCl 0,1 N, con 2,20 g (11,3mmol) de dap.Et.2HCl, agitando hasta disolución completa. El pH de la disolución se ajusta entre 6 y 7 con bicarbonato sódico y se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Se obtiene así un polvo amarillo claro que se filtra, se lava primero con agua muy fría hasta que dé negativo el ensayo de cloruros y después con etanol, secando el producto en corriente de aire y después a vacío sobre P₂O₅. Rendimiento: 83,87%. Se descompone sin fundir. Análisis calculado para PdC₅H₁₂Cl₂N₂O₂: C=19,41; H=3,91; N=9,05; Cl=22,91. Encontrado: C=19,51; H=3,91; N=9,18; Cl=23,90; PM=309,47.

I.6. Cis-dicloro (D,L-2,4-diaminobutirato de etilo)

paladio(II) cis-[Pd(dab-Et)Cl₂].

Se sintetiza como el cis-[Pd(dap-Et)Cl₂], obteniéndose un polvo amarillo claro, que se deseca a vacío sobre P₂O₅. Rendimiento: 88.7%. Se descompone sin fundir. Análisis calculado para PdC₆H₁₄N₂O₂: C=22,28; H=4,36; N=8,66; Cl=21,92. Encontrado: C=22,30; H=4,32; N=8,25; Cl=20,39. PM=325,50.

I.7. Productos y reactivos.

Los clorhidratos de los ácidos D,L-2,3-diaminopropiónico (dap.HCl) y D,L-2,4-diaminobutírico (dab.2H₂O) fueron suministrados por la firma Sigma Chemical Company y el ácido cloroacético usado en la síntesis por Merck Darmstadt. El resto son de pureza analítica y el siguiente origen o características: PdCl₂ (BDH, Albus); HCl conc. KOH, AgNO₃, alcohol absoluto, alcohol de 96° y H₂SO₄ (Probus, Panreac) NaHCO₃ (Merck)

II.- TECNICAS EXPERIMENTALES FISICO QUIMICAS.

II.1. Estudio potenciométrico y conductimétrico.

II.1.1. Equipos de valoración.

El estudio conductimétrico se realizó con un Equipo Valorador Radiometer RTS 622, compuesto de Autobureta ABU 12 (bureta B 220 de 2,5 ml), pH-metro 62, Registrador Servograph REC 61-Titrigraph - REA 160, modulo de derivación REA 260 y módulo de valoración TTA 60, con vasija de valoración termostática V 535 (50ml) acoplada a un baño termostato-criostato de circulación Selecta.

Se usaron electrodos Radiometer de vidrio (G 2040C) y de calomelanos (K4040).

La calibración del equipo potenciométrico se hizo por doble ajuste tampón, con tampones Radiometer de pH $7,00 \pm 0,01$ (S1326) y $4,01 \pm 0,01$ (S1316) a $25,00^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ\text{C}$ en la escala NBS.

Para las valoraciones conductimétricas se utilizó el mismo Equipo Valorador del estudio potenciométrico acoplado a un Conductímetro Radiometer CDN 3, con célula de medida PP 1042.

Todas las valoraciones se hicieron con disoluciones exentas de CO_2 , en atmósfera inerte de N_2 , purificado de CO_2 y

O₂ y presaturado de vapor de agua. Para las valoraciones potenciométricas se utilizaron disoluciones con fuerza iónica ajustada $I=0,1M(KCl)$.

El reactivo valorante fue una disolución de KOH 0,1M, preparada por dilución de una disolución patrón (5,611 g KOH/l) con agua desionizada exenta de CO₂. La titulación de este reactivo se hizo frente a hidrogenoftalato potásico, patrón primario, desecado (120°C 6 horas).

II.1.2. Valoraciones potenciométricas.

Se han realizado valoraciones de todos los ligandos, así como de los complejos sólidos. Todas las disoluciones se prepararon diluyendo con agua bidestilada (exenta de CO₂) 25 ml de una disolución madre $8 \cdot 10^{-3} M$ y 25 ml de KCl 0,4M hasta un volumen de 100 ml, para que la concentración fuera del orden de $2 \cdot 10^{-3} M$.

II.1.3. Valoraciones conductimétricas.

Se han valorado disoluciones ($2 \cdot 10^{-3} M$) de los ligandos y de sus complejos sólidos de Pd(II). Con objeto de apreciar mejor las variaciones de conductividad en el curso de estas valoraciones, se usaron disoluciones acuosas (exentas de CO₂) sin ajustar la fuerza iónica del medio.

II.1.4. Productos y reactivos.

Disoluciones patron de KOH (5,611g) Titrisol (Merck), hidrogenoftalato potásico patrón primario (Merck) KCl P.A. (Merck).

II.2. Espectros IR.

II.2.1. Preparación de las muestras.

Las muestras sólidas se comprimieron con 150 mg de KBr (Urvasol, Merck) a una presión de 9.5 Tm/cm^2 , aplicando alto vacío.

Los espectros se registraron usando un comprimido de 150 mg de KBr como referencia, por lo que el rango espectral útil se extiende desde 4000 a 400 cm^{-1} . En todos los casos se utilizó un espectrofotómetro Beckman IR-4260.

II.2.2. Estudio de los ligandos y de los complejos.

Se han registrado los espectros IR de muestras sólidas ($\sim 1\text{mg}$) de dap.HCl , dab.2HCl , dap-Et.2HCl y dab-Et.2HCl .

Se han registrado, asimismo, los espectros IR de los siguientes complejos: $\text{cis-[Pd(dap-H)Cl}_2\text{]}$, $\text{cis-[Pd(dab-H)Cl}_2\text{]}$, $\text{cis-[Pd(dap-Et)Cl}_2\text{]}$ y $\text{cis-[Pd(dab-Et)Cl}_2\text{]}$.

II.3. Estudio de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica de los compuestos preparados se investigó en muestras sólidas ($\sim 5\text{mg}$) usando un Sistema de Análisis Térmico Rigaku, serie Termoplex, equipado con Termobalanza, Sistema de Análisis Térmico Diferencial de Barrido (ATD/DSC), unidad de proceso de datos y registrador de tres canales.

II.4. Otras determinaciones.

Los puntos de fusión (descomposición) de los sólidos investigados se determinaron en un aparato Electrothermal Melting-Point.

Los análisis de los productos sólidos obtenidos, en cuanto a su contenido en C,H,N, se han realizado en el Instituto de Química Bio-Orgánica (C.S.I.C.) de Barcelona.

Para el análisis de cloruros se siguió el método de Mohr.

Los pesos moleculares se estimaron a partir de los datos de la valoración potenciométrica, repetida varias veces en cada una de las muestras de sólidos.

III. ESTUDIOS BIOLÓGICOS.

III.1. Estudio microbiológico.

Se han utilizado cepas de Escherichia coli K-12, del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Granada, en donde se llevaron a cabo los cultivos correspondientes.

Como medio de cultivo se ha utilizado el medio "C" de Roberts y Cols.⁴⁹, con glucosa al 0,2% como fuente de energía, sólo y adicionado de distintas concentraciones de complejo.

La composición del medio "C" es la siguiente:

NH ₄ Cl	2 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	3 g
MgCl ₂	0.01 g
Na ₂ SO ₄	0,026 g
H ₂ O destil.	c.s.p. 1.000 ml

En la preparación del medio "C", y a fin de evitar la precipitación de los componentes del medio en el proceso de esterilización, se preparó por separado en un matraz la disolución de los fosfatos (Na₂HPO₄ y KH₂PO₄) en 200 ml de agua

y en otro matraz el resto de los componentes del medio, disueltos en 800 ml de agua y adicionados de glucosa. Ambas disoluciones se esterilizaron en autoclave a 112°C durante 30'.

Una vez frías las disoluciones, se mezclaron y se procedió a su reparto, con pipeta estéril, en tubos de ensayo estériles a razón de 5 ml/tubo.

A partir de una disolución madre, en medio acuoso, de los complejos, de concentración 10^{-3} M, se añadieron 0,5 ml a cada serie de diez tubos, para dar una concentración final del complejo de 10, 25, 50, 75 y 100 μ M de complejo en cada serie.

Se inoculó 0,01 ml de un cultivo de 18 h. de *Escherichia coli* previamente adaptado al medio "C" en cada serie de tubos con distintas concentraciones de complejo (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μ M).

Los tubos inoculados se incubaron en estufa a 37°C y periódicamente se tomó un tubo correspondiente a cada concentración ensayada y se midió su D.O. en el espectrofotómetro a 450 nm.

Los tiempos de lectura fueron 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 36 y 48 horas.

Simultáneamente, y en los mismos tiempos, se realizó

una tinción de Gram de cada tubo, y una observación en fresco.

Esta experiencia se realizó por triplicado.

III.2. Estudio parasitológico.

Tripanosoma cruzi es un protozoo flagelado hemático perteneciente a la familia trypanosomatidae. En su vida biológica utiliza como hospedadores definitivos, animales mamíferos y, como hospedadores intermediarios y vectores, especies de insectos hematófagos de la familia Reduviidae.

Este protozoo es el responsable etiológico de la "enfermedad de Chagas" o "tripanosomiasis americana", afección que representa el mayor problema sanitario humano en América Central y Sudamérica, causando altos índices de morbilidad y mortalidad.

El *T. cruzi* presenta cuatro formas morfológicamente distintas de acuerdo con el tipo de hospedador y localización en el mismo.

Cada una de las formas adoptadas por este parásito tiene unas características determinadas que resumidas son:

- Formas tripomastigotas sanguíneas: Se encuentran en el torrente circulatorio de los vertebrados parasitados. Son

formas pequeñas y alargadas (10 a 25 μ y de 1 a 5 μ de ancho).

- Formas amastigotas: Al penetrar las formas tripomastigotas en el interior de las células del hospedador vertebrado sufren una reorganización estructural dando lugar a las formas amastigotas. Son formas ovoides que miden aproximadamente 4 μ de diámetro mayor.

- Formas epimastigotas: Tienen diferentes lugares de localización:
 - a) Intracelularmente, en el hospedador vertebrado
 - b) En el intestino del hospedador invertebrado.

- Formas tripomastigotas metacíclicas: Son formas que se producen en el extremo posterior del intestino del insecto hematófago, a partir de una transformación de las formas epimastigotas.

Las formas epimastigotas son las estudiadas frente a los complejos de este trabajo.

Las experiencias realizadas se llevaron a cabo en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Granada, con una cepa de T.cruzi de gran virulencia, aislada de un caso clínico y que fue donada al Departamento en 1.974 por la División de Malariología y Sanidad Ambiental del Maracay

(Venezuela). Desde entonces se ha mantenido mediante pases sucesivos en ratón albino cepa BALB/C.

Los cultivos de los tripanosomas se realizaron en el medio LTM (medio líquido tripanosoma) cuya composición es la siguiente:

- Solución Hanks	900 ml
- Lactoalbúmina hidrolizada	5 g
- Extracto de levadura	0,1 g
- Hemoglobina bovina	0,2 mg

Este medio está suplementado con un 10% de SBF inactivado a 56°C durante 30 minutos. El pH se ajustó a 7,2.

Una vez preparado el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana (sartorius) de 0,45 μm de diámetro de poro y tras comprobar su esterilidad se reparten en tubos Roux (Nunc) de 10 ml en cada tubo.

Composición de la solución Hanks:

NaCl	8 g
KCl	0,40 g
CaCl ₂	0,14 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
Na ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,06 g

KPO ₄ H ₂	1,00 g
NaCO ₃ H	0,35 g
Neomicina	0,50 ml
Rojo fenol	1,00 ml
H ₂ O bidestilada	1,000 ml

-pH final de la disolución = 7, 3.

La concentración óptima de parásitos debe estar entre 500.000 y 1.000.000 de parásitos/ml.

Los complejos metálicos ensayados se disolvieron en agua bidestilada, ligeramente acidulada con ácido clorhídrico. Se preparó una disolución madre, para las posteriores diluciones, con una concentración de 2 mg/ml.

Para llevar a cabo esta experiencia se emplearon como frascos de cultivo tubos Schott de 10 ml de capacidad, previamente esterilizados al autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Se utilizaron concentraciones de los complejos de 100; 10 y 1 µg/ml, añadidos con microjeringa Hamilton. Para cada concentración se efectuaron dos réplicas y además un control para comparar los resultados obtenidos, así como un testigo, utilizando como tal el Lampit[®], también a concentraciones de 100; 10 y 1 µg/ml.

Una vez adicionados los complejos se procedió a una agitación orbicular de todos los tubos, llevándose después a incubación a 28°C.

Posteriormente se analizaron los efectos de los complejos sobre los tripanosomas, observándose el porcentaje de inhibición de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas, respecto al control, utilizando para ello la cámara de recuento hemocitométrica de Neubauer.

IV.- ENSAYOS CON DNA, CROMATINA Y CROMOSOMAS.

Con objeto de obtener información preliminar de la potencial actividad antitumoral de los quelatos de dicloropaladio(II) con ácidos α , ω -diaminocarboxílicos y con sus ésteres etílicos, se investigó la reactividad de tales compuestos, "in vitro" e "in vivo", frente a DNA de diferentes procedencias, tanto nativo como integrado en la cromatina o en estructuras cromosómicas. Con fines comparativos, siempre que se estimó oportuno, los ensayos "in vitro" se llevaron también a cabo con cis-DDP.

IV.1. Ensayo "in vitro" con DNA y cromatina.

La capacidad de los complejos de paladio considerados para interaccionar con la estructura secundaria del DNA se estudió mediante experiencias "in vitro" con DNA nativo de esperma de salmón sonicado, de origen humano o de *Streptomyces* sp. éste último conteniendo un 80% de pares GC (guanina-citosina). Estos ensayos comprenden los estudios de los espectros diferenciales ultravioleta, la determinación de las curvas de desnaturalización (o fusión) y análisis de renaturalización. Se realizaron también algunas medidas de desnaturalización con cromatina de eritrocitos de pollo con el complejo $[\text{Pd}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$. Todos los datos y espectros necesarios en estos ensayos se obtuvieron con un Espectrofotómetro Beckman Acta III, equipado con un programador

de temperaturas. Los espectros UV y las curvas de fusión se realizaron con DNA (de esperma de salmón, humano y de Streptomices) en medio salino 0,1xSSC (SSC=0,15M NaCl, 0,015M citrato sódico) a pH= 7,2, mientras que los ensayos de renaturalización se llevaron a cabo en tampón de fosfato (0,24M) de pH= 7,2.

Los espectros UV se registraron entre 220 y 320 nm, estudiando la absorción del DNA en presencia o en ausencia del complejo en cuestión (espectrofotometría diferencial). Las muestras tratadas con complejo se incubaron a dos tiempos, de 15 minutos y de 48 horas. Además, los complejos se investigaron a 5 dosis diferentes, cuantificadas por la razón molar "r" (relación molar entre la cantidad de complejo y el número de bases o de nucleótidos de DNA) 0,0005, 0,0010, 0,0015, 0,0020 y 0,0025. La concentración de DNA utilizada fue de $1,56 \times 10^{-4} M$. Los espectros así obtenidos permiten estimar los datos de longitud de onda de máxima absorción, λ_{max} , la variación de la absorbancia (efectos hipercrómico H(%) o hipocrómico) y otros parámetros de interés, como el cociente entre la variación de absorción a 270 y 295 nm ($\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$) o la amplitud media de la banda (2σ).

Las curvas de desnaturalización o de fusión del DNA, en presencia o ausencia de complejo, se han obtenido a partir de medidas de absorbancia a $\lambda = 258 \text{ nm} = \lambda_{max}$ para el DNA nativo. El incremento de temperatura se programó con un aumento

constante desde 25°C a 90°C. Las mezclas adicionadas de complejo se prepararon para valores de razón molar "r" de 0,0005, 0,0010, 0,0020 y 0,0025. Antes de proceder al estudio de desnaturalización, las referidas muestras fueron incubadas a 25°C en 0,1xSSC durante 15 minutos y 48 horas. La concentración de DNA se mantuvo constante, correspondiente a una densidad optica $D_{258}=1,0$, a $\lambda=258\text{nm}$. Las concentraciones de complejo investigadas varían entre 10^{-6} y 10^{-9}M .

Los ensayos de desnaturalización se extendieron también a la cromatina, que se aisló de eritrocitos de pollo. Tales ensayos se llevaron a cabo en disolución 1mM de tris-ClH, 0,5mM de EDTA y pH=8, con concentraciones de complejo entre 10^{-6} y 10^{-7}M , y una concentración de cromatina constante, correspondiente a $D_{258}=0,4$ a 258nm.

Los resultados de los estudios de desnaturalización del DNA y de cromatina han sido convenientemente tratados mediante un programa de derivadas por un computador HP9816.

El análisis de renaturalización se realizó con DNA de esperma de Salmón sonicado (fragmentos entre 0,5 y 1 Kb) desnaturalización en baño a 100°C durante 20 minutos, llevando a cabo la renaturalización en baño de arena a una temperatura 10°C por debajo del valor de la temperatura de fusión de "Melting", T_m .

IV.2. Ensayos "in vivo" con cromatina y cromosomas.

Los ensayos "in vivo" (acción sobre el DNA asociado a proteínas (DNPs) y sobre la transcripción) se han realizado con el sistema modelo constituido por las larvas de *Drosophila hydei*, que se eligieron invariablemente en el tercer estadio de desarrollo y presentando, además, un peso corporal de 4 mg. Tales larvas fueron tratadas por el método de la microinyección, con dosis de 0,5 μ l de una disolución de complejo $[\text{Pd}(2,4\text{-dab-Et})\text{Cl}_2]$ 10^{-6}M . Los efectos de este complejo sobre la estructura de los cromosomas o sobre la transcripción se investigaron transcurridas 4 horas desde el momento de la inyección.

Para el estudio de la estructura cromosómica, las glándulas salivares fueron extraídas de las larvas por disección en solución fisiológica de Ringer, siendo prefijadas en etanol-ácido acético (3:1) durante 10 minutos, en ácido acético al 50% y luego aplastadas entre el cubre- y portaobjetos. Inmediatamente después de esto fueron congeladas en nitrógeno líquido, se retiró el cubreobjetos y se sumergieron en etanol absoluto, donde se mantuvieron por un periodo de tiempo definido, de acuerdo a los tratamientos posteriores, y seguidamente se secaron al aire. Para observar los posibles efectos del complejo sobre la estructura de los cromosomas se utilizó la técnica de tinción con orceína lactoacética. Para la detección de los híbridos DNA:RNA

cromosómicos se siguió el método descrito por ALCOVER y cols.⁴⁶. Obtenidas las glándulas salivares fueron fijadas y aplastadas en ácido acético 45%. Después de la deshidratación con etanol absoluto por cuatro horas, los cromosomas fueron secados al aire. La inducción de los híbridos DNA:RNA se realizó por desnaturalización del DNA cromosómico en 0,1xSSC, a 90% durante 30 segundos y posterior incubación de los cromosomas en 100 ml de 50% formamida: 2,5xSSC, a 25°C durante 10 minutos. Después de ser lavados los cromosomas en tampón de fosfato (PBS) se incubaron con 10 µl de una solución de un anticuerpo anti-DNA:RNA por espacio de una hora. Después se incubaron con 20 µl de IgG de conejo anti-IgG de cabra marcado con fluoresceína en una dilución 1:50 en PBS. Las preparaciones fueron finalmente enjuagadas intensamente con PBS.

Los portaobjetos fueron montados en glicerina-Tris 1M(9:1) a pH=8 y los cromosomas se fotografiaron en un microscopio Zeiss de fluorescencia epiiluminado, utilizando una película de 35 mm Tri-XPm (Kodak).

V.- ENSAYOS TOXICOLÓGICOS.

Con objeto de obtener información sobre la posible toxicidad de los complejos de paladio(II) investigados, se realizaron diversas experiencias preliminares encaminadas a la determinación de dosis letales y al estudio histopatológico de todos los órganos de ratones hembras de raza swiss albina, tratados con el complejo $[Pd(2,4-dab-Et)Cl_2]$ y con cis-DDP.

V.1. Ensayos toxicológicos.

Por razones de la reducida solubilidad de los complejos de paladio(II) investigados en suero salino (NaCl 8,5 %) y del límite de volumen (0,5 ml) que de tal solución puede inyectarse intraperitonealmente a un ratón de unos 20 g de peso corporal, sin que resulte por su propia magnitud letal o nocivo, resultó inviable el cálculo de la dosis letal al 50% (DL_{50}), según se desprende de las siguientes experiencias preliminares o de tanteo, realizadas con el complejo $[Pd(2,4-dab-Et)Cl_2]$.

- Experiencia 1: Se administró una dosis D-1 de 13 mg/Kg de peso del complejo $[Pd(2,4-dabEt)Cl_2]$ en suero salino (NaCl al 8,5%), lo que supone la administración por vía intraperitoneal de 0,26 mg del complejo/0,5 ml para cada uno de los seis ratones utilizados con 20 g de peso corporal.

Dado que ninguno de los ratones murió en el transcurso de 24 horas, se procedió a una segunda experiencia con una dosis cuatro veces superior a la ensayada.

- Experiencia 2: Se administró a un lote de seis ratones con 17 g de peso corporal una dosis D-2 de $13 \times 4 = 52$ mg/Kg de peso de animal, lo que representó la administración por vía intraperitoneal de 0,884 mg/0,5 ml de suero salino a cada ratón. No habiéndose producido muertes en el transcurso de 24 horas, se procedió a la siguiente experiencia, con una dosis de seis veces la inicial (experiencia 1).

- Experiencia 3: Se administró una dosis D-3 a los ratones de 17 g de peso corporal equivalente a $13 \times 6 = 78$ mg/kg de peso de animal lo que corresponde a la administración intraperitoneal de 1.326 mg/0,5 ml de suero salino a cada ratón. Tampoco se produjo defunción alguna en las primeras 24 horas, procediéndose a la experiencia siguiente.

- Experiencia 4: Se administró una dosis D-4 a dos ratones de 17 g de peso corporal igual a $13 \times 8 = 104$ mg de complejo/Kg de peso de animal, que representa la inyección intraperitoneal de 1,786 mg de complejo/0,5 ml de suero salino a cada ratón. Tampoco se produjo la defunción de ninguno de los ratones en 24 horas, resultando inviable el ensayo de disoluciones más concentradas, lo que llevó a la decisión de no determinar el parámetro DL_{50} .

V.2. Observaciones histopatológicas.

Con objeto de obtener información sobre posibles lesiones tisulares de los parénquimas renales, hepáticos y esplénicos, se procedió al tratamiento de lotes de diez ratones hembras Swiss albinas con el complejo [Pd(2,4-dabEt)Cl₂] y con cis-platino, que se sacrificaron a los cinco días para proceder al estudio histopatológico. Dado que el cis-platino se viene usando a dosis terapéuticas de 50-100 mg de complejo/90 Kg de peso corporal en pacientes humanos, se procedió a ensayar dos dosis, una (d-1) equivalente a 240 mg/90 kg de peso corporal y otra (d-2) diez veces superior a ésta. La dosis d-1 equivale a la administración de 2,66 mg de complejo/Kg de ratón o bien a la inyección intraperitoneal de 0,077 mg de complejo/0,5 ml de suero salino para cada ratón de 29 g de peso corporal. La dosis d-2 corresponde a 26,6 mg de peso/Kg de ratón ó 0,77 ml de complejo/0,5 ml de suero salino para cada ratón de 29 g de peso corporal.

V.3. Inclusión de las muestras.

Una vez sacrificados los animales (de los diferentes lotes) se procedió a la extracción de riñones, bazo e hígado y a su posterior fijación con formol al 10% durante 24 horas.

Las muestras, ya fijadas, fueron incluidas en parafina y cortadas en láminas de 4 μ de espesor, sobre las que se practicaron las siguientes tinciones:

- hemaloxilina - eosina
- tricrómico de Masson
- PAS (ácido periódico de Schiff's)

La observación fue realizada con microscopio fotónico (Olympus).

PARTE C: RESULTADOS Y DISCUSION

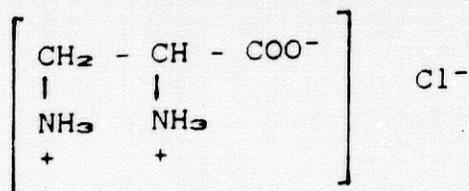
I. - CARACTERIZACION DE LOS LIGANDOS.

Con fines de identificación y caracterización de los diaminoácidos, en su forma comercial, dap H.HCl y dab H.2HCl, y de los diclorhidratos de sus ésteres etílicos, dap Et. 2HCl y dab Et. 2HCl, se procedió al estudio de sus propiedades ácidas y esquema de disociación en medio acuoso y al examen de su espectro infrarrojo, en estado sólido.

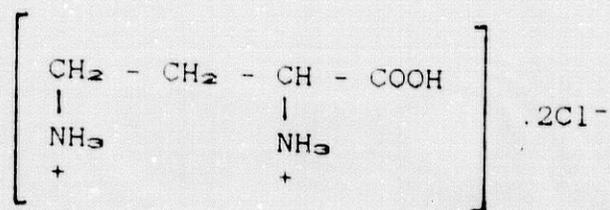
I.1. Valoraciones potenciométricas y conductimétricas.

El esquema de disociación de los referidos productos se investigó mediante el análisis de sus curvas de valoración potenciométrica (con fuerza iónica ajustada I=0,1 M KCl) y conductimétrica (sin ajuste de fuerza iónica).

De acuerdo con la fórmula de 2,3-dap H.HCl

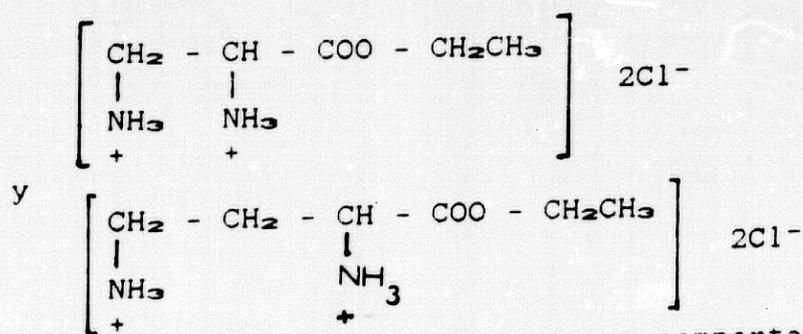


sus curvas de valoración (figura 14) muestran sólo dos etapas correspondientes a los grupos amónicos, $\alpha\text{-NH}_3^+$ y $\beta\text{-NH}_3^+$, de moderada y escasa fuerza ácida, respectivamente, entre intervalos de pH=4,5-8 y 8-10,3. En las curvas del diclorhidrato 2,4-dab H.2.HCl (figura 15), con fórmula:



se aprecia, en primer, lugar la neutralización del grupo α -carboxílico en la región ácida (pH=2,75-6,5), separada netamente de las etapas de valoración de sus grupos amónicos, $\alpha\text{-NH}_3^+$ y $\gamma\text{-NH}_3^+$, mucho más débiles, fundamentalmente en medio alcalino (pH=6,5-9 y 9-10,8). Estas observaciones concuerdan con los resultados aportados con anterioridad ⁴⁷⁻⁵⁰ sobre las propiedades ácidas y esquema de disociación de éstos y otros miembros de la serie homóloga de los ácidos α , γ -diaminocarboxílicos, que han sido revisados por R.B. MARTIN⁴⁷ y por nosotros ⁵¹.

Las curvas potenciométrica y conductimétrica de los diclorhidratos de los ésteres etílicos, dap Et. 2HCl (figura 16) y dab Et. 2HCl (figura 17), con fórmulas:



muestran, como cabría esperar, un comportamiento análogo al descrito para el monoclórhidrato dap H.HCl, debido a que sólo manifiestan las etapas de valoración de sus grupos amónicos, $\alpha\text{-NH}_3^+$ y β - o $\gamma\text{-NH}_3^+$, respectivamente. Con todo, el examen comparado de las curvas de valoración de los diaminoácidos y

sus correspondientes ésteres etílicos revela que para estos últimos los grupos amónicos se valoran a intervalos de pH menores y con pendientes de sus tramos conductimétricos menos positivas, lo que corresponde a una menor fuerza ácida de sus grupos disociables. Esta observación concuerda también con los valores de pK_a , aportados por R. W. HAY y P. J. MORRIS⁴⁰, para los α, ω -diaminoácidos y sus ésteres metílicos (ver tabla VI) que, en todos los casos, representan una mayor fuerza ácida de los grupos amónicos en los productos esterificados.

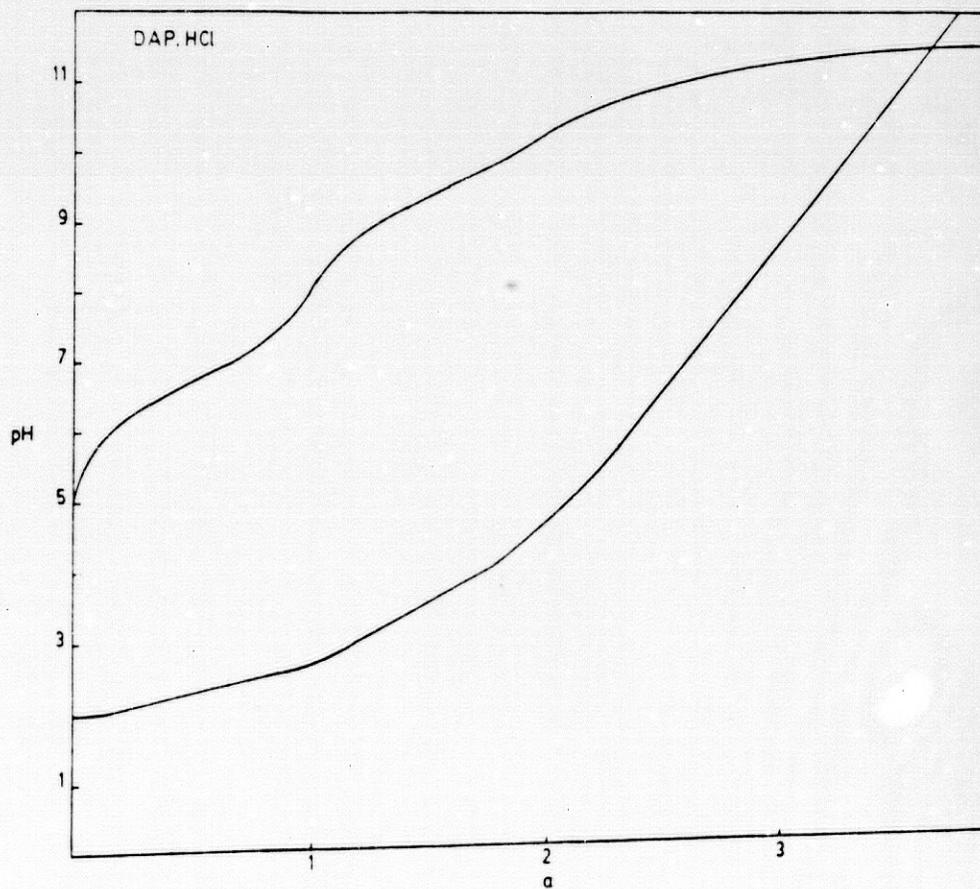


Figura 14.- Curvas potenciometrica y conductimetrica de dap H.HCl ($2,61 \times 10^{-3}M$) frente a KOH (0,102M), a 25°C y fuerza iónica $I=0,1M$ (KCl) en la valoración potenciometrica.

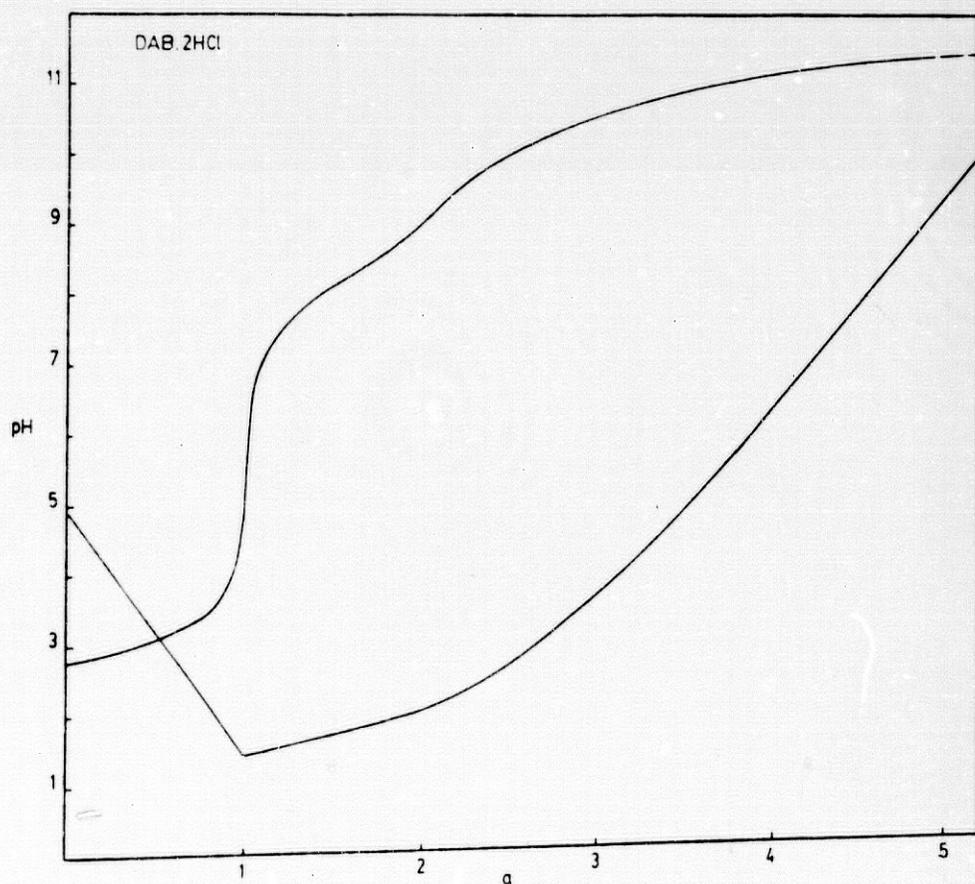


Figura 15.- Curvas potenciométrica y conductimétrica de dab H.2HCl ($2,10 \times 10^{-3} M$) frente a KOH (0,102M) a $25^{\circ}C$. Valoración potenciométrica con $\bar{t}=0,1M(KCl)$.

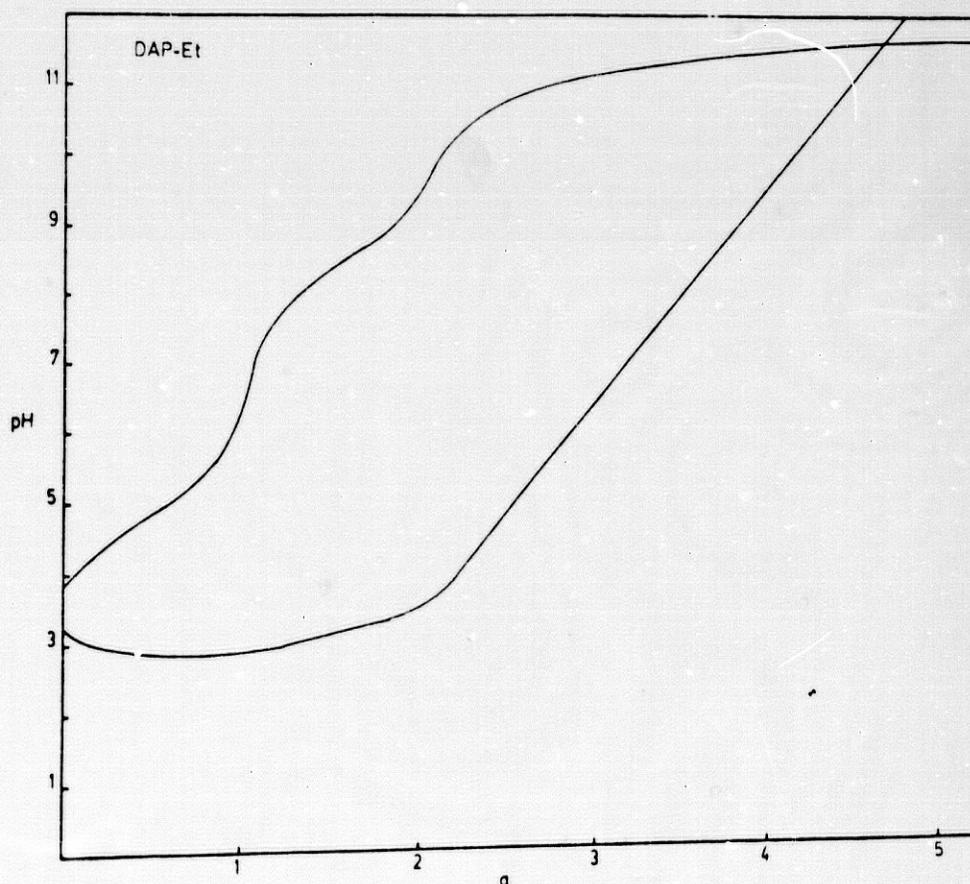


Figura 16.- Curvas potenciométrica y conductimétrica de dap Et. 2HCl ($2,10 \times 10^{-3}\text{M}$) frente a KOH ($0,102\text{M}$) a 25°C . Valoración potenciométrica con $I=0,1\text{M}(\text{KCl})$.

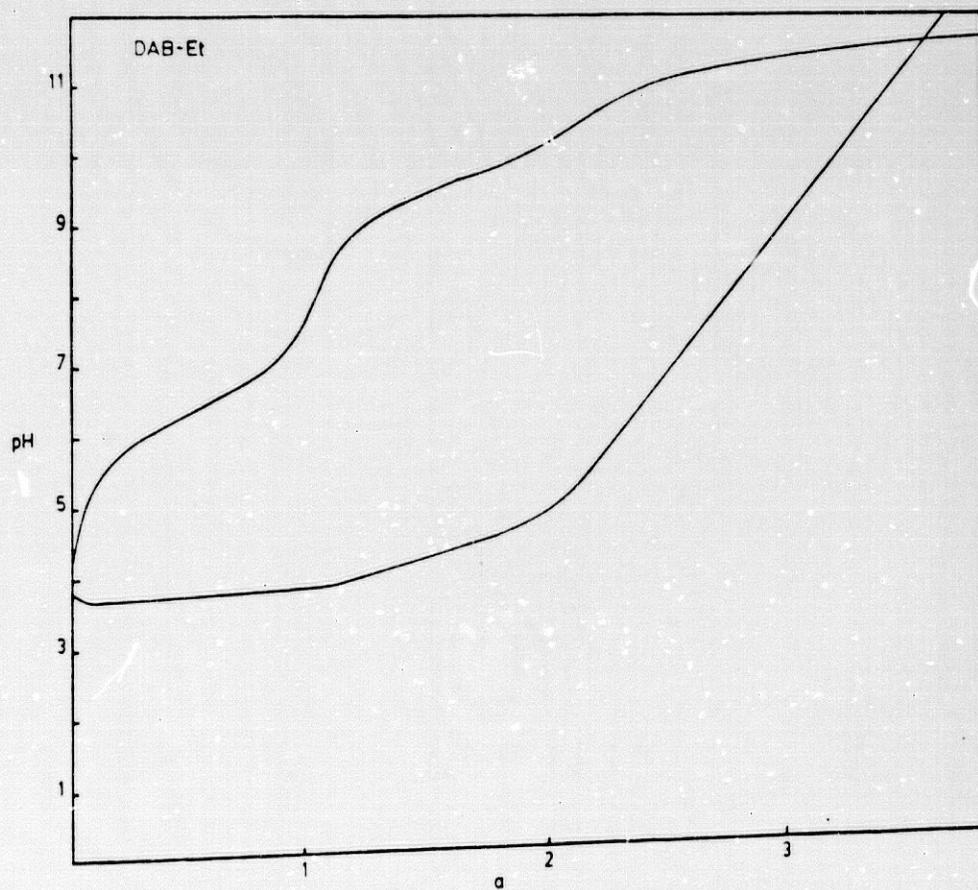


Figura 17.- Curvas potenciométrica y conductimétrica de dab Et. 2HCl ($1,96 \times 10^{-3}\text{M}$) frente a KOH ($0,102\text{M}$) a 25°C . Valoración potenciométrica con $I=0,1\text{M}(\text{KCl})$.

Magnitud relativa de los valores de pK_a .

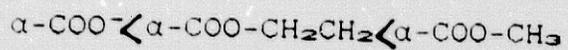
La Tabla VI muestra los valores de pK_a calculados por nosotros, por métodos descritos en la bibliografía⁵¹⁻⁵², para los ésteres etílicos $dap Et. 2HCl$ y $dab Et. 2HCl$, a partir de los datos de sus curvas potenciométricas, junto a los datos de pK_a de las 1,n-diaminas alifáticas⁵², los α,ω -diaminoácidos⁴⁷⁻⁵⁰ y sus ésteres metílicos⁴⁹, aportados por la bibliografía. De su observación se desprende que, en las cuatro series homólogas de compuestos, los valores de $pK_1(N)$ y $pK_2(N)$, crecen con el número de átomos de carbono de la cadena interpuesta entre ambos grupos amónicos, como consecuencia de la separación progresiva de ambos grupos amónicos por una cadena polimetilénica con carácter electrón-donante (efecto + I).

También se observa, con carácter general, que los valores de $pK_1(N)$ y de $pK_2(N)$ para compuestos correspondientes de estas cuatro series homólogas varía según la secuencia general:

$pK(N)$ diamina alif. > $pK(N)$ diaminoácido > $pK(N)$ éster etílico >
 $pK(N)$ éster metílico

Esta secuencia se explica en base a argumentos que conducen a la secuencia de sustituyentes por su carácter

electrón-atrayente:



La disociación de los grupos amónicos de los diaminoácidos se corresponde con la de estos grupos en las diaminas sometidas a la acción del sustituyente α -carboxilato, con un efecto inductivo negativo (-I) que prevalece sobre el efecto mesómero positivo (+M), resultando un grupo electrón atrayente (moderado) que, por su posición debe actuar con mayor eficacia sobre el grupo $\alpha\text{-}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$ que sobre el $\omega\text{-}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$

TABLA 6. VALORES DE pK_a DE 1, n-DIAMINAS ALIFATICAS Y DE LOS DICLORHIDRATOS DE α, ω -DIAMINO ACIDOS Y SUS ESTERES ETILICOS Y METILICOS.

DIAMINAS ⁵²		DIAMINOACIDOS ⁴⁷⁻⁵⁰		ESTERES ETILICOS		ESTERES METILICOS ⁴⁸	
n	$H_3 \dot{N}(CH_2)_n \dot{N}H_3$ 20°C, I=0.1M(KCl)	$H_3 \dot{N}(CH_2)_{n-1} \begin{matrix} CH-NH_3 \\ \\ COOH \end{matrix}$ 25°C, I=0.1M(KCl)	$H_3 \dot{N}(CH_2)_2 \begin{matrix} CH-NH_3 \\ \\ COO-CH_2-CH_3 \end{matrix}$ 25°C, I=0.1M(KCl)	$H_3 \dot{N}(CH_2)_2 \begin{matrix} CH-NH_3 \\ \\ COO-CH_2-CH_3 \end{matrix}$ 25°C, I=0.1M(KCl)	$H_3 \dot{N}(CH_2)_{n-1} \begin{matrix} CH-NH_3 \\ \\ COO-CH_3 \end{matrix}$ 25°C, I=0.1(KCl)	Comp.	$pK_2(N)$
2	en 6.99 10.08	dapH 6.67 9.62	dapEt 4.88 8.32	dapMe 4.41 8.25	Comp. $pK_1(N)$ $pK_2(N)$	dapMe 4.41 8.25	
3	pn 8.64 10.62	dabH 8.17 10.42	dabEt 6.35 9.50	dabMe 5.87 8.66	OrnMe 6.50 8.32(?)		
4	bn 9.35 10.80	OrnH 8.74 10.77	-	-	LysMe 6.96 10.25(?)		
5	pen 10.02 10.92	LysH 9.12 10.90	-	-	-		
8	On 10.10 11.00	-	-	-	-		

* pK_a (COOH) = 1.30 (dapH), 1.45 (dabH), 1.75 (OrnH) y 2.20 (LysH)

En los ésteres metílicos, por ejemplo, el grupo α -carboxilato de los diaminoácidos se reemplaza por el grupo α -metoxicarbonilo, $-\text{CO}-\text{OCH}_3$, no cargado negativamente, donde su efecto $-I$ está ahora mucho menos compensado por su efecto $+M$, resultando ser éste último un grupo electron-atrayente mucho más efectivo que el grupo α -carboxilato⁴⁹. En consecuencia, los grupos amónicos de los ésteres metílicos son más ácidos (tienen $\text{pK}(\text{N})$ menores) que los correspondientes de los iones diamoniocarboxilatos. Una compensación análoga, pero menos efectiva, se debe dar en el grupo etoxicarbonilo $-\text{CO}-\text{OCH}_2-\text{CH}_3$, de los ésteres etílicos, ya que el grupo etilo es más dador que el metilo, de modo que los valores de $\text{pK}(\text{N})$ de los ésteres etílicos resultan menores que los correspondientes iones diamoniocarboxilatos, pero algo mayores que los de sus respectivos ésteres metílicos, tal como se aprecia en la Tabla VI, con la secuencia general:

$$\text{pK}(\text{N})_{\text{diaminoácido}} > \text{pK}(\text{N})_{\text{éster etílico}} > \text{pK}(\text{N})_{\text{éster metílico}}$$

Es importante notar que la magnitud de $\text{pK}_1(\text{N})$ y $\text{pK}_2(\text{N})$ en los compuestos de la Tabla VI no guarda una relación directa con la carga de las especies que se disocian, ya que la carga negativa del grupo α -carboxilato debiera, en tal caso, reflejarse en valores de $\text{pK}(\text{N})$ de los diaminoácidos mayores que los de las correspondientes diaminas, mientras que resulta lo contrario. Asimismo, debe observarse que las especies que disocian los grupos amónicos en las diaminas y en los ésteres

(etilicos y metílicos) de los diaminoácidos tienen la misma carga iónica, pese a que el valor de $pK_1(N)$ y $pK_2(N)$ es considerablemente menor en los compuestos esterificados respecto a las diaminas correspondientes. Otra circunstancia a tener en cuenta es que en las diaminas alifáticas ambos grupos amónicos son siempre equivalentes, mientras que en los derivados con un grupo α -carboxilato o α -COO-R dejan necesariamente de serlo en razón de la asimetría molecular que tales sustituyentes introducen en el esqueleto molecular de las diaminas progenitoras.

Asignación de los valores de $pK(N)$

Una primera aproximación que tenga en cuenta la proximidad del sustituyente α -COO⁻ o α -COO-R al grupo α -NH₃⁺ puede llevar a asignar el menor valor de $pK_1(N)$ de los diaminoácidos y sus ésteres a dicho grupo amónico y el valor de $pK_2(N)$ al grupo amónico terminal, referido, en general, como ω -NH₃⁺, más distante del sustituyente electrón atrayente (α -COO⁻ o α -COO-R). Sin embargo, esta asignación de valores de $pK(N)$ es incorrecta porque no tiene en cuenta la interacción mutua que ejercen los grupos amónico/aminico entre sí. Para ilustrar tales efectos, la Tabla VII muestra la diferencia entre los valores de pK_a , $\Delta pK(N)$, de los grupos amónicos en las diaminas alifáticas, en los diaminoácidos y en sus ésteres etílicos y metílicos, que se representan en la figura 18 en función del número de átomos de carbono interpuestos entre ambos en el esqueleto molecular. Con salvedad de los datos relativos a

los ésteres metílicos de ornitina y lisina, que debieran confirmarse en las cuatro series de compuestos considerados, se observa, con carácter general, una disminución de $\Delta pK(N)$ al avanzar en cada una de ellas

Tabla VII. Diferencia de pK_a , $\Delta pK(N)$, de los grupos amónicos ($-\overset{+}{N}H_3$) en 1,n-diaminas alifáticas y en los diclorhidratos de α -w-diaminoácidos y sus ésteres élicos y metílicos (ver Tabla VI).

n	Comp	$\Delta pK(N)$	Comp	$\Delta pK(N)$	Comp	$\Delta pK(N)$	Comp	$\Delta pK(N)$
2	en	3.09	dapH	2.95	dapEt	3.44	dapMe	3.84
3	pn	1.98	dabH	2.25	dabEt	3.15	dabMe	2.79
4	bn	1.45	OrnH	2.03	OrnEt	-	OrnMe	1.82(?)
5	pen	0.94	LysH	1.78	LysEt	-	LysMe	3.29(?)
8	on	0.90	-	-	-	-	-	-

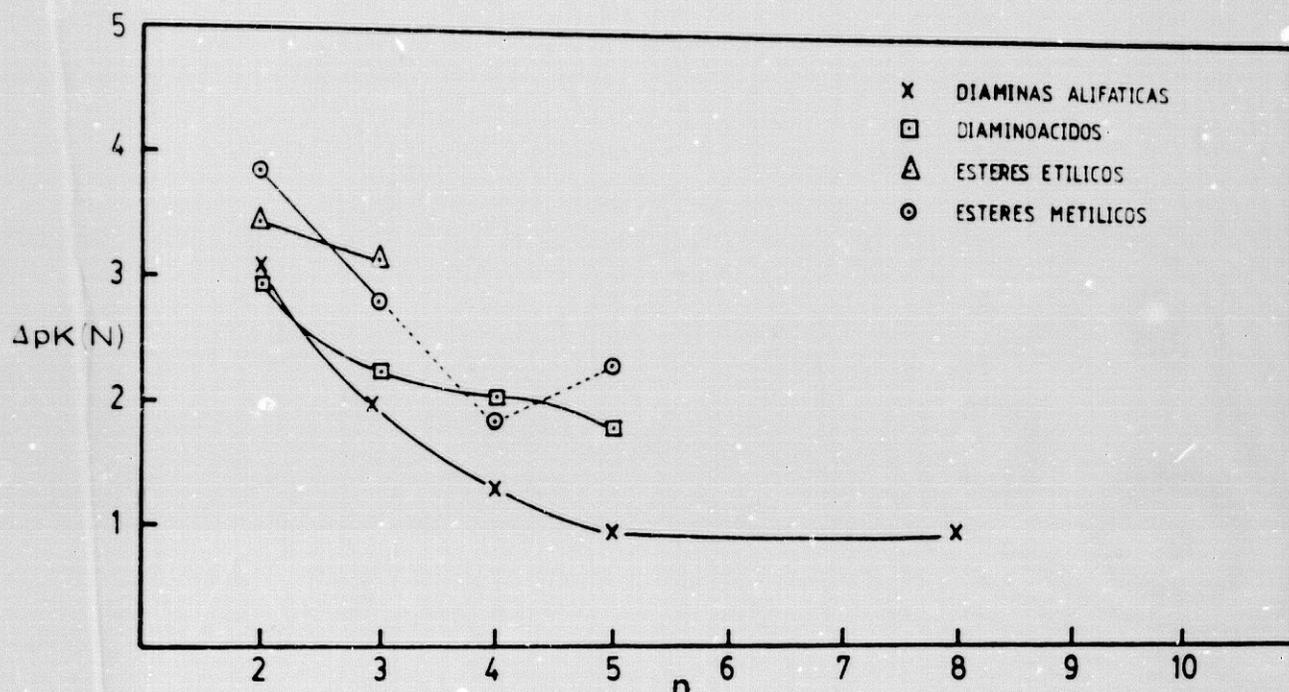


Figura 18. Representación de $\Delta pK(N)$ frente al número de átomos de carbono interpuestos entre los grupos $-NH_2$ de las diaminas alifáticas y los correspondientes diaminoácidos y sus ésteres etilicos y metilicos.

En las diaminas alifáticas el valor de $\Delta pK(N)$ desciende, pero manteniéndose por encima de 0.6, el valor estadístico para la diferencia de pK_a de dos grupos equivalentes y no interactuantes, lo que significa que los grupos amónicos del ión etilendiamonio son los más interactuantes y tal interacción decrece al avanzar en la serie de diaminas, sin llegar a desaparecer para el ión 1,8-diamoniooctano.

En los diaminoácidos y sus ésteres la presencia de sustituyentes α -carboxilato o α -COO-R, respectivamente, anula la posibilidad de equivalencia de sus grupos amónicos pero cabe

pensar que en estas series de compuestos deben también actuar las interacciones entre sus grupos amónicos, $\alpha\text{-NH}_3^+$ y $\omega\text{-NH}_3^+$, análogas a las que se dan en las diaminas alifáticas. A tales interacciones deben sumarse los efectos electrón-atrayentes de los sustituyentes $\alpha\text{-COO}^-$ y $\alpha\text{-COO-R}$. El análisis de las constantes microscópicas de equilibrio entre los α,ω -diaminoácidos⁴⁷ lleva a la conclusión de que sus especies mono-protonadas existen en la forma $[\alpha\text{-NH}_2, \omega\text{-NH}_3^+]$ en un 50% para dap, un 83% para dab y 90% para Orn y Lys. Esto significa que la acidez de los grupos $\alpha\text{-NH}_3^+$ y $\beta\text{-NH}_3^+$ en 2,3-dap es prácticamente la misma, mientras que la acidez del grupo $\alpha\text{-NH}_3^+$ de 2,4-dab y los miembros siguientes de su serie homóloga es cada vez mayor. La escasa (aparentemente nula) diferencia de acidez de los grupos amónicos en 2,3 dap se explica por el moderado efecto electrón atrayente del sustituyente $\alpha\text{-COO}^-$, respecto al efecto del mismo signo (-I) de sus grupos -NH_3^+ , que se estima seis veces superior.

En los ésteres etílicos y metílicos el efecto electrón atrayente de los grupos $\alpha\text{-COO-R}$ (con $\text{R}=\text{-CH}_2\text{CH}_3, \text{-CH}_3$) es también fuerte, por lo que los productos esterificados deben tender a disociar preferentemente el grupo $\alpha\text{-NH}_3^+$ antes que el grupo amónico terminal. Esta tendencia debe ser más acusada en los ésteres metílicos que en los etílicos, ya que el efecto +I del grupo metilo es menor que el del grupo etilo, por lo que parece razonable pensar que en los ésteres etílicos, 2,3-dap-Et y 2,4-dab-Et, el grupo $\alpha\text{-NH}_3^+$ debe ser el principal, pero no el único, responsable del valor de $\text{pK}_1(\text{N})$, mientras que el valor de

$pK_2(N)$ de estos compuestos reflejaría mayoritariamente la disociación de su grupo amónico terminal. La cuantificación de esta asignación requiere la determinación de las constantes microscópicas de los correspondientes procesos de disociación, que no puede abordarse con los datos potenciométricos aportados en el presente estudio.

I.2. Espectros de infrarrojo.

Las figuras 19 a 22 muestran los espectros IR de los clorhidratos de los diaminoácidos y sus ésteres etílicos que se investigan en el presente estudio. Las frecuencias de los grupos funcionales características de estos compuestos se incluyen en las Tablas VIII y IX.

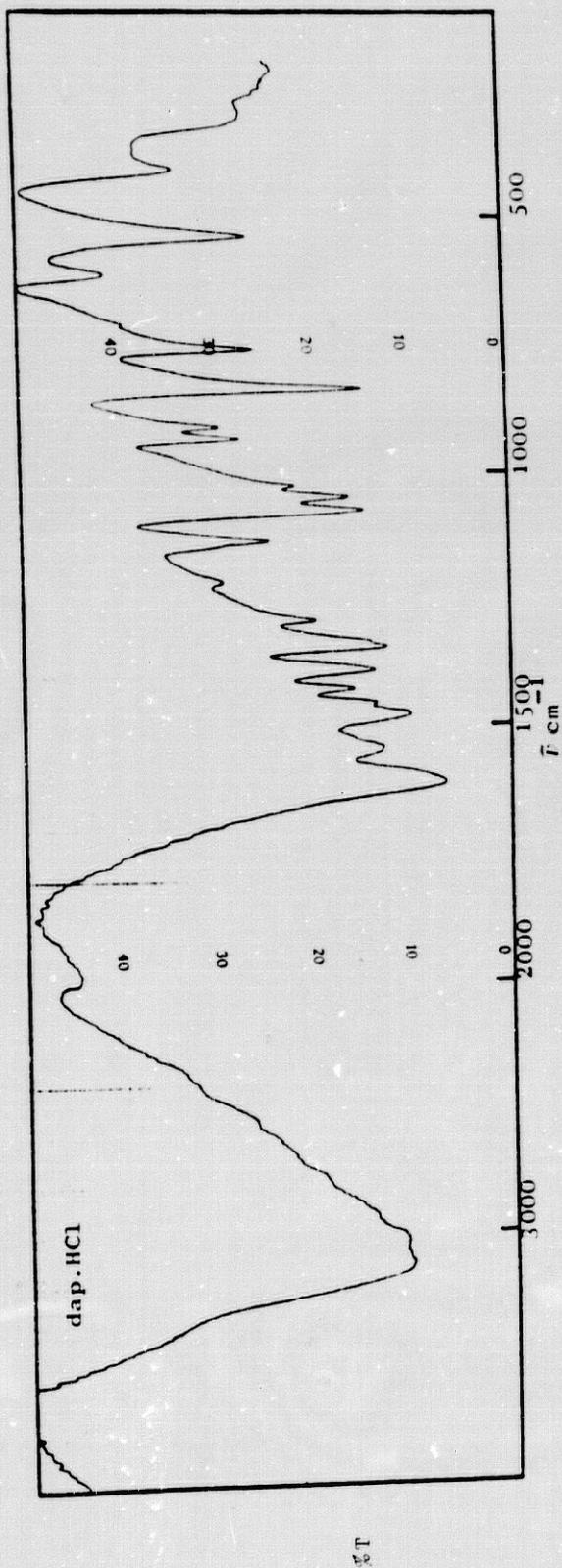


Figura 19.- Espectro IR de 2,3-dap H.Cl (comprimido de KBr)

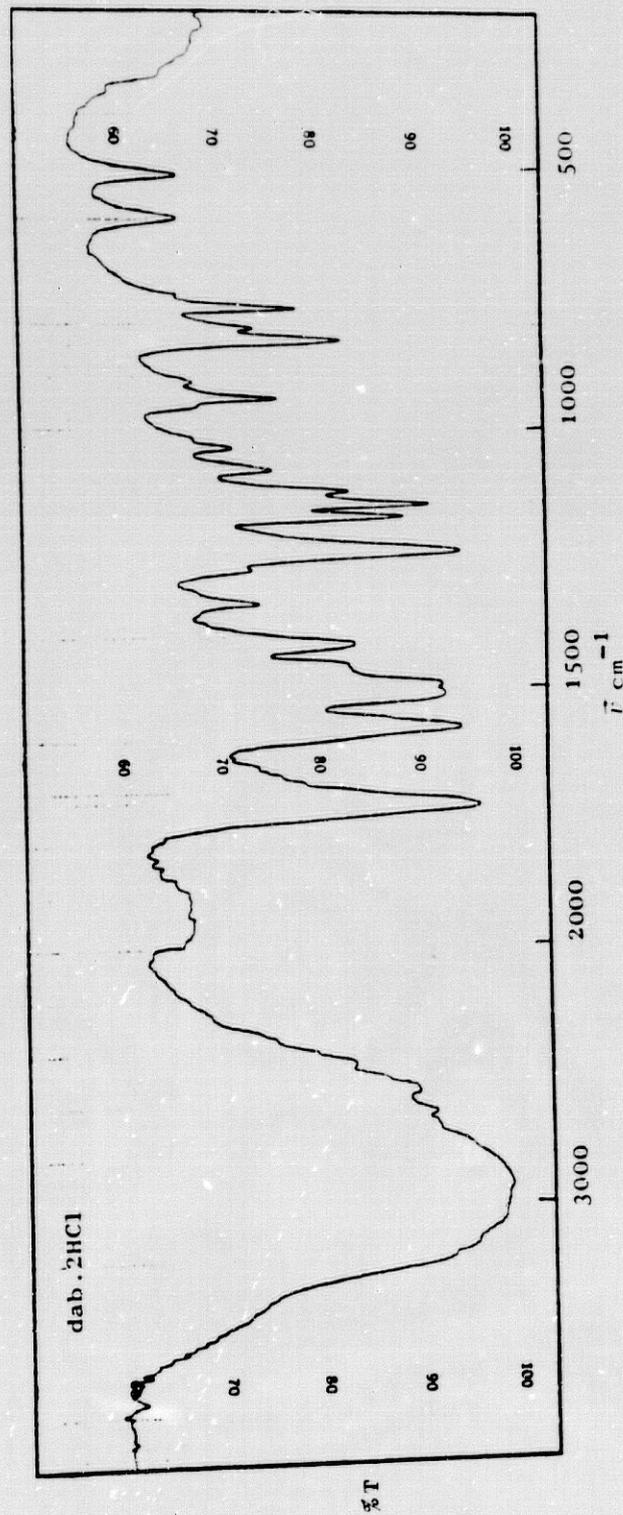


Figura 20.- Espectro IR de 2,4-dab.2HCl (comprimido de KBr).

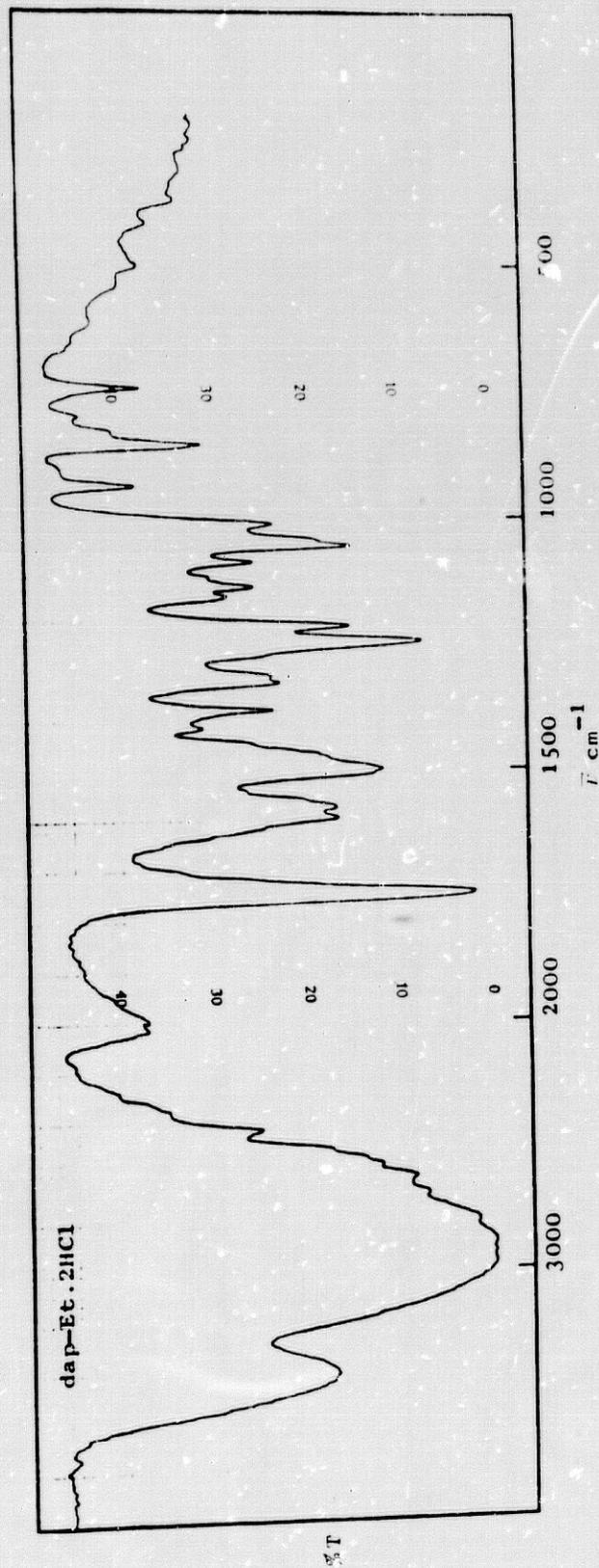


Figura 21.- Espectro IR de 2,3-dap·2HCl (comprimido de KBr).

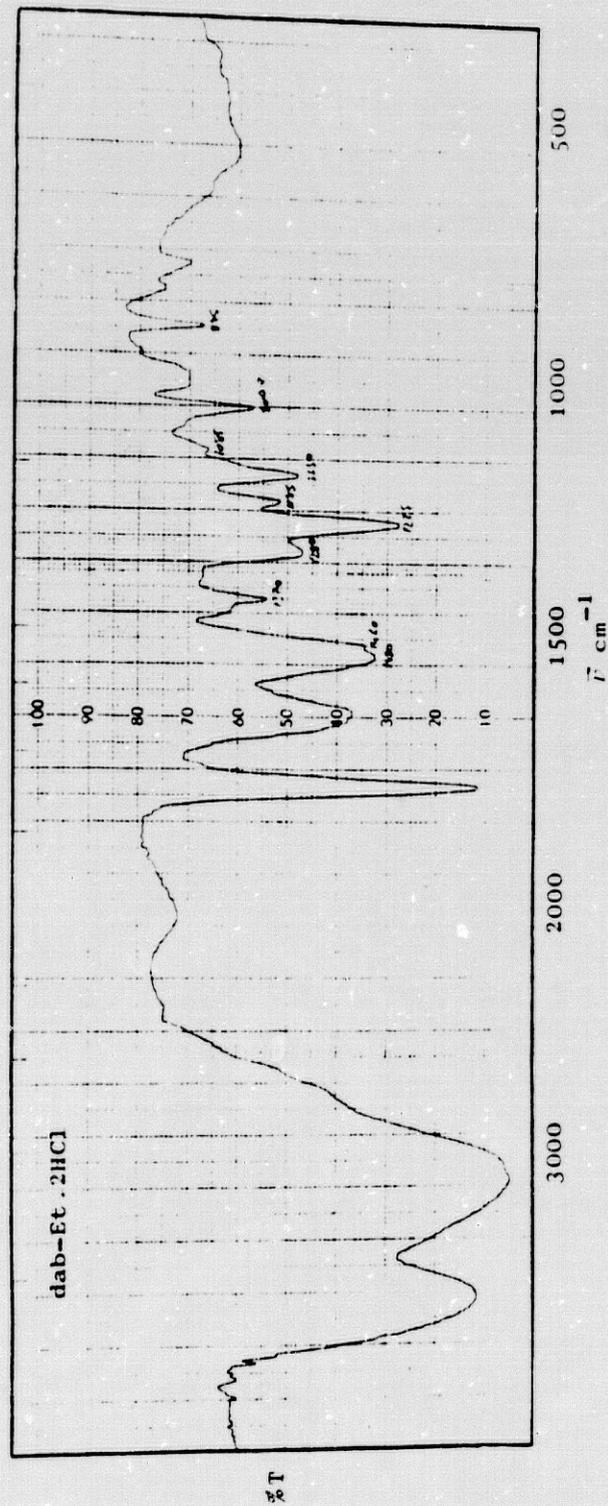


Figura 22.- Espectro IR de 2,4-dabEt-2HCl (comprimido KBr)

Tabla VIII.- Frecuencias (cm^{-1}) características en los espectros IR de 2,3-dapH.HCl y 2,4-dabH-2HCl.

Modo vibracional	2,3-dapH.HCl	2,4-dabH.2HCl
$\nu(\text{C}=\text{O})$ (-COOH)	-	1730
$\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ (-COO ⁻)	1610	-
$\delta_{\text{a}}(\text{NH}_3^+)$	1590 (h)	1575
	}1540	}1520
$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$	}1480	}1495
$\nu(\text{C}-\text{O})+\delta(\text{OH})$ (-COOH)	-	1415
$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$	1385	-
$\delta(\text{OH})$ (-COOH)	-	1235
$\rho r(\text{NH}_3^+)$	835	830
	760	770

Tabla IX. Frecuencias (cm^{-1}) características en los espectros IR de 2,3-dapEt-HCl y 2,4-dabEt.2HCl.

Modo vibracional	2,3-dapEt-2HCl	2,4-DabEt.2HCl
$\nu(\text{C}=\text{O})$ (éster)	1742	1735
	}1595	~1600
$\delta_{\text{a}}(\text{NH}_3^+)$	}1575	
	}1500	}1500(h)
$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$	}1475h	}1480
$\rho r(\text{NH}_3^+)$	850	845

Los espectros IR de los clorhidratos de los diaminoácidos, dapH-HCl y dabH-2HCl, muestran una intensa absorción entre 3200 y 2000 cm^{-1} , con una serie de picos característicos de muchos aminoácidos conteniendo el grupo amónico primario $\text{R}-\text{NH}_3^+$. En ambos espectros se aprecian, generalmente bien, diversas bandas debidas a modos de

deformación (δ_{as} , asimétrica; δ_s , simétrica; ρ_r , balanceo) de este grupo funcional, destacando el desdoblamiento de las bandas δ_s y ρ_r de los grupos $\alpha\text{-NH}_3^+$ y $\omega\text{-NH}_3^+$, fenómeno señalado por BELLAMY²³ para la banda δ_s de los ácidos α , β -diamino-propiónico y -butírico. Debido al estado de monohidrato de 2,3-dapH y al diclorhidrato de 2,4-dabH, sus espectros IR difieren en la presencia de las bandas características de su grupo carboxilato o carboxílico, respectivamente (ver Tabla VIII).

Los espectros de los diclorhidratos de los ésteres etílicos, 2,3-dapEt-2HCl y 2,4-dabEt.2HCl muestran también las absorciones debidas a sus grupos $\alpha\text{-NH}_3^+$ y $\omega\text{-NH}_3^+$, con desdoblamiento de al menos la banda de absorción del modo $\delta_s(\text{NH}_3^+)$. En estos espectros se aprecia una muy intensa absorción del modo $\nu(\text{C=O})$ del grupo funcional éster (a 1742 y 1735 cm^{-1} , respectivamente). En el espectro de 2,4-dabEt-2HCl (figura 22) no se observan las bandas de los modos $\nu(\text{C=O})+\delta(\text{OH})$ (1415 cm^{-1}) y $\delta(\text{OH})$ (1235 cm^{-1}) del espectro del diclorhidrato del ácido (figura 20), donde esta última se reconoce fácilmente como la absorción más intensa de la región de 1200-1300 cm^{-1} . Además, la comparación de estos dos espectros de estos compuestos revela el ligero desplazamiento hacia frecuencias más altas que se ocasiona en la banda $\nu(\text{C=O})$ al pasar del ácido carboxílico al éster etílico, lo que es debido al efecto +I del sustituyente etilo amortiguado por el carácter electronegativo del oxígeno al que se une.

El conocimiento de los espectros IR de los diclorhidratos de ligandos constituye una valiosa ayuda para la interpretación de los espectros IR de los complejos que originan en su reacción con dicloruro de paladio.

II.- PROPIEDADES DE LOS COMPLEJOS DE PALADIO(II).

Desde el punto de vista químico, los complejos de paladio(II) incluidos en el presente estudio han sido caracterizados en estado sólido (por sus espectros IR y su estabilidad térmica) y en disolución (por sus valoraciones potenciométrica y conductimétrica frente a KOH).

II.1. Espectros IR y estabilidad térmica.

Las figuras 23 y 24 muestran los espectros IR de los diclorocomplejos de paladio(II) con los diaminoácidos 2,3-dapH y 2,4-dabH, respectivamente. En la Tabla X figuran las asignaciones de las frecuencias de estos espectros a los modos vibracionales correspondientes.

En relación con los espectros IR de los clorhidratos de los ligandos 2,3-dapH.HCl (figura 19) y 2,4-dab-H.2HCl (figura 20), los espectros de los complejos de ambos α,ω -diaminoácidos con dicloruro de paladio(II) muestran entre 3300 y 3000 cm^{-1} tres picos definidos debidos a modos de tensión asimétrica y simétrica de grupos amino ($-\text{NH}_2$), en vez de grupos amónicos ($-\overset{\dagger}{\text{N}}\text{H}_2$). La presencia de grupos $-\text{NH}_2$ en los complejos $[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$ y $[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$ se manifiesta también en estos espectros por la presencia de bandas asignables a los modos de deformación de tijera (ρ), torsión (ρ_t), aleteo (ρ_w) y balanceo (ρ_r) de los grupos amino. Ambos sólidos

dan, además, una banda definida del modo de tensión $\nu(\text{C=O})$ del grupo carboxílico del correspondiente diaminoácido, pero no las bandas de tensión $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ y $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ que, por ejemplo, se registran en el espectro IR de 2,3-dapH.HCl (figura 19 y Tabla VIII).

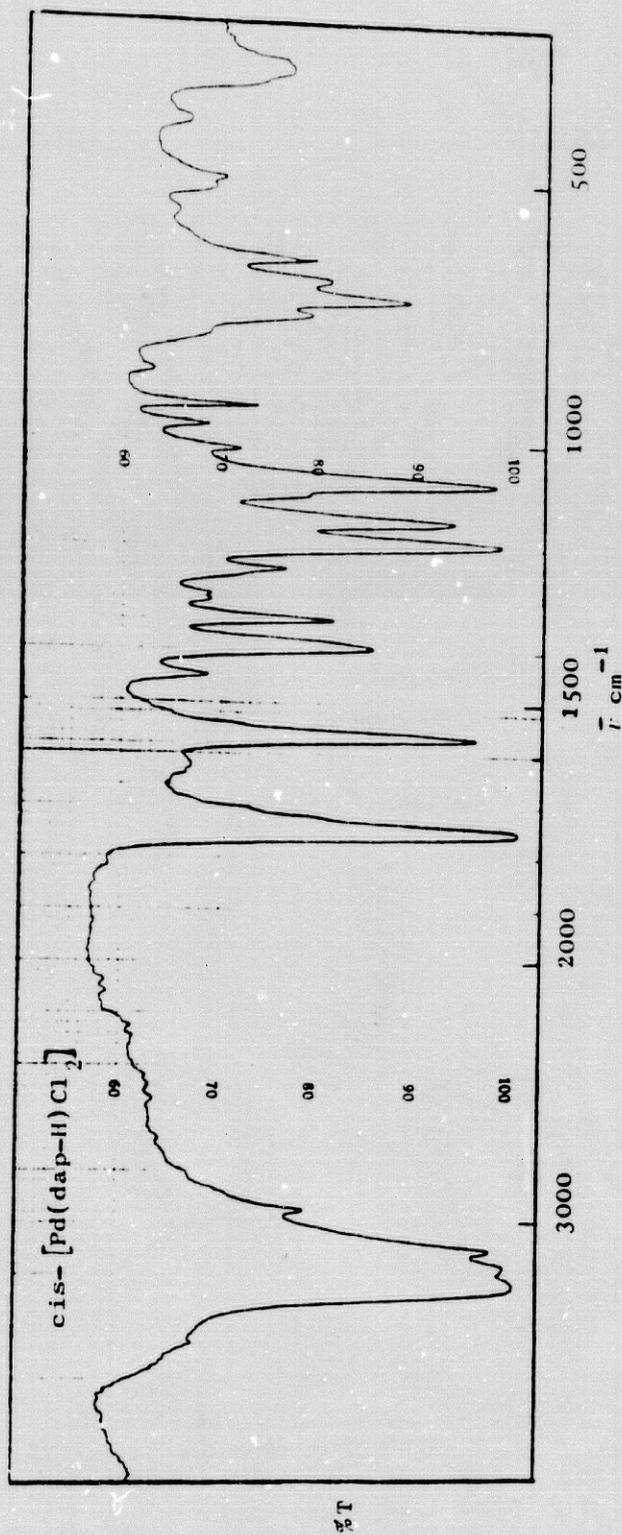


Figura 23.- Espectro IR del complejo $[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$ (comprimido KBr).

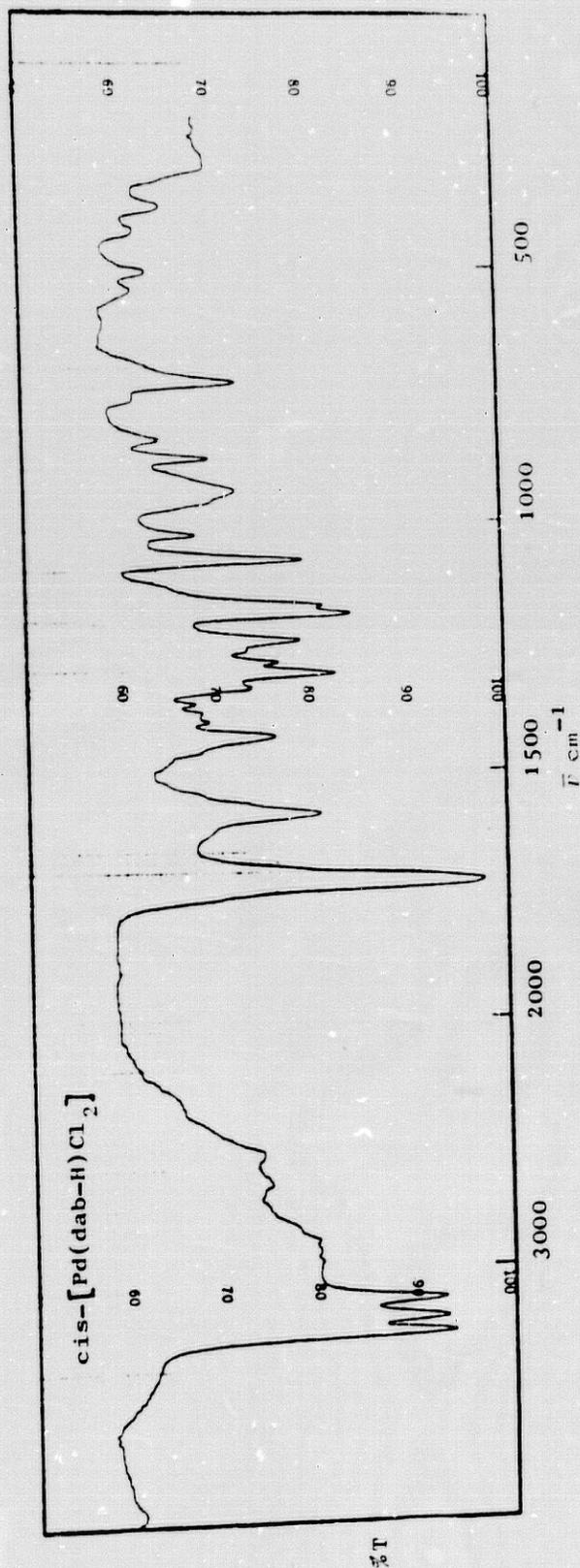


Figura. 24.- Espectro IR del complejo $[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$
(comprimido KBr).

Tabla X.- Asignación de frecuencias características en los espectros IR de $[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$ y $[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$.

<u>Modo vibracional</u>	<u>$[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$</u>	<u>$[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$</u>
$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$	3250	3260
	3180	3200
$\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$	3100	3120
$\nu(\text{C=O})(-\text{COOH})$	1750 (1757)*	1720 (1715)**
$\delta(\text{NH}_2)$	1570 (1590)*	1580 (1588)**
$\nu_{\text{e}}(\text{NH}_2)$	{ 1195 1150	{ 1185 1165
$\rho_{\text{ij}}(\text{NH}_2)$	1080	1080
$\rho_{\text{r}}(\text{NH}_2)$	730	730
$\nu(\text{Pd-N})$	{ 560 520, 500	{ 550 510
$\nu(\text{Pd-Cl})$	~ 300	~ 300

* $[\text{Pt}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$ en ref. 37** $[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$ en ref. 37.

La Tabla X muestra las frecuencias de bandas muy débiles entre 500 y 600 cm^{-1} , asignables al modo de tensión $\nu(\text{Pd-N})$ debidas a la coordinación de los grupos $\alpha\text{-NH}_2$ y $\omega\text{-NH}_2$ al paladio(II). Estas bandas pueden compararse con la registrada a 550 cm^{-1} en el espectro IR del complejo trans-bis (glicinato) paladio(II), $\text{trans-}[\text{Pd}(\text{gly})_2]^{2+}$. Pese a la absorción del diluyente (KBr), por debajo de 450 cm^{-1} en los espectros de los complejos $[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$ y $[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$, se observa una absorción hacia 300 cm^{-1} que debe incluir las dos bandas del modo de tensión $\nu(\text{Pd-Cl})$ esperadas para la agrupación cis-PdCl_2 . El ión $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ plano-cuadrado da una banda $\nu(\text{Pd-Cl})$ a 310 cm^{-1} del modo simétrico ν_1 .⁵⁴

En la Tabla X se indican también, como referencia, las frecuencias de los modos $\nu(\text{C=O})$ de -COOH y $\delta(\text{NH}_2)$ de los complejos de platino(II) análogos a los complejos "ácidos" de paladio investigados. Aunque la comparación de tales frecuencias debe ser dependiente de la estructura cristalina y molecular de dichos sólidos, por el momento desconocida, en general se observa que los complejos de Pt(II) absorben a frecuencias ligeramente mayores que los análogos de Pd(II), de acuerdo con la esperada estabilidad relativa de estas combinaciones, que debe ser algo mayor para los derivados de platino(II).

Los espectros IR de los complejos $[\text{Pd}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$ (figura 25) y $[\text{Pd}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$ (figura 26) son, en líneas generales, comparables a los de sus análogos con el

diaminoácido no esterificado, sobre todo en lo relativo a los modos de tensión y deformación de los grupos amino ($\alpha\text{-NH}_2$ y $\omega\text{-NH}_2$) y de tensión de los enlaces Pd-N y Pd-Cl (Tabla XI).

En los espectros de los complejos con el diaminoácido esterificado, la frecuencia del modo $\nu(\text{C=O})$ de la función éster aparece a 1735 cm^{-1} , valor muy próximo o igual al que aparece la misma banda en los complejos análogos de platino(II).³⁷ El mismo valor se observa en el espectro del clorhidrato 2,4-dab-Et.2HCl, aunque esta banda aparece a 1742 cm^{-1} en el espectro de su homólogo inferior 2,3-dapEt.2HCl.

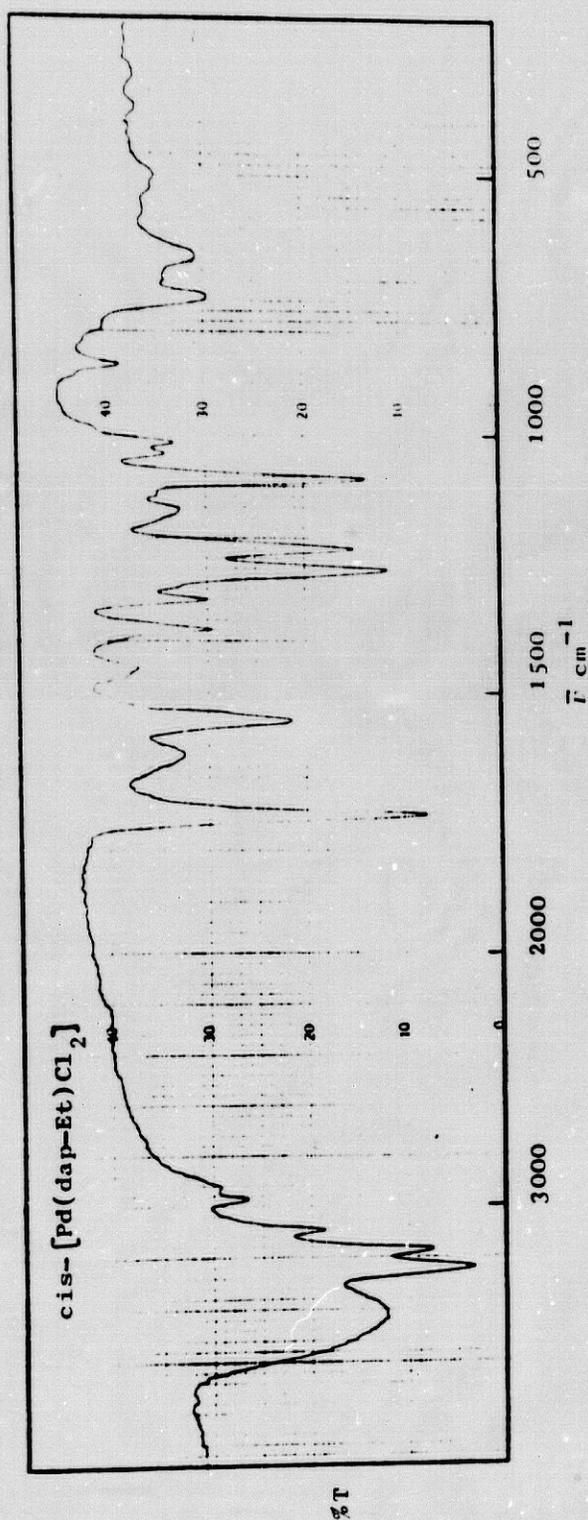


Figura 25.- Espectro IR del complejo $[\text{Pd}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$
(Comprimido KBr).

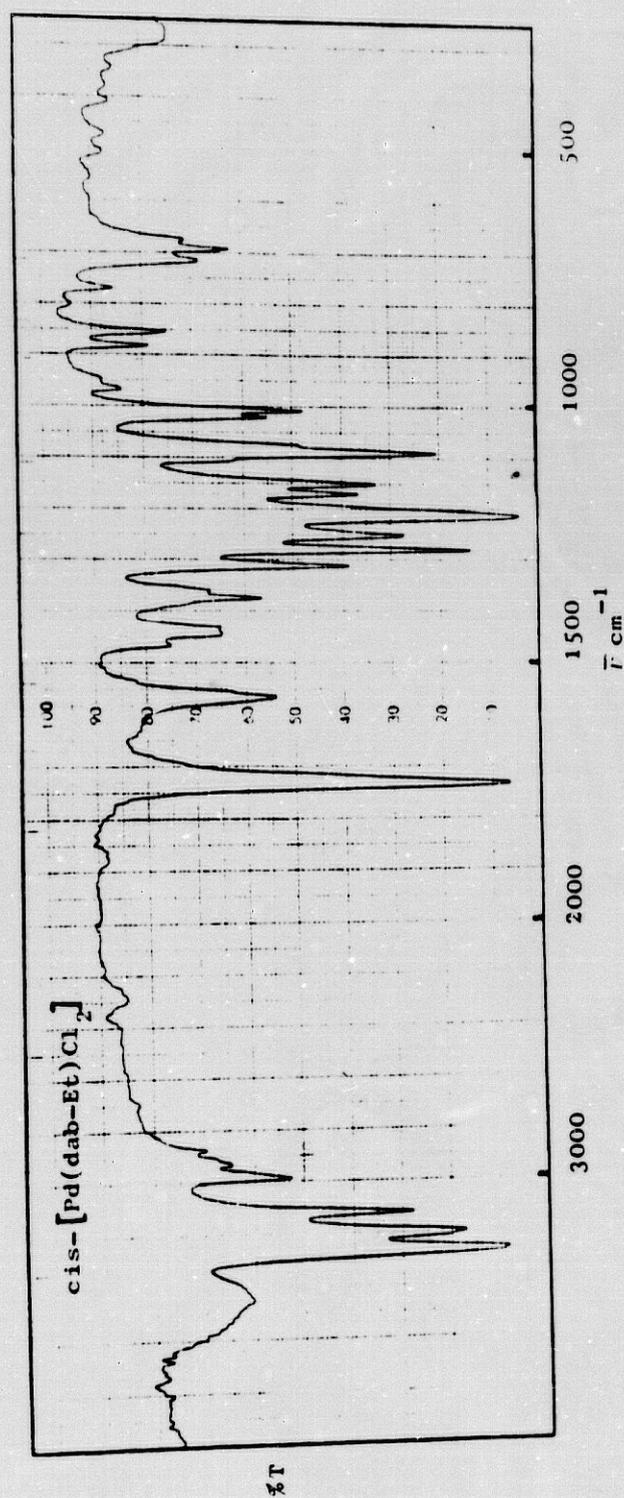


Figura 26.- Espectro IR del complejo [Pd(2,4-dabEt)Cl₂]
(Comprimido KBr).

Tabla XI.- Asignación de frecuencias características en los espectros IR de los complejos $[\text{Pd}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$ y $[\text{Pd}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$.

Modo vibracional	$[\text{Pd}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$	$[\text{Pd}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$
$\nu(\text{NH}_2)$	3240	3270
	3170	3200
$\nu(\text{NH}_2)$	3090	3120
$\nu(\text{C=O})$ (éster)	1735 (1735)*	1735 (1732)**
$\delta(\text{NH}_2)$	1555 (1565)*	1565 (1602)**
$\rho(\text{NH}_2)$	1260	1270, 1250
$\nu(\text{C-O})$ (éster)	1220	1215
$\rho_w(\text{NH}_2)$	1085	1085
$\rho_r(\text{NH}_2)$	735	~700
$\nu(\text{Pd-N})$	560	550
	520	510
$\nu(\text{Pd-Cl})$	~300	≤ 300

* $[\text{Pt}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$ en ref. 37.

** $[\text{Pt}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$ en ref. 37.

La presencia de bandas debidas a los grupos $\alpha\text{-NH}_2$ y $w\text{-NH}_2$ y de los modos de tensión $\nu(\text{Pd-N})$ y $\nu(\text{Pd-Cl})$ en los espectros de los productos de reacción de dicloruro de paladio y de los aminoácidos (2,3-dapH y 2,4-dabH) y sus ésteres etílicos (2,3-dapEt y 2,4-dab-Et) concuerda con lo esperado

para la quelación de los grupos amino de tales ligandos orgánicos al paladio(II) en complejos de fórmula $[\text{Pd}(\text{diaminoácido})\text{Cl}_2]$ y $[\text{Pd}(\text{diaminoácido -Etilo})\text{Cl}_2]$, respectivamente.

Las curvas de TG-ATD de los cis-diclorocomplejos de paladio(II) con diaminoácidos 2,3-dapH y 2,4-dabH (figuras 27 y 28, respectivamente) y sus ésteres etílicos 2,3-dapEt y 2,4-dabET (figuras 29 y 30, respectivamente) son poco reveladoras por el marcado solapamiento de las pérdidas de peso en el curso de su descomposición térmica. Con todo, el análisis termogravimétrico de los cuatro sólidos complejos de paladio(II) pone de manifiesto que se trata de compuestos de considerable estabilidad térmica, ya que inician su descomposición pirolítica entre 220°C ($[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$) y 245°C ($[\text{Pd}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$).

El residuo final de tales descomposiciones pirolíticas debe ser PdCl_2 . Así, por ejemplo, la descomposición de $[\text{Pd}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$ deja a 600°C un residuo del 46%, algo menor que el calculado para la formación de PdCl_2 (57%), lo que resulta aceptable si se tiene en cuenta las pérdidas que debe producir la pirolisis del ligando orgánico. La estabilidad térmica de los complejos de paladio(II) investigados es, desde luego, un factor de considerable valor práctico en orden a la posible utilización de tales compuestos como sustancias medicamentosas, ya que facilitaría las operaciones técnicas necesarias para su desecación, esterilización y posterior

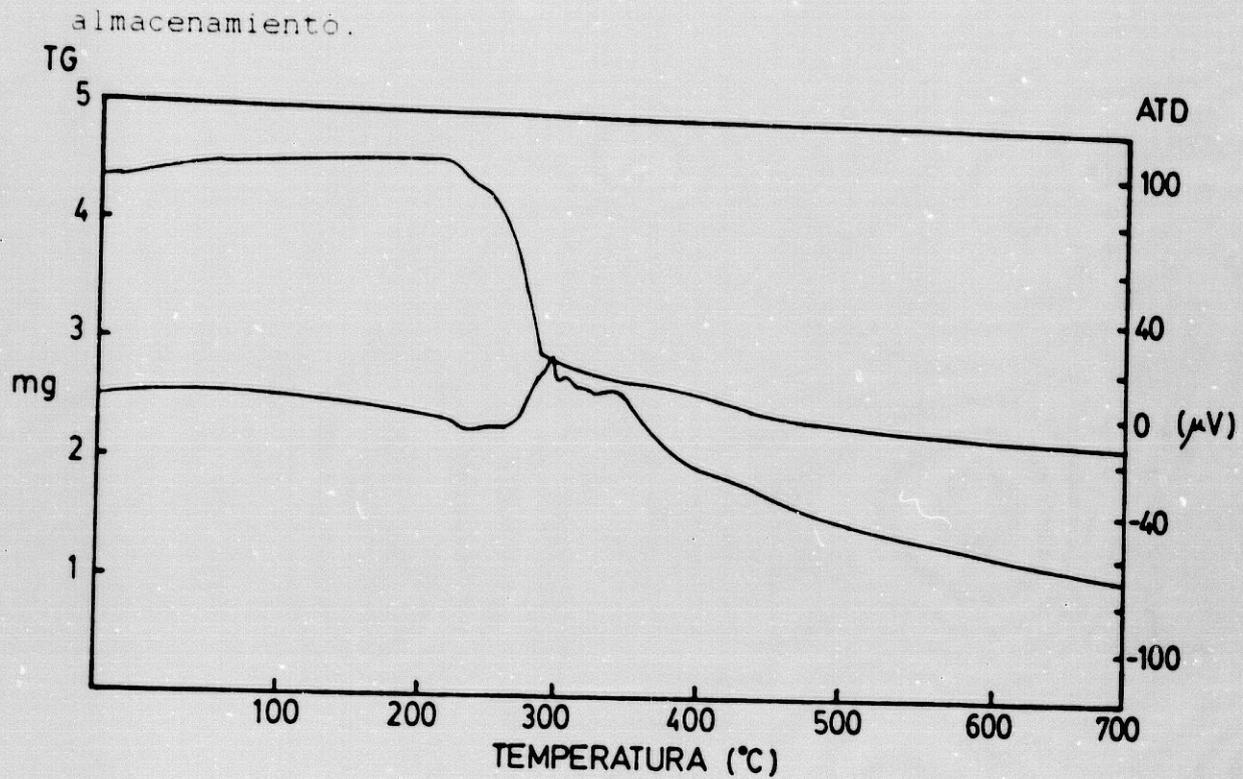


Figura 27.- Curvas de TG-ATD de $[\text{Pd}(2,3\text{-dapH})\text{Cl}_2]$ (4,35 mg).

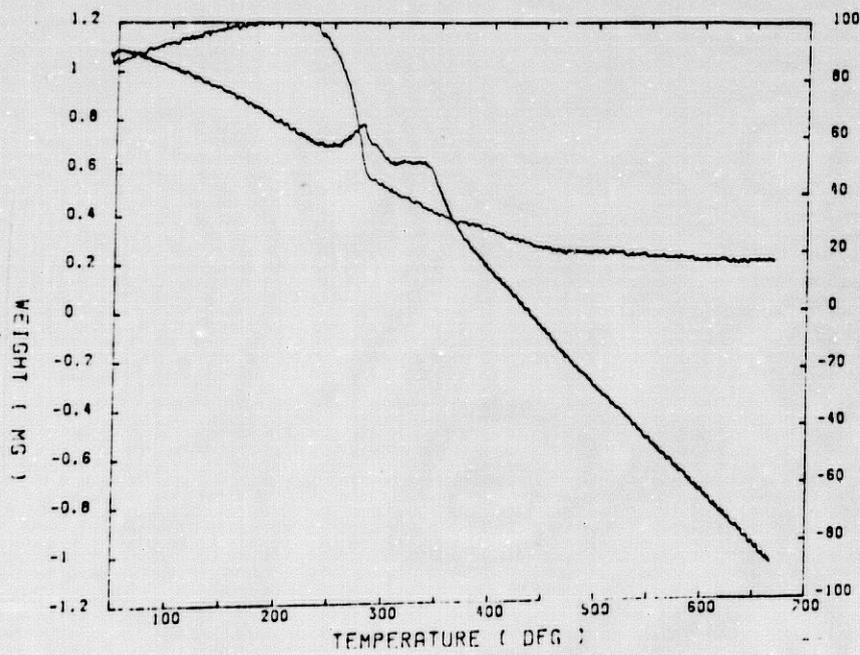


Figura 28.- Curvas de TG-ATD de $[\text{Pd}(2,4\text{-dabH})\text{Cl}_2]$ (1,2 mg).

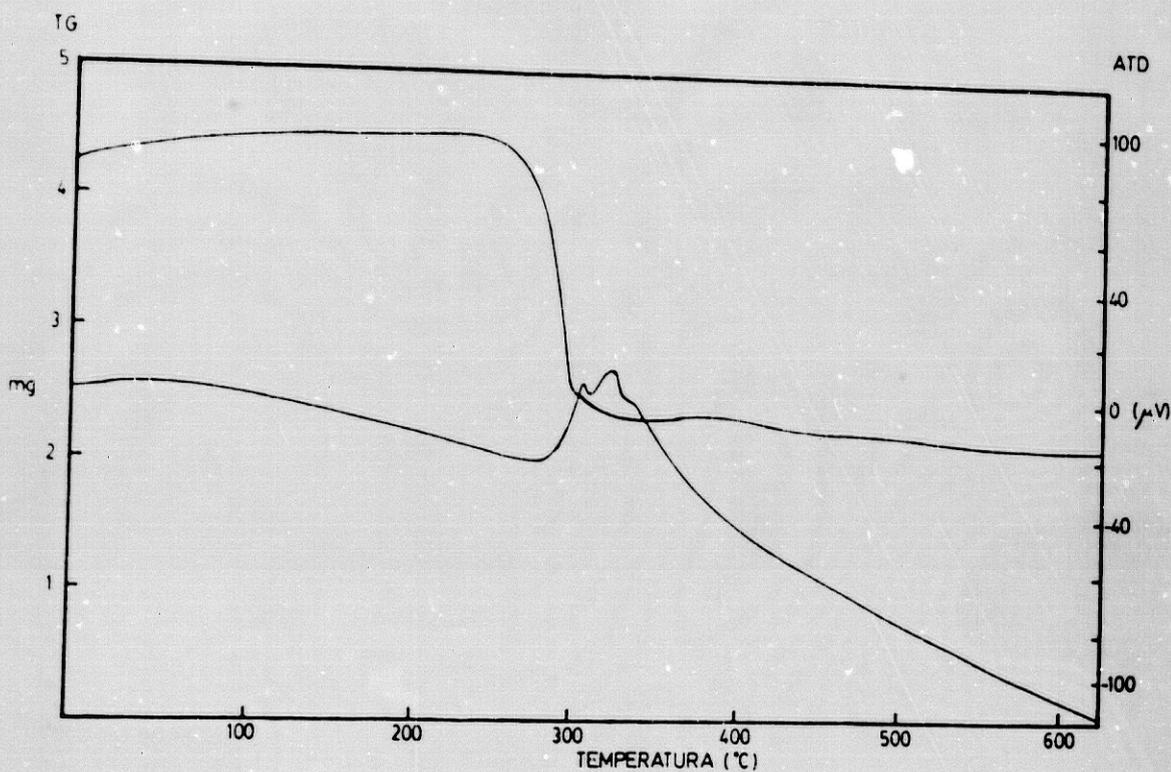


Figura 29.- Curvas de TG-ATD de $[\text{Pd}(2,3\text{-dapEt})\text{Cl}_2]$ (4,35 mg).

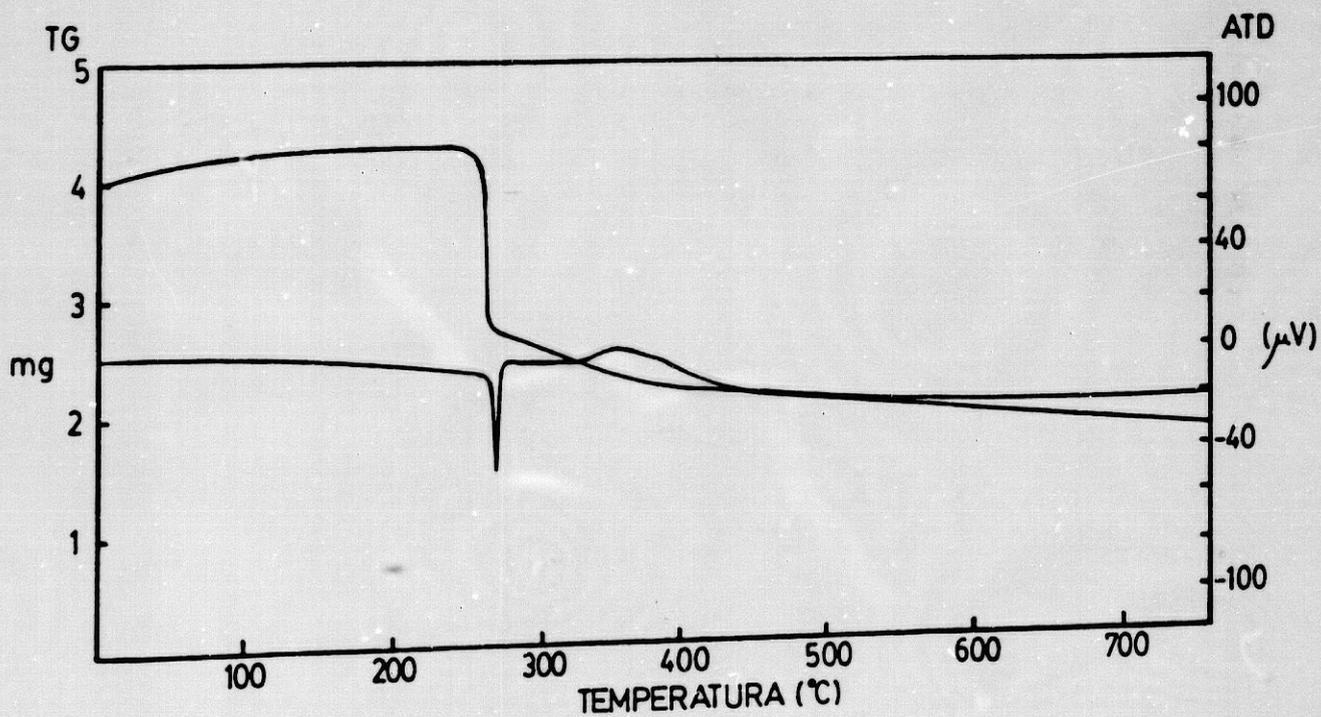


Figura 30.- Curvas de TG-ATD de $[\text{Pd}(2,4\text{-dabEt})\text{Cl}_2]$ (3,9 mg).

II.2.- Comportamiento potenciométrico y conductimétrico.

La caracterización de los complejos de paladio(II) investigados en disolución incluye su valoración frente a KOH 0,1M por técnicas potenciométricas (con electrolito de fondo KCl 0,1M) y conductimétricas (sin ajuste de fuerza iónica del medio), de modo que se obtenga una información preliminar de las especies más abundantes que tales complejos de paladio(II) originen en función del pH, en medios ricos y pobres en cloruro.

a) Valoraciones de complejos "ácidos", [Pd(LH)Cl₂].

Las figuras 31 y 32 reproducen las valoraciones potenciométricas y conductimétricas de los complejos ácidos [Pd(LH)Cl₂], donde LH representan genéricamente a las especies dap-H y dab-H protonadas en su grupo carboxi y quelando al paladio(II) por sus grupos amino.

Las curvas potenciométricas de los complejos [Pd(LH)Cl₂], que en medio KCl 0,1M deben existir fundamentalmente como diclorocomplejos, muestran tres etapas de valoración frente a KOH 0,1M, que consumen cada una de ellas un equivalente de base por mol de complejo. La etapa inicial, con zona de tamponamiento en la región moderadamente ácida ($2,8 < \text{pH} < 4,8$) debe corresponder a la salificación del grupo carboxílico del ligando aminoácido quelado al paladio(II). La valoración del protón del grupo carboxílico no debe esperarse para los

complejos con el diaminoácido esterificado y, por carecer de interés comparativo, la denominaremos "Etapa H", correspondiendo al proceso general:

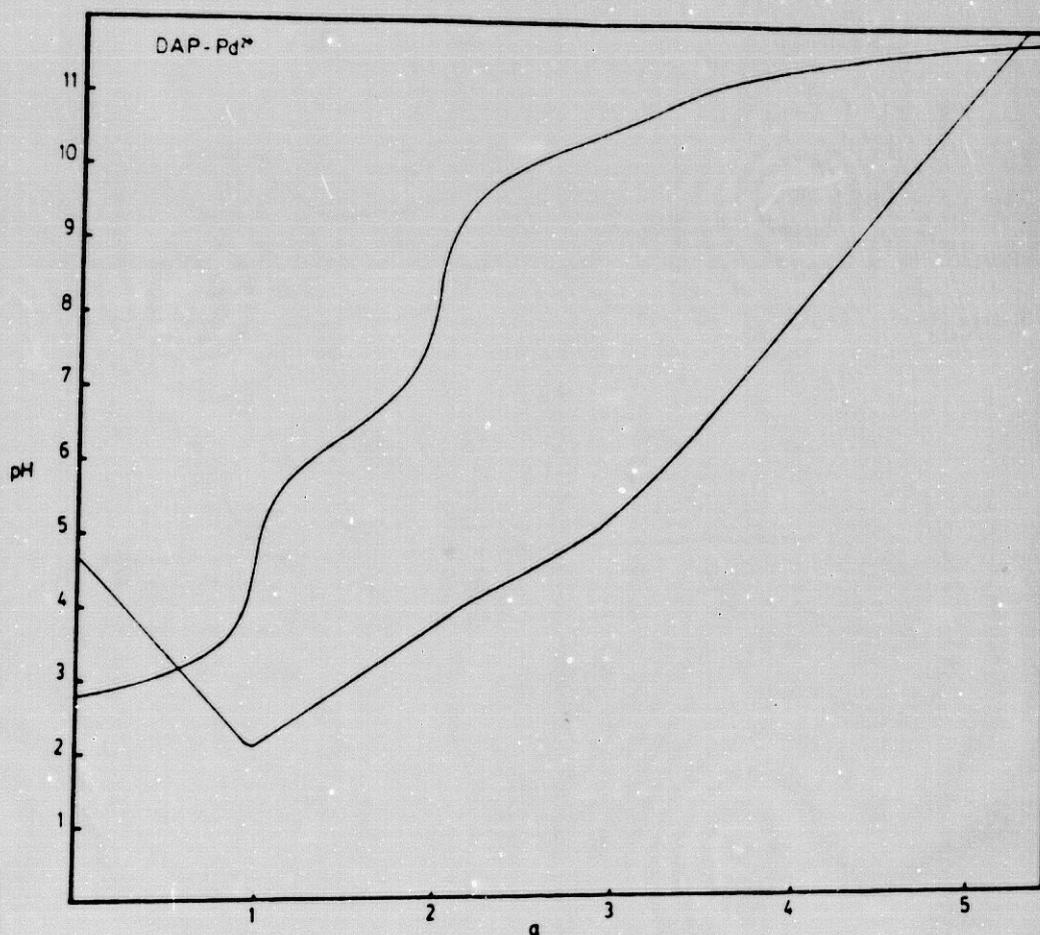
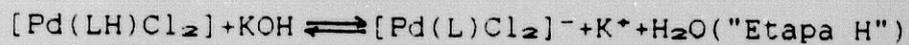


Figura 31.- Valoraciones potenciométrica y conductimétrica de $[\text{Pd}(\text{LH})\text{Cl}_2]$ ($2.02 \times 10^{-2}\text{M}$) con $\text{LH}=\text{dapH}$ frente KOH (0.102M) en medio de KCl (0.1M). $\underline{a}=\text{Eq.KOH/mol de complejo}$.

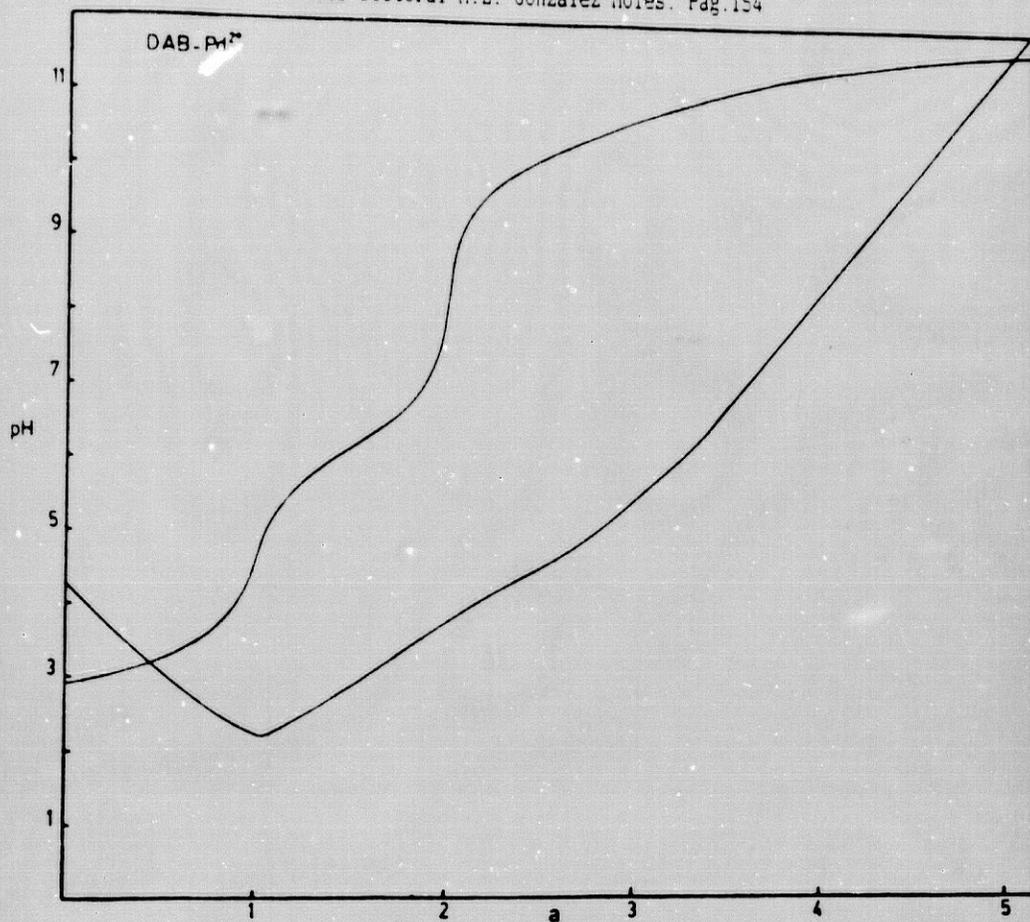


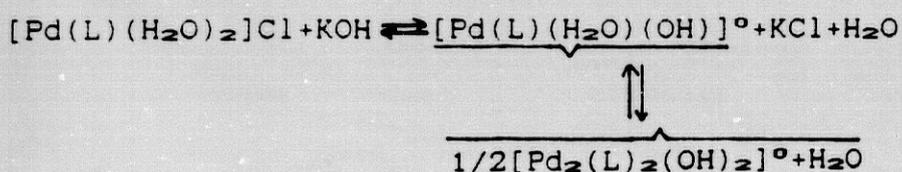
Figura 32.- Valoraciones potenciométrica y conductimétrica de $[\text{Pd}(\text{LH})\text{Cl}_2]$ ($2,02 \times 10^{-2} \text{M}$) con $\text{LH}=\text{dabH}$ frente a KOH ($0,102 \text{M}$) en medio de KCl ($0,1 \text{M}$). $\underline{a}=\text{Eq. KOH/mol de complejo}$.

En estas valoraciones potenciométricas (figuras 31 y 32) las dos etapas restantes deben corresponder a los procesos asociados a la sustitución de los ligandos "cloro" (grupo saliente) por iones hidróxido (grupo entrante). Es interesante notar que, pese a que tales sustituciones deben afectar formalmente a la carga de los complejos, por tratarse de grupos saliente y entrante monovalentes aniónicos, ambas etapas ocurren marcadamente separadas originando una zona de tamponamiento en la región moderadamente ácida o ligeramente alcalina, $4,7 < \text{pH} < 8,0$ (Etapa 1ª) y otra en la zona marcadamente alcalina $8,0 < \text{pH} < 11$, (Etapa 2ª). Esta separación del proceso puede atribuirse a la posibilidad de que la formación del monohidroxo-complejo en la Etapa 1ª conlleve un segundo

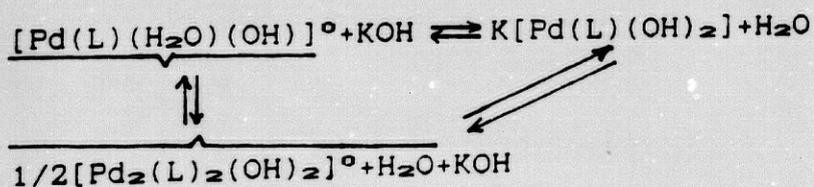
de $[\text{Pd}(\text{LH})\text{Cl}_2]$ para dar $[\text{Pd}(\text{LH})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ y, después, la realización de las referidas etapas, según las ecuaciones:
 "Etapa_H", para $0 \leq a \leq 1$



Etapa_1, para $1 \leq a \leq 2$



Etapa_2, para $2 \leq a \leq 3$



Por comparación de las Etapas 1 y 2 (Tabla XII) puede apreciarse que el uso de una concentración de cloruro alta (potenciometrias) o baja (conductimetrias) representa referencias significativas en la carga de los complejos implicados en la Etapa 1 y de los productos de partida para la Etapa 2. Así, con fuerza iónica ajustada de KCl 0,1M (val. potenciométrica) la etapa 1 representaría partir del complejo aniónico $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]^-$ para dar el anión $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}(\text{OH})]^-$ en equilibrio con la especie dinuclear no cargada $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]^\circ$, ambas, productos de partida de la Etapa 2. De otra parte, sin

KCl como electrolito de fondo (val. conductimétrica) la Etapa 1 representaría transformar la especie catiónica $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ para dar $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^0$ y su correspondiente especie dinuclear $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]^0$, ambas no cargadas y productos de partida de la Etapa 2. En esta última situación la especie catiónica $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, producida en la Etapa 1, debe ser responsable del marcado solapamiento de las dos etapas 1 y 2 en las valoraciones conductimétricas (separadas en las correspondientes valoraciones potenciométricas), pudiendo justificar incluso la leve desviación positiva de la linealidad de las representaciones conductimétricas entre $\alpha=1$ y $\alpha=3$.

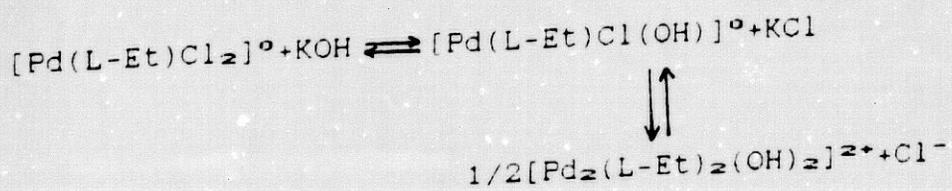
TABLA 12. ESPECIES PREDOMINANTES FORMADAS EN LAS VALORACIONES POTENCIOMETRICAS Y CONDUCTIMETRICAS DE COMPLEJOS "ACIDOS" $[Pd(LH)Cl_2]$ DE daph Y dabh.

ETAPA "H"	VAL. POTENCIOMETRICA [KCl]=0,1M	VAL. CONDUCTIMETRICA $[Cl^-]_{4 \cdot 10^{-3}M}$
<p>0 ≤ a ≤ 1 2,9 < pH < 4,7</p>	$[Pd(LH)Cl_2] + KOH \rightleftharpoons [Pd(L)Cl_2]^- + K^+ + H_2O$	$[Pd(LH)(H_2O)_2]Cl_2 + KOH \rightleftharpoons [Pd(L)(H_2O)_2]Cl + KCl + H_2O$
<p>ETAPA 1 1 ≤ a ≤ 2 4,7 < pH < 8,0</p>	$K [Pd(L)Cl_2] + KOH \rightleftharpoons K [Pd(L)Cl(OH)]^o + KCl$ $\rightleftharpoons \frac{1}{2} [Pd_2(L)_2(OH)_2]^o + KCl$	$[Pd(L)(H_2O)_2]Cl + KOH \rightleftharpoons [Pd(L)(H_2O)(OH)]^o + KCl + H_2O$ $\rightleftharpoons \frac{1}{2} [Pd_2(L)_2(OH)_2]^o + H_2O$
<p>ETAPA 2 2 ≤ a ≤ 3 8,0 < pH < 10,9</p>	$K [Pd(L)Cl(OH)]^o + KOH \rightleftharpoons K [Pd(L)(OH)_2]^- + KCl$ $\rightleftharpoons \frac{1}{2} [Pd_2(L)_2(OH)_2]^o + KCl + KOH$	$[Pd(L)(H_2O)(OH)]^o + KOH \rightleftharpoons [Pd(L)(OH)_2]^- + H_2O$ $\rightleftharpoons \frac{1}{2} [Pd_2(L)_2(OH)_2]^o + H_2O + KOH$

b) Valoraciones de los complejos "esterificados",
[Pd(L-Et)Cl₂].

Las valoraciones potenciométricas y conductimétricas de los complejos "esterificados" [Pd(L)-Et)Cl₂], con L-Et=dap-ET o dab-Et, se muestran en las figuras 33 y 34. La comparación de estas curvas potenciométricas con las de sus analogos complejos "ácidos" muestran la ausencia en las primeras de la "Etapa H", debida a la esterificación del grupo carboxi de los ligandos aminocarboxílicos. También puede apreciarse que las curvas potenciométricas de los complejos [Pd(L-Et)Cl₂] muestran su Etapa 2 (entre $\underline{a}=1$ y $\underline{a}=2$) a valores de pH sensiblemente menos alcalinos (del orden de una unidad de pH) que sus correspondientes complejos ácidos [Pd(LH)Cl₂]. No obstante, las mayores diferencias se observan al comparar el comportamiento conductimétrico de los complejos [Pd(L-Et)Cl₂] o, si se prefiere, [Pd(L-Et)(H₂O)₂]²⁺ (entre $\underline{a}=0$ y $\underline{a}=2$) con el de los analogos [Pd(LH)Cl₂] o, si se quiere, [Pd(LH)(H₂O)]²⁺ (en tales casos $\underline{a}=1$ y $\underline{a}=3$).

Las valoraciones potenciométricas de los complejos esterificados [Pd(L-Et)Cl₂], en medio KCl 0,1M, pueden explicarse por las siguientes etapas: Etapa 1, para $0 \leq \underline{a} < 1$ y $4,2 \leq \text{pH} \leq 8,2$:



donde debe notarse que se parte de una especie no cargada para obtener otra, también no cargada, pero que debe dinuclearizarse para dar el catión divalente $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})(\text{OH})_2]^{2+}$, en contraste con la neutralidad de $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]^0$, su especie correspondiente producida con el diaminoácido no esterificado.

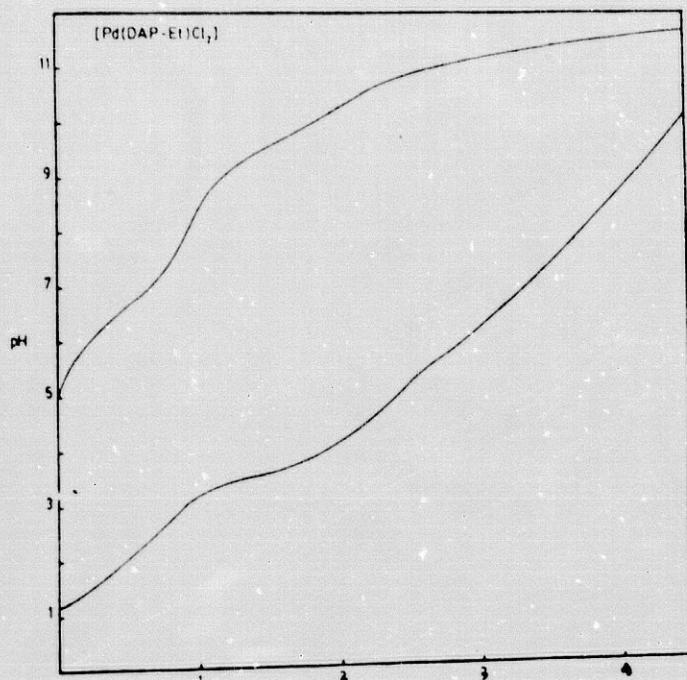


Figura 33.- Valoraciones potenciométrica y conductimétrica de $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ ($2,00 \times 10^{-3}\text{M}$) con L-Et=dap-Et frente a $\text{KOH}(0,102\text{M})$ en medio de $\text{KCl}(0,1\text{M})$.
 $\underline{a}=\text{Eq. KOH/mol de complejo.}$

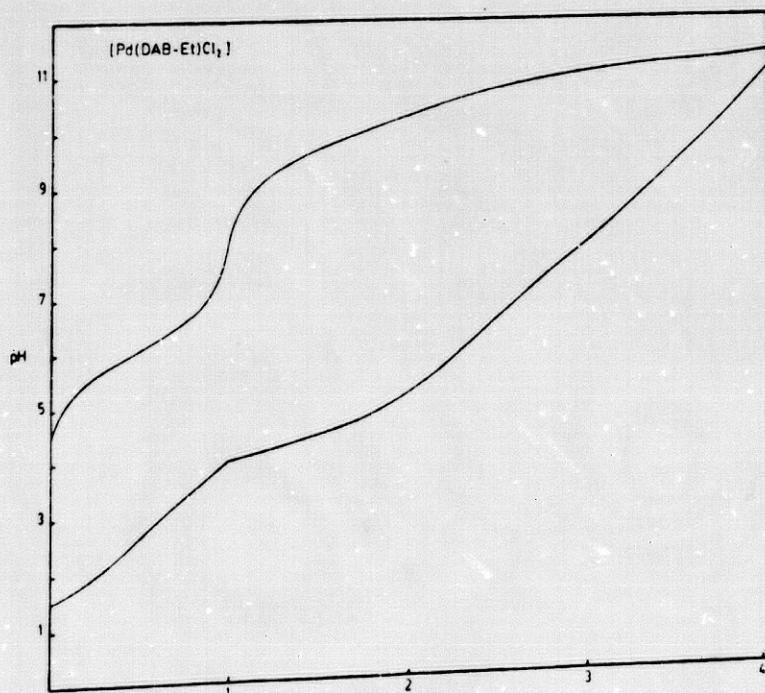
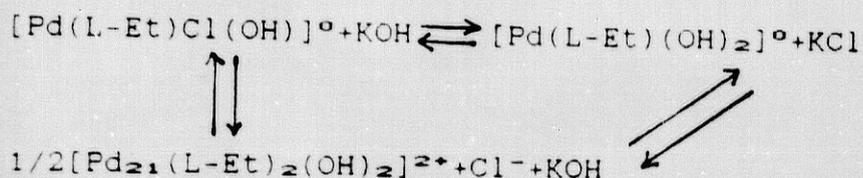


Figura 34.- Valoraciones potenciométrica y conductimétrica de $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ ($2,63 \times 10^{-3}\text{M}$) con L-Et=dab-Et frente a $\text{KOH}(0,102\text{M})$ en medio de $\text{KCl}(0,1\text{M})$.
 $\underline{a}=\text{Eq. de KOH/mol de complejo.}$

Etapa 2, para $1 \leq a \leq 2$ y $8,2 < \text{pH} < 10,3$:

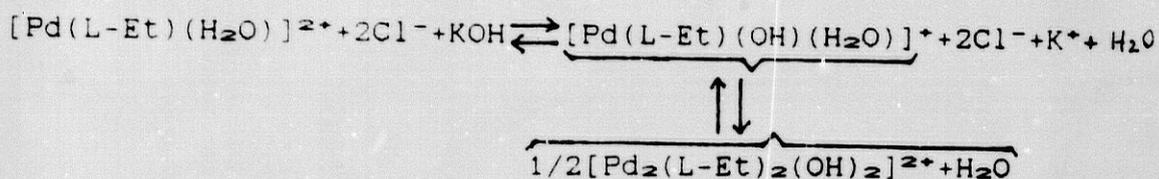


donde las especies resultantes (en equilibrio) de la Etapa 1 dan lugar a la formación de otra especie monómera neutra.

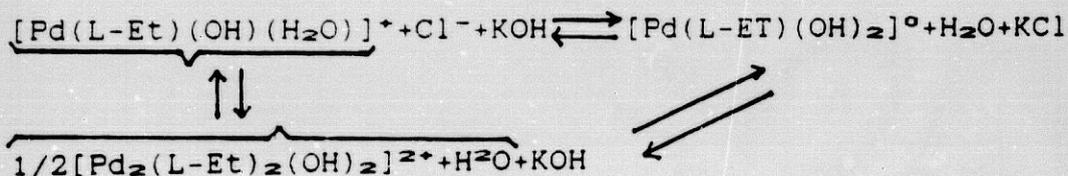
Es importante notar que los complejos "esterificados" $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ en KCl 0,1M pueden dar un predominio notable de especies no cargadas en todo el rango de pH correspondiente a la adición de 0 a 2 equivalente de KOH . Además, la posibilidad de formar la especie dinuclear dicatiónica $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$ en la etapa 1 explicaría, por su afinidad con los iones OH^- , el que los complejos "esterificados" de la Etapa 2 a valores de pH menos alcalinos que sus análogos "no esterificados".

Las valoraciones conductimétricas de los complejos $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$, en medio pobre en concentración de cloruros, por no ajustarse la fuerza iónica con el electrolito de fondo, deben reflejar el comportamiento frente a KOH 0,1M de sus correspondientes diacu-complejos $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, que se explica por los siguientes equilibrios:

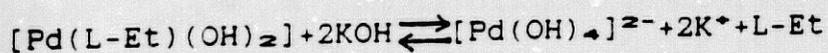
Etapa 1, para $0 \leq a \leq 1$



Etapa 2, para $1 \leq a \leq 2$



Etapa "adicional", para $2 \leq a \leq 4$



Sobre la base de los equilibrios propuestos puede entenderse el comportamiento conductimétrico de los complejos $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ o, si se prefiere, de $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (entre $a = 0$ y $a = 2$) y su desviación respecto a lo propuesto para la valoración potenciométrica correspondiente de $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ entre $a = 1$ y $a = 3$), así como la Etapa "adicional" que se aprecia sólo en el comportamiento conductimétrico de los productos "esterificados".

En efecto, la Etapa 1 de la valoración conductimétrica de un complejo "esterificado" parte del cloruro de un catión divalente para dar el cloruro de un catión

monovalente (que puede dinuclearizar en $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$) más cloruro potásico, con un claro aumento de la conductividad. En la Etapa correspondiente de valoración de un complejo "ácido" se partía del cloruro de un catión monovalente para dar especies neutras (mono- y di-nuclear) más cloruro potásico, registrándose un aumento de conductividad menos pronunciado.

La Etapa 2 de valoración potenciométrica de los productos esterificados conduce a la transformación de especies catiónicas (mono- y di-valentes) a KCl y la especie neutra $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})_2]^0$, que por su electroneutralidad y por la menor capacidad complejante que debe esperarse de L-Et respecto a L⁻ es susceptible de dar la "Etapa adicional" sustituyendo L-Et por 2 ligandos OH⁻.

En contraste, la Etapa 2 de la valoración potenciométrica de los complejos no esterificados representa la transformación de especies neutras (mono- y di-nucleares) en KCl y la sal potásica del complejo aniónico $[\text{Pd}(\text{L})(\text{OH})_2]^-$, con un aumento de conductividad más pronunciado que el tramo correspondiente de la valoración del producto esterificado. Además, la carga negativa del complejo aniónico $[\text{Pd}(\text{L})(\text{OH})_2]^-$ y la mayor capacidad quelante de L⁻ respecto de L-Et hacen que no se registre la hidrólisis correspondiente a la "Etapa adicional", con formación de $[\text{Pd}(\text{OH})_4]^{2-}$ y disociación de L⁻.

También para los complejos esterificados $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$, el comportamiento en medios ricos en cloruros

(potenciométrico) o pobres en cloruros (conductimétrico) es sustancialmente distinto, sobre todo en lo relativo a la carga iónica o la neutralidad de las especies implicadas en las Etapas 1 y 2 (Tabla, XIII). Nótese que, salvo la especie dinuclear $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$, los demás complejos que participan en las Etapas 1 y 2 de valoración potenciométrica ($\text{KCl}=0,1\text{M}$) son no cargadas. En contraste, las etapas 1 y 2 de las correspondientes valoraciones conductimétricas (en medios pobres en cloruro) implican equilibrios entre especies catiónicas que conducen al complejo no cargado $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})_2]$.

d) Especies predominantes en condiciones fisiológicas de pH.

El examen de las curvas de valoración potenciométrica de complejos $[\text{Pd}(\text{LH})\text{Cl}_2]$ y $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ revela que, en condiciones fisiológicas de $\text{pH}=7,2 - 7,4$, debe producirse el predominio de las especies formadas para valores de a (equivalente de KOH/mol de paladio o de complejo) próximos a 2 y a 1, respectivamente, correspondiendo a los puntos finales de las "Etapas 1". Tales especies se incluyen en la Tabla XIV junto con las correspondientes a una situación de concentración pobre en cloruros ($[\text{Cl}^-] < 5 \cdot 10^{-3}$) deducidas del estudio conductimétrico.

TABLA 13. ESPECIES PREDOMINANTES FORMADAS EN LAS VALORACIONES POTENCIOMETRICAS Y CONDUCTIMETRICAS DE COMPLEJOS "ESTERIFICADOS" $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ DE daph ydabh.

	VAL. POTENCIOMETRICA $[\text{KCl}] = 0.1\text{M}$	VAL. POTENCIOMETRICA $[\text{Cl}^-] \sim 4 \cdot 10^{-3}\text{M}$
ETAPA 1 $0 \leq a \leq 1$	$[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]^0 + \text{KOH} \rightarrow \underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}(\text{OH})]^0 + \text{KCl}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{Cl}^-}$	$\underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + 2\text{Cl}^- + \text{KOH}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}} \rightleftharpoons \underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+ + \text{K}^+ + \text{H}_2\text{O}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}}$
ETAPA 2 $1 \leq a \leq 2$	$\underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}(\text{OH})]^0 + \text{KOH}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{Cl}^- + \text{KOH}} \rightleftharpoons \underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})_2]^0 + \text{KCl}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{KOH}}$	$\underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+ + \text{Cl}^- + \text{KOH}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{KOH}} \rightleftharpoons \underbrace{[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})_2]^0 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{KCl}}_{\frac{1}{2} [\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}}$
ETAPA "ADICIONAL." $2 \leq a \leq 4$	$[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})_2]^0 + 2\text{KOH} \rightleftharpoons \text{K}_2[\text{Pd}(\text{OH})_4] + \text{L-Et}$ <p>(No observado experimentalmente)</p>	$[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{OH})_2]^0 + 2\text{KOH} \rightarrow [\text{Pd}(\text{OH})_4]^{2-} + 2\text{K}^+ + \text{L-Et}$

TABLA 14. ESPECIES PREDOMINANTES EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE pH=7,2-7,4 PRODUCIDAS POR [Pd(LH)Cl₂] Y [Pd(L-Et)Cl₂] (LH= daph, dabH; L-Et= dap-Et, dab-Et) EN MEDIOS RICOS (~0,1M) Y POBRES EN CLORURO (< 5.10⁻³M).

COMPLEJO PRECURSOR	ESPECIES MAS ABUNDANTES	
	MEDIO RICO EN Cl ⁻ (~0,1 M)	MEDIO POBRE EN Cl ⁻ (<5.10 ⁻³ M)
Pd(LH)Cl ₂ en a ~ 2 de valoraciones potenciométrica y conductimétrica	$K [Pd(L)Cl(OH)]$ \rightleftharpoons $1/2 [Pd_2(L)_2(OH)_2]^0 + KCl$	$[Pd(L)(H_2O)(OH)]^0$ \rightleftharpoons $1/2 [Pd_2(L)_2(OH)_2]^0 + H_2O$
Pd(L-Et)Cl ₂ en a ~1 de valoraciones potenciométrica y conductimétrica	$[Pd(L-Et)(Cl)(OH)]^0$ \rightleftharpoons $1/2 [Pd_2(L-Et)_2(OH)_2]^{2+} + Cl^-$	$[Pd(L-Et)(H_2O)(OH)]^+$ \rightleftharpoons $1/2 [Pd_2(L-Et)_2(OH)_2]^{2+} + H_2O$

La observación de la Tabla XIV sugiere que los complejos "ácidos" $[\text{Pd}(\text{LH})\text{Cl}_2]$ deberán existir, en un medio fisiológico de pH y rico en cloruros, como el anión $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}(\text{OH})]^-$ (en forma de sal potásica, por ejemplo), pero que tal complejo salino puede dinuclearizarse en una especie neutra μ, μ -dihidroxo, $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]^0$. Aunque la formación de tal especie dinuclear debe ser poco importante en medios ricos en cloruro (ya que su formación produce también cloruro), el carácter no cargado de la especie dinuclear puede favorecer su difusión a través de membranas biológicas hacia el interior de las células, donde las concentraciones de cloruro son mucho más bajas ($\approx 4 \times 10^{-3} \text{M}$). Allí, tal especie puede acuarse disociándose en $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^0$ que, pese a su electroneutralidad, puede ejercer cierta reactividad debido al carácter "saliente" del ligando "agua".

Los complejos "esterificados" $[\text{Pd}(\text{L-Et})\text{Cl}_2]$ deben existir en un medio rico en cloruros como especies neutras $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{Cl})(\text{OH})]^0$, cuya dinuclearización a la especie catiónica $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$, que libera cloruros, debe también estar reprimida por el electrolito de fondo. En tales condiciones cabe esperar una buena difusión de dichos complejos a través de las membranas biológicas hacia el interior de las células, donde la baja concentración de cloruros ($\approx 4 \times 10^{-3} \text{M}$) debe favorecer la acuación de $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{Cl})(\text{OH})]^0$ en la especie catiónica $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$. Este catión puede dinuclearizarse en el catión divalente $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$, formando agua, en un

proceso desfavorecido por la dilución propia del medio intracelular. Por consiguiente, cabe esperar que los complejos "esterificados" resulten reactivos en las condiciones fisiológicas de pH.

III.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

En los términos que se indica en el punto III.1 de la parte B de esta memoria, se ha investigado la actividad de los complejos de paladio(II), incluidos en el presente estudio, en su capacidad para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* (cepa K-12) en medio de cultivo standar "C" (conteniendo 2 g de NH_4Cl , 3 g de NaCl y 0,01 g de MgCl_2 por litro), a cinco concentraciones diferentes para cada complejo, de 10 a 100 μM .

Los resultados obtenidos en este sentido revelan que los cuatro complejos de paladio(II) investigados ejercen un marcado efecto inhibitorio sobre el desarrollo de un cultivo de *E. coli* K-12 a concentraciones de orden $\geq 25\mu\text{M}$, dando inhibiciones completas a concentraciones de complejo de 50 a 75 μM . Así, la figura 35 muestra las curvas de crecimiento de *E. Coli* no tratado y tratado a distintas concentraciones de $[\text{Pd}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$, donde se observa la inhibición completa del crecimiento bacteriano para los cultivos tratados con complejo 75 μM y 100 μM .

Una observación al menos curiosa, obtenida en el curso de estas experiencias microbiológicas, es la formación de formas anormales, multinucleadas, de aspecto filamentoso, de *E. coli* en el cultivo tratado con $[\text{Pd}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$ a concentración 50 μM (figura 36). Este indicio de tendencia a la filamentación a dosis un poco menores que las capaces de producir la

inhibición total del crecimiento bacteriano, deben contemplarse en relación con los fenómenos de filamentación de E. coli que causan el cis-DDP y otros complejos de platino, generalmente antitumorales, a dosis subterapéuticas.

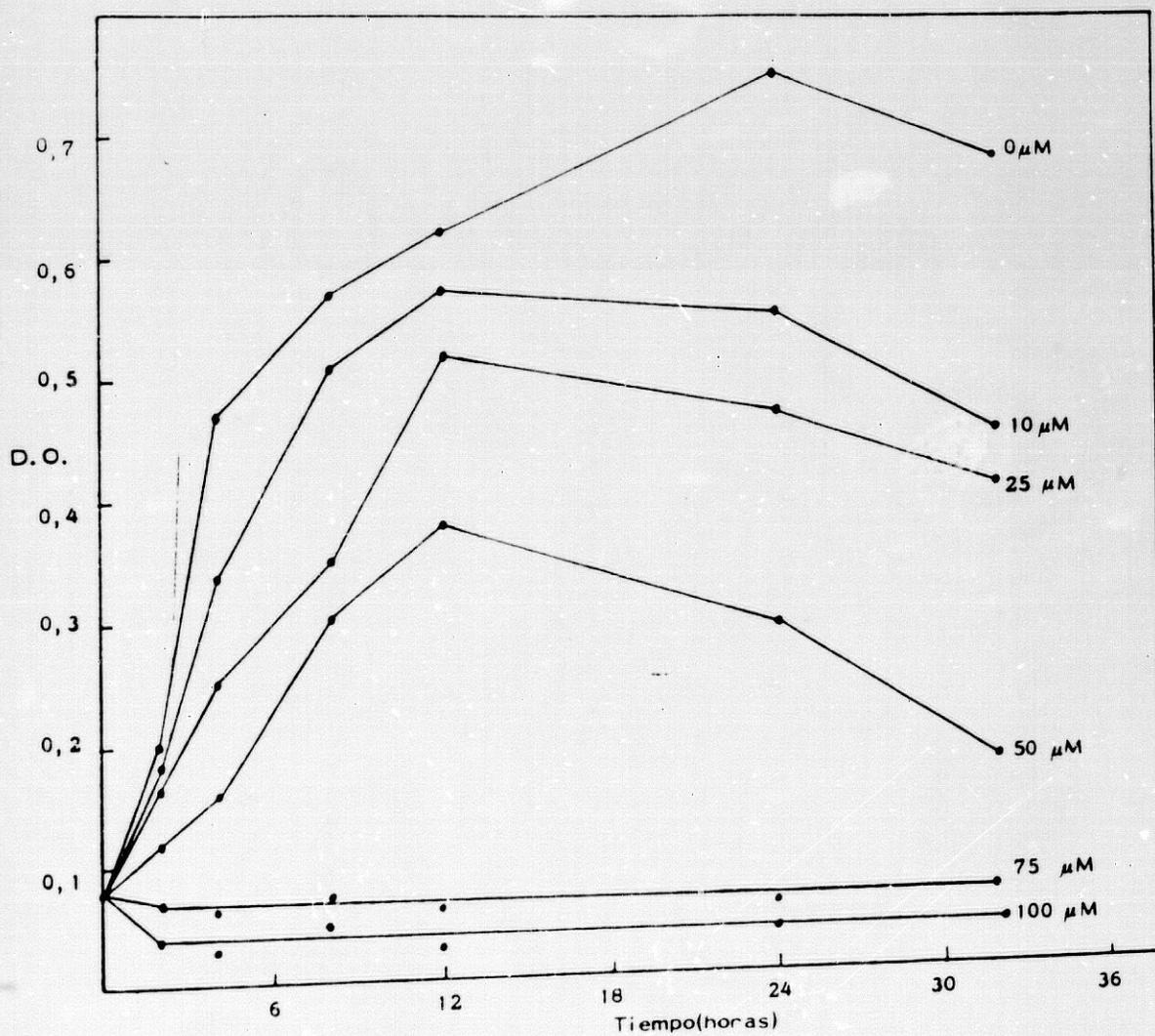


Figura 35.- Efecto inhibitorio del complejo [Pd(dab-Et)Cl₂] sobre un cultivo de Escherichia coli (cepa K-12).

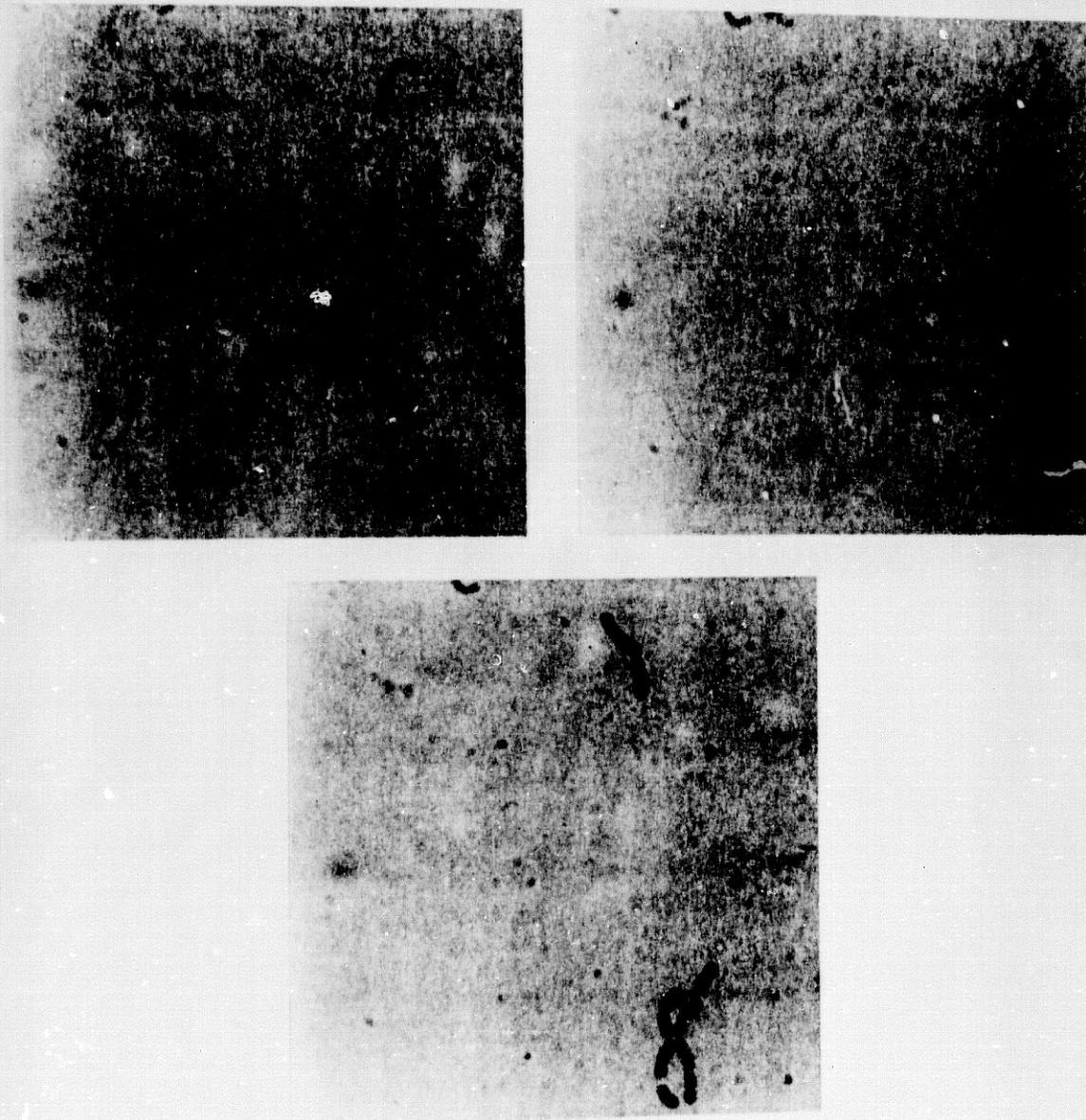


Figura 36.- Microfotografías de las formas multinucleadas de aspecto filamentosas producidas en un cultivo de *Escherichia coli* (cepa K-12) con el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ 50 μ M.

IV. - RESULTADOS PARASITOLÓGICOS

Se ha investigado la capacidad inhibitoria de los complejos de paladio(II) aquí considerados sobre cultivos "in vitro" de formas epimastigotas de *Tripanosoma cruzi*, según se indica en la parte B, apartado III.2, observándose que los cuatro diclorocomplejos de paladio(II) inhiben completamente la multiplicación (por muerte) del parásito (100%) a dosis de 100 μg por ml. A menores dosis, los resultados obtenidos indican una actividad parasiticida menor y dependiente de la dosis y del tiempo, de modo que la inhibición producida por el complejo "ácido" puede ser menor, comparable o mayor que la de su correspondiente complejo esterificado, según la dosis y según el tiempo transcurrido desde la adición del compuesto (ver Tabla XV). En cualquier caso, es evidente que los productos investigados poseen una clara actividad parasiticida frente al *Tripanosoma cruzi*, que llega a ser completa a dosis de sólo 100 μg por ml.

La actividad parasiticida de los complejos investigados frente al *Tripanosoma cruzi* es también conocida para cis-DDP y otros complejos de platino(II) con propiedades antitumorales, si bien los datos de la Tabla XVI sugieren que, a dosis apropiadas, los efectos inhibitorios para el T. cruzi ejercidos por cis-DDP⁵⁵ y por el complejo $[\text{Pd}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$, por ejemplo, evolucionan de forma diferente con el tiempo. Estos datos pueden explicarse en base a las repercusiones que sobre el mecanismo de acción de los complejos y sobre los procesos de

reparación del DNA tienen las cinéticas lenta y rápida de los derivados de Pt(II) y de Pd(II), respectivamente.

TABLA 15. EFECTO PARASITICIDA (% DE INHIBICION) DE DICLORO-COMPLEJOS DE PALADIO(II) SOBRE UN CULTIVO CELULAR PARASITADO POR TRIPANOSOMA CRUZI.

Dosis →	100 µg/ml		10µg/ml		1µg/ml			
	ligando	quelato →	dabH	dabEt	dabH	dabEt	dabH	dabEt
24 h			100	100	—	55	0	0
48 h			100	100	40,9	82,3	23	0
72 h			100	100	36,8	34,2	15,7	26,3

TABLA 16. COMPARACION DEL EFECTO (% INHIBICION) PRODUCIDO POR CIS-DDP Y [Pd(dab-Et)Cl₂] SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS PARASITADAS POR TRIPANOSOMA CRUZI.

	CIS-DDP(0,5µg/ml)	[Pd(dab-Et)Cl ₂] (10µg/ml)
24 h	49,95	55
48 h	41,27	82,3
72 h	38,61	34,2

V.- RESULTADOS TOXICOLÓGICOS:

V.1. Ensayos toxicológicos.

Como se desprende en el punto V de la parte B de esta memoria, no fue posible calcular la DL₅₀ debido a problemas de solubilidad.

En la primera experiencia se administró una dosis equivalente a la DL₅₀ del cis-platino y en las tres siguientes, dosis 4, 6 y 8 veces superiores a ésta; al querer realizar otra experiencia con una dosis diez veces mayor que la inicial, no fue posible solubilizarla, por lo que no se pudo determinar el parámetro DL₅₀.

Todo esto revela que el [Pd(2,4-dabEt)Cl₂] es menos tóxico que el prototipo cis-platino.

V.2. Observaciones histopatológicas.

Con objeto de evidenciar las posibles lesiones morfológicas causadas por el [Pd(2,4-dabEt)Cl₂] y comparárlas con las producidas por el cis-DDP, se inyectaron a dos lotes de ratones de cada uno de los compuestos, una dosis (d-1) de 2,66 mg/Kg (dosis terapéutica del cis-DDP) y otra diez veces mayor (d-2), obteniéndose los siguientes resultados histopatológicos:

A la dosis de 2,66 mg/Kg de peso, no se aprecian

lesiones evidenciables a microscopia óptica en los órganos estudiados (riñón, hígado y bazo), para ninguno de los productos.

A la dosis (d-2) diez veces mayor, el cis-platino produce a nivel corticomedular, destrucción de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales, sin fragmentación de la membrana basal; asimismo, se observó una pérdida del borde en cepillo de los túbulos y formación de cilindros granuloso e hialinos a nivel de túbulos colectores sin afectación de éstos. Los glomérulos se encontraron indemnes. Todo esto es compatible con el diagnóstico de necrosis tubular aguda.

Sin embargo, a ésta misma dosis, el tejido renal de los ratones tratados con $[Pd(2,4-dab-Et)Cl_2]$ no mostró ninguna de las lesiones previamente mencionadas, conservando intacto el borde en cepillo.

En el bazo de los ratones tratados con cis-DDP, se observó una drástica disminución de megacariocitos, así como una franca depleción linfoide, a diferencia de lo que ocurrió con el $[Pd(2,4-dabEt)Cl_2]$, que no mostró diferencia significativa con los controles.

VI.- ACTIVIDAD FRENTE A DNA, CROMATINA Y CROMOSOMAS.

Los ensayos microbiológicos y parasitológicos referidos sugieren que los cis-dicloro-complejos de paladio(II) con los diaminoácidos, dapH y dabH, y con sus ésteres etílicos, dap-Et y dab-Et, pueden ejercer efectos biológicos comparables a los descritos para el cis-DDP y para cis-dicloro-complejos de platino(II) con los mismos diaminoácidos y sus ésteres, aunque con las diferencias cinéticas que distinguen a la química de la coordinación de ambos iones metálicos. Esta sugerencia requería la investigación de la reactividad de los complejos de paladio(II) aquí considerados frente al DNA nativo "in vitro" y frente a cromatina y cromosomas, descritos en el apartado IV de la Parte B de esta Memoria, que se realizaron en el Centro de Biología Molecular (CSIC) de Madrid en colaboración con los Dres. C. Alonso y M. C. López López. Los objetivos generales de estas experiencias consistían en determinar la reactividad de los complejos de paladio(II) investigados frente al DNA nativo o integrado en cromatina "in vitro" o "in vivo" y en estructuras cromosómicas "in vivo", a fin de esclarecer la potencial actividad de tales complejos como agentes anticancerígenos y, en lo posible, establecer los efectos que sobre estas propiedades ejerza la esterificación del grupo carboxi del diaminoácido quelante del paladio(II). En este sentido, la información que se obtenga deberá interpretarse con referencia a la deducida en los estudios potenciométricos y conductimétricos.

VI.1. Ensayos "in vitro" con DNA y cromatina.

La reactividad de los complejos de paladio(II) estudiados frente a DNA y cromatina se investigó, en primer lugar, mediante experiencias "in vitro" de la reactividad del complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ frente a DNA nativo de distintas procedencias (medidas espectrales, ensayos de desnaturalización de renaturalización) y frente a cromatina de eritrocitos de pollo (ensayos de desnaturalización). Las medidas espectrofotométricas y los ensayos de desnaturalización del DNA se extendieron también a los restantes complejos, $[Pd(dapH)Cl_2]$, $[Pd(dabH)Cl_2]$ y $[Pd(dap-Et)Cl_2]$.

a) Resultados de espectrometría diferencial ultravioleta.

La Tabla XVII muestra los cambios en longitud de onda de máxima absorción y en hipercromicidad de una disolución de DNA tratada con cis-DDP (tras incubación de 25 min. o 48 horas) o con $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ (independientemente del tiempo de incubación) asimismo por su interés como parámetro indicativo de la potencial actividad antitumoral, en la tabla se incluye también la relación $\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$ propuesta por INAGAKI Y KIDANI²⁷.

Los datos de la Tabla XVII indican que el cis-DDP (con $r=0,25$), utilizado como control en la experiencia, produce a los quince minutos de incubación con el DNA un ligero aumento de la longitud de onda de máxima absorción del DNA nativo ($\Delta\lambda_{max}=2nm$) acompañado de un leve efecto hipocrómico (-0.8%). A las 48 h. de incubación el efecto batocrómico es mayor ($\Delta\lambda_{max}=5nm$) y se ha producido un aumento de intensidad de la absorción, con efecto hipercrómico de 4.5% a $\lambda=258nm$. La relación entre el incremento de absorción a 270 y 295 nm producida por el cis-DDP, en las condiciones citadas de $r=0.25$, son de 1.3 a los 15 min. y 2.0 a las 48 horas de incubación, datos concordantes con los aportados por INAGAKI Y KIDANI ²⁷ y por otros ²⁸

Los datos de la tabla XVIII relativos a los efectos del complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$, corresponden tanto a 15 min. como a 48 horas de incubación, ya que la primera observación destacable es que, a las 5 dosis ensayadas ($0.0005 \leq r \leq 0.0025$), la reacción del citado complejo de paladio (II) frente al DNA nativo es prácticamente inmediata y se mantiene igual con independencia del tiempo de incubación entre 15 min. y 48 horas. Esta observación pone de manifiesto que las diferencias cinéticas establecidas para muchos otros complejos análogos de platino (II) (inertes) y paladio (II) (lábil) son, en líneas generales, válidas para las reacciones de cis-DDP y de $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ frente al DNA nativo.

Tablaxvii . Cambios espectrofotométricos ocasionados por [Pd(dab-Et)Cl₂] sobre el DNA nativo.

	λ_{max}	H%	$\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$
DNA nativo	258	-	-
DNA-Pd(r=0.0005)	259	1.4	1.06
DNA-Pd(r=0.0010)	260.5	4.0	1.56
DNA-Pd(r=0.0015)	261	11.5	1.6
DNA-Pd(r=0.0020)	261.3	13.4	1.65
DNA-Pd(r=0.0025)	262	22.1	1.8
DNA-cis-DDP(r=0.25)*260		(-0.8)	1.3
DNA-cis-DDP(r=0.25)+263		4.5	2.0

H: Efecto hiperocrómico, medido a 25°C y $\lambda=258\text{nm}$

$\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$: cociente entre el incremento de absorción a 270 y 295 nm.

Los valores de H y $\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$ vienen expresados respecto al control (DNA nativo).

*: Tras quince min. de incubación.

+: tras 48 horas de incubación.

NOTA: El efecto del complejo de paladio es independiente del tiempo de incubación.

Los resultados de otras experiencias, que se resumen en la Tabla XVIII, revelan que esta observación es de aplicación para la reactividad frente al DNA nativo de los restantes complejos de paladio(II) investigados y, además, que no existe correlación entre la actividad de tales complejos y la esterificación o no del grupo α -carboxi del diaminoacidato quelante.

Otra observación de trascendental significación que se desprende de los datos resumidos en la Tabla XVII es que, a juzgar por la hipercromicidad (H%) o por la relación $\Delta A_{270}/\Delta A_{270}$, el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ produce efectos comparables al cis-DDP (tras 48 h. de incubación) a dosis (r) que son de 100 a 250 veces menores. Nótese que el citado complejo de paladio con $r=0.0025$ produce un desplazamiento de λ_{max} y un valor de $\Delta A_{270}/\Delta A_{270}$, similar al cis-DDP con una concentración 100 veces mayor ($r=0.25$), pero siendo el efecto hipercrómico (H%) del complejo de paladio (22.1) unas cinco veces el producido por el cis-DDP (4.5) en las citadas condiciones. Por lo tanto, el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ se comporta "in vitro" como una sustancia de muy elevada reactividad frente al DNA nativo. Los datos de la Tabla XVIII extienden la validez de esta observación a los restantes complejos de paladio (II) investigados.

Los datos de la Tabla XVII revelan, además, que la reactividad entre el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ y el DNA nativo crece de forma regular (aunque no lineal) con la concentración del complejo, alcanzándose para $r=0.0025$ un efecto batocrómico de 4

nm, un notable efecto hipercrómico (22.1%) y un valor de $\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$ próximo a 2 (característico de complejos antitumorales de platino).

Los datos espectrofotométricos (Tablas XVII y XVIII) revelan que el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ (y sus análogos) interaccionan con la estructura del DNA de forma más intensa y por supuesto más rápida que lo hace el cis-DDP.

Tabla XVIII. Comparación de los cambios espectrofotométricos ocasionados por los complejos de paladio (II) a la mayor dosis ensayada ($r=0.0025$) sobre DNA nativo (símbolos y aclaraciones con igual significado que en Tabla XVII).

Muestra	λ_{max} (nm)	H%	$\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$
DNA nativo	258	-	-
DNA- $[Pd(dapH)Cl_2]$	260	12.6	1.56
DNA- $[Pd(dabH)Cl_2]$	260.5	13.4	1.62
DNA- $[Pd(dap-Et)Cl_2]$	258	7.5	1.4
DNA- $Pd(dab-Et)Cl_2]$	262	22.1	1.8

b) Cinética de la desnaturalización del DNA.

La interacción de un complejo metálico con DNA nativo modifica su curva de desnaturalización en extensión y forma que depende de la naturaleza de las interacciones que establece el

ión metálico (parcialmente complejado por sus ligandos inertes) con los grupos potencialmente coordinantes del DNA (en particular, con sus bases nitrogenadas). En este sentido, la cinética de la desnaturalización del DNA por un complejo metálico se investiga por comparación de las curvas de desnaturalización térmica del DNA nativo y de sus mezclas con distintas relaciones molares, r , de complejo/base, en un medio tamponado y salino o terminado, que se incuban previamente a la desnaturalización durante tiempos concretos (por ej., durante un tiempo corto de 15 min. y durante otro largo espacio de tiempo como 48 horas). A partir de cada curva de desnaturalización se determinan tres parámetros: 1) El punto de fusión o de T_m (temperatura de "melting" correspondiente a la inflexión de la curva y al 50% de desnaturalización térmica); 2) El porcentaje de hipercromicidad producida por la desnaturalización térmica del DNA nativo o del DNA tratado con determinada concentración de complejo y previamente incubado durante un tiempo preestablecido, y 3) La anchura de la transición (desnaturalización), ΔT , que se define por intervalo de temperaturas entre las correspondientes al 15% y al 85% de desnaturalización térmica.

A título ilustrativo, la figura 37 muestra las curvas de desnaturalización de disoluciones con igual concentración de DNA, nativo y tratado con $[Pd(dab-Et)Cl_2]$, para $r=0.0010$; 0.0020 y 0.0025 , que resultan esencialmente iguales con independencia del tiempo de incubación entre 15 min. y 48 horas.

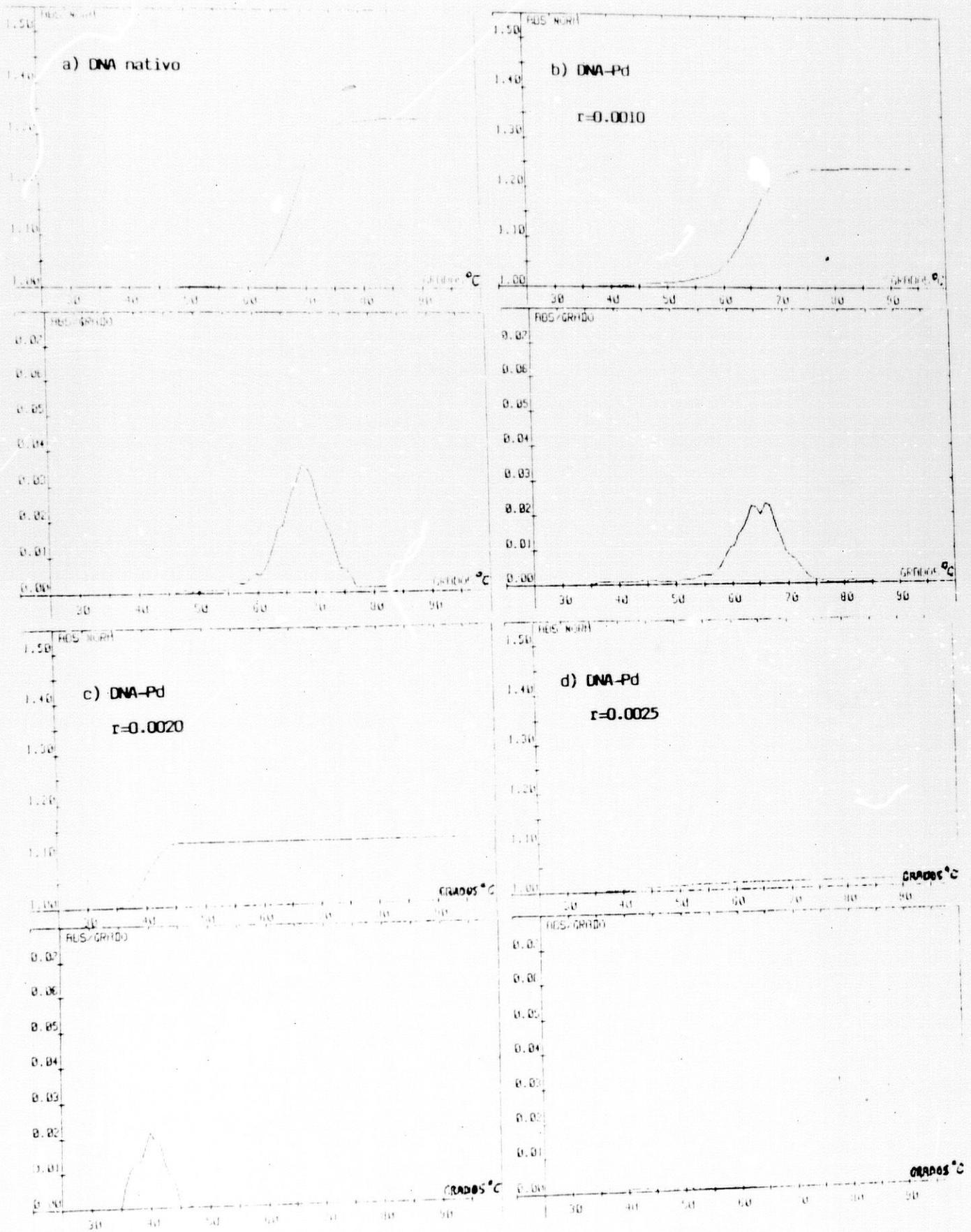


Figura 37. Curvas de desnaturalización, a) del DNA nativo ($D_0(257nm)=1.0$) y de sus mezclas con $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ con b) $r=0.0010$, c) $r=0.0020$ y d) $r=0.0025$.

En la Tabla XIX se recogen los datos de los parámetros de desnaturalización del DNA nativo tratado con cinco concentraciones diferentes de $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ o con $r=0.25$ de cis-DDP y, en éste último caso, con incubaciones de 15 min. y de 48 horas.

Los datos de la Tabla XIX indican que el DNA nativo (con $D_0=1.0$ a 258 nm) tiene un punto de fusión de $68.9^\circ C$ y su desnaturalización térmica representa una hipercromicidad a 258 nm del 33.5%, con una amplitud de la transición (entre el 15% y el 85% de desnaturalización) de $2\sigma = 8.8^\circ C$. La comparación de éstos datos con los correspondientes al tratamiento previo con cis-DDP ($r=0.25$) revelan que los efectos producidos por la reacción del cis-DDP con el DNA dependen del tiempo de incubación, de acuerdo con la cinética lenta de este proceso. Así, tras 15 min. de incubación, el cis-DDP ($r=0.25$) modifica los parámetros de desnaturalización del DNA nativo produciendo una disminución de $3.2^\circ C$ en T_m , un aumento del 1.9% en la hipercromicidad y de $1.1^\circ C$ en la anchura de la transición 2σ . La misma mezcla DNA + cis DDP tras 48 h. de incubación producen un mayor descenso de T_m ($4^\circ C$) y una mayor amplitud de la transición ($1.3^\circ C$), pero con un cambio de signo en la cromicidad, que ahora resulta un 5.3% menor que en el DNA nativo. Resulta evidente que los efectos del cis-DDP sobre los parámetros de la desnaturalización del DNA nativo (a una misma concentración) son dependientes del tiempo, debido a la cinética lenta que caracteriza a las reacciones de sustitución de ligandos de complejos de platino(II).

Los datos de la Tabla XIX relativos al complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ indican que este compuesto afecta a los parámetros de desnaturalización del DNA a concentraciones tan bajas como $r=0.0005$, para la que reduce la hipercromicidad H en un 5.1% y eleva el valor 2θ en 0.3%, aunque no modifica sensiblemente la T_m .

Tabla XIX. Parámetros de desnaturalización del DNA nativo y en presencia de $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ y $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$

	<u>$T_m(^{\circ}C)$</u>	<u>H(%)</u>	<u>$2\theta(^{\circ}C)$</u>
DNA nativo	68,9	33,5	8,8
DNA-Pd ($r=0.0005$)	68,9	28,4	9,1
DNA-Pd ($r=0.0010$)	65,7	24,4	9,9
DNA-Pd ($r=0.0015$)	47,8	11,0	9,2
DNA-Pd ($r=0.0020$)	40,6	10,1	5,4
DNA-Pd ($r=0.0025$)	ND	ND	ND
DNA-cis-DDP ($r=0.25$)*	65,7	35,4	9,9
DNA-cis-DDP ($r=0,25$)+	64,9	28,2	10,1

T_m : Temperatura de fusión (desnat.50%) de la molécula

DNA.

H : Hipercromicidad.

2θ : Anchura de transición

* : Incubación de 15 min.

+ : Incubación de 48 h

Nota: El efecto ocasionado por el compuesto de Pd es

independiente del tiempo de incubación.

Los efectos del complejo de paladio con $r=0.0010$ son comparables con los producidos por cis-DDP tras 48 horas de incubación y con $r=0.0015$ se observa un fuerte descenso de T_m ($21,1^\circ\text{C}$) y de la hipercromicidad (del 22.5%) respecto al DNA nativo. Con $r=0,0020$, los efectos del complejo paladio(II) son aún más notables, destacando el valor de la anchura de la transición ($5,4^\circ\text{C}$) que se hace menor que en el DNA nativo. A una concentración cien veces menor ($r=0.0025$) que la usada para cis-DDP ($r=0,25$), el complejo $[\text{Pd}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$ produce la casi completa desnaturalización del DNA nativo, de modo que por calentamiento resulta en la práctica imposible la determinación de los parámetros de desnaturalización.

Los datos de la Tabla XX indican que los demás complejos de paladio(II) investigados ejercen sobre los parámetros de desnaturalización del DNA nativo semejantes efectos a una dosis equivalente ($r=0.0020$, tomada a título de ejemplo). A juzgar por estos datos, tampoco se observa correlación entre la actividad de los complejos de paladio(II) y la esterificación o no del grupo α -carboxi del diaminoacidato quelante. Nótese que los datos de las Tablas XVIII y XX establecen para los ligandos la misma secuencia de actividad frente al DNA: $\text{dab-Et} > \text{dabH} \sim \text{dapH} > \text{dap-Et}$. En consecuencia, los resultados espectrofotométricos (Tablas XVII y XVIII) y de desnaturalización del DNA (Tablas XIX y XX) permiten concluir que, a diferencia de lo establecido para complejos

análogos de platino(II), en los complejos de paladio(II) investigados, la esterificación del grupo carboxi del diaminoacidato quelante no es un requisito insoslayable para la reactividad frente al DNA nativo.

Tabla XX . Comparación de los parámetros de desnaturalización del DNA nativo y en presencia de los complejos de paladio(II) investigados a una concentración equivalente ($r=0.0020$). (Símbolos y aclaraciones con igual significado que en Tabla XIX).

Muestra	$T_m(^{\circ}C)$	H%	$\Delta T(^{\circ}C)$
DNA nativo	68.9	33.5	8.8
DNA+[Pd(dapH)Cl ₂]	46.1	14.1	5.6
DNA+[Pd(dabH)Cl ₂]	44.1	13.6	5.6
DNA+[Pd(dap-Et)Cl ₂]	48.0	16.3	6.0
DNA+[Pd(dab-Et)Cl ₂]	40.6	10.1	5.4

En su conjunto, los datos de las Tablas XIX y XX se interpretan en el sentido de que los complejos cis-DDP y [Pd(dab-Et)Cl₂] reaccionan con el DNA nativo, en las condiciones ensayadas, afectando su ordenamiento estructural (y en particular, su estructura secundaria) produciendo efectos comparables a una desnaturalización parcial (tanto más importante cuanto mayor es la concentración del complejo de paladio o el tiempo de incubación del DNA tratado con cis-DDP a $r=0,25$), de modo que, con carácter general, las disoluciones de

DNA tratadas con estos complejos tienen después menores valores de T_m y $H(\%)$ y un valor de ΔT mayor que el DNA nativo.

La figura 38 y los datos de la Tabla XXI muestran los resultados de una experiencia de los efectos del complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ (con $r=0,0020$) sobre la desnaturalización de una muestra de DNA de Streptomices con un 80% de pares de bases complementarias guanina-citosina. Por comparación de estos datos con los de la Tabla XIX, puede verse que este complejo de paladio(II) ejerce sobre los parámetros de desnaturalización del DNA rico en pares GC efectos tan notables como los registrados con DNA de esperma de salmón sonicado o humano, destacando en la Tabla XXI el considerable aumento de la anchura de la transición $\Delta T(16,0^\circ C)$.

C) Efectos sobre la renaturalización del DNA.

Se han investigado también los efectos del complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ sobre la renaturalización del DNA, obteniéndose los resultados que se ilustran en la figura 39. Puede apreciarse en los datos (1) de esta figura que la adición del complejo de paladio tras la desnaturalización térmica del DNA nativo no inhibe su renaturalización, que es casi completa incluso cuando la concentración del complejo es de $r=0,0025$. Sin embargo, los datos (2) revelan que la adición del complejo de paladio al DNA nativo previa a su desnaturalización produce una ligera inhibición de la renaturalización, tanto más

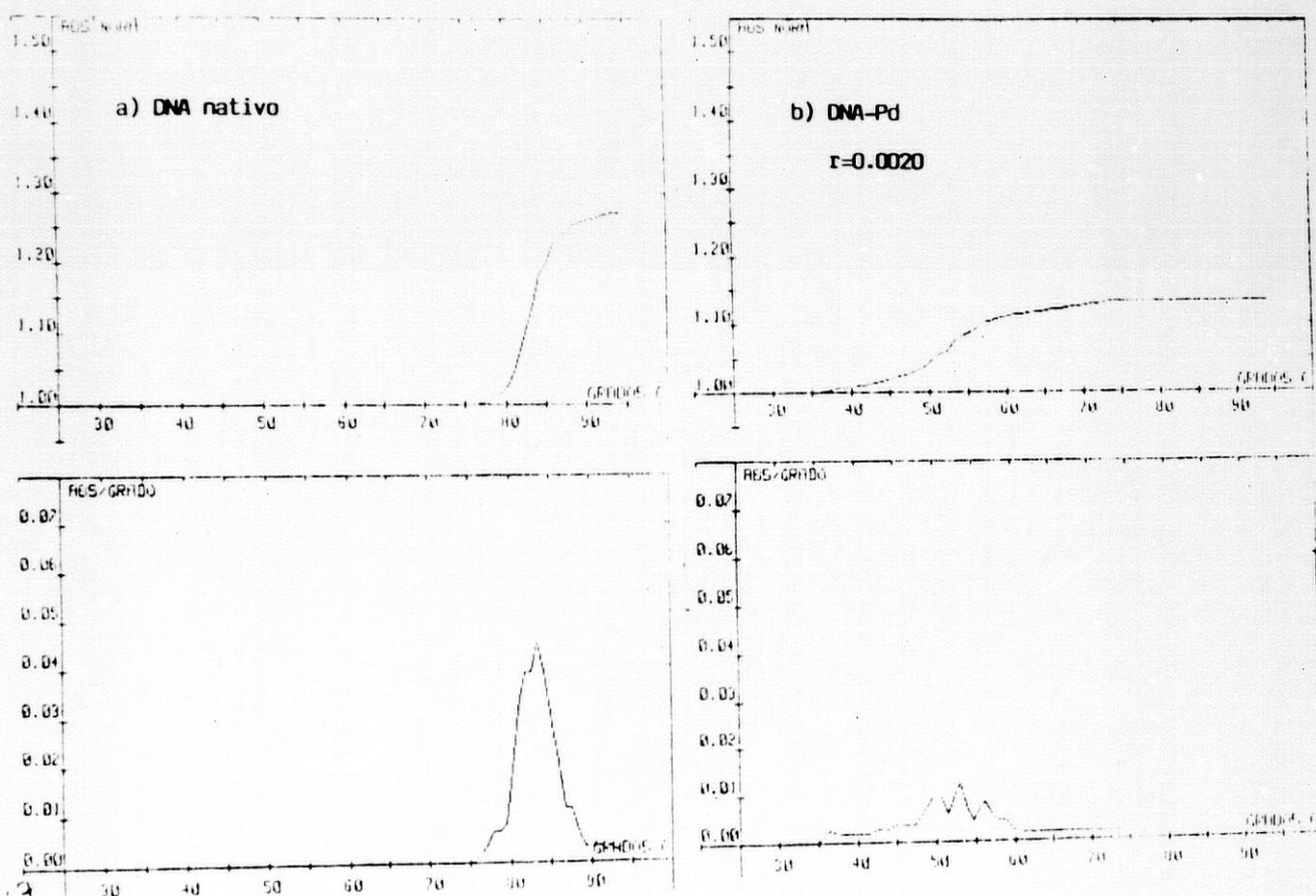


Figura 3B. Curvas de desnaturalización del DNA de Streptomyces (con 80% de pares GC): a) nativo, y b) tratado previamente con $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ a una concentración de $r=0.0020$ y para un tiempo de incubación de 15 min.

Tabla 21. Parámetros de desnaturalización (fusión) del DNA de Streptomicas (contenido en GC = 80%) en presencia de $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ ($r=0.0020$) para un tiempo de incubación de 15 min.

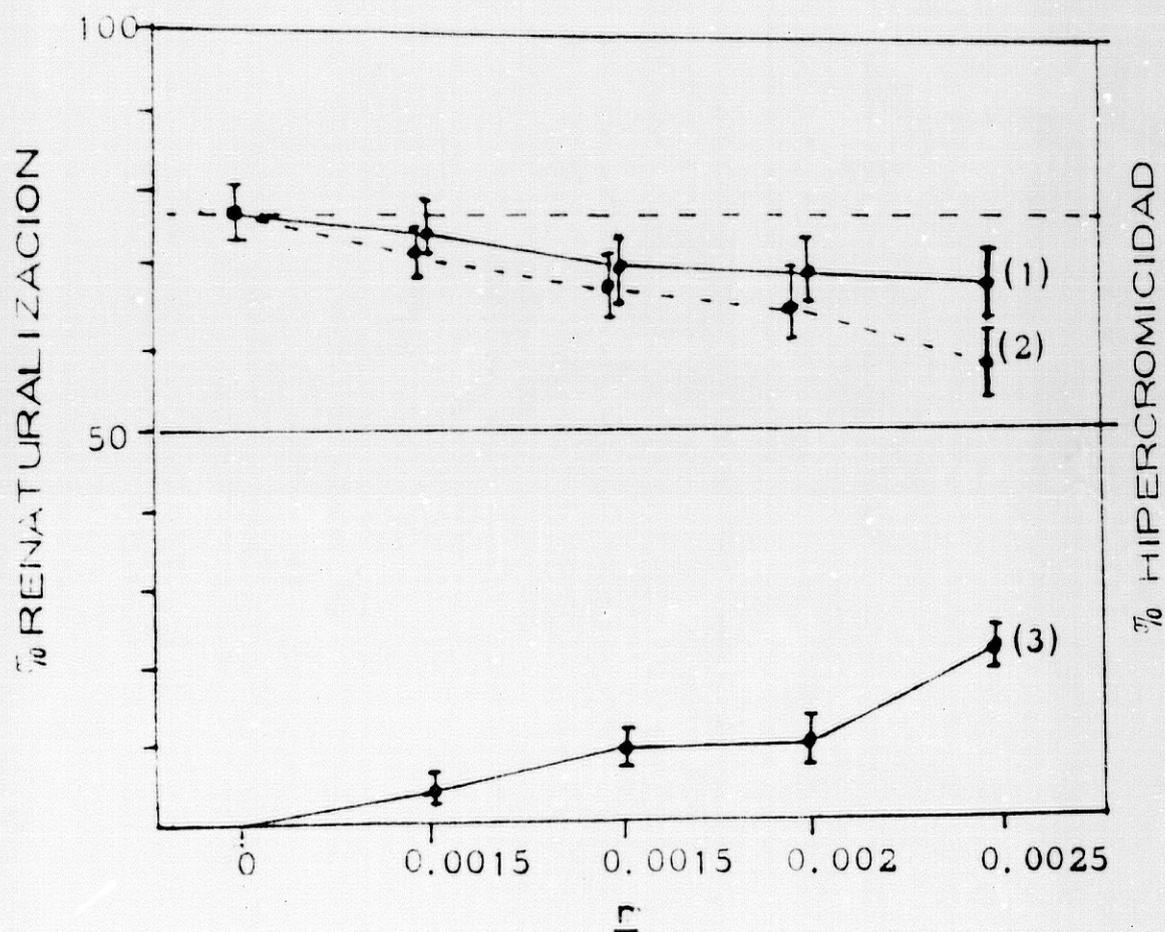
	<u>T_m (C)</u>	<u>H (%)</u>	<u>2σ (C)</u>
DNA nativo	84.7	27	5.1
DNA-Pd	53.4	11.9	16.0

T_m: Temperatura de fusión (desnat. 50%) de la molécula de DNA.

H : Hiper Cromicidad.

2σ: Anchura de transición

importante cuanto mayor es el valor de r (concentración del complejo de paladio). Los datos (3) de la figura 39 representan el aumento de cronicidad del DNA (a 25°C) por adición del complejo de paladio(II) a las mismas concentraciones (o lo que es lo mismo, la reducción de la hipercronicidad del DNA tratado con complejo respecto al DNA nativo tras su desnaturalización - ver Tabla XIX). Puede verse entonces que el porcentaje de inhibición de renaturalización que se registra para el DNA tratado previamente a su desnaturalización es del mismo orden que el porcentaje de aumento de cronicidad producido por el complejo a igual concentración (r) sobre DNA nativo (25°C). Esto significa que la reacción del complejo de paladio(II) sobre el DNA nativo produce lesiones que no sólo favorecen su desnaturalización sino que, en la misma proporción, dificultan su renaturalización tras su desnaturalización térmica.



(1) Incorporación del complejo tras la desnaturalización por calor.

(2) Incorporación del complejo previo a la desnaturalización por calor.

(3) Valores de aumento de cromicidad del DNA por la adición del complejo ($T = 25\text{ C}$).

Figura 39. Efectos de $[\text{Pd}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$ sobre la renaturalización del DNA.

d) Cinética de la desnaturalización de cromatina.

En los ensayos de desnaturalización de la cromatina, aislada de eritrocitos de pollo, se ha encontrado que el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ a concentración $6,8 \times 10^{-6} M$ produce la precipitación de las proteínas cromosomales tras una incubación de 15 min. a $25^\circ C$. A una concentración de complejo menor, $3,3 \times 10^{-7} M$, se detectó un aumento del porcentaje de hipercromicidad tras la fusión del 5% y que la precipitación de las proteínas cromosomales tenía lugar al elevar la temperatura a $50^\circ C$. Estos resultados revelan que el complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ es también activo frente al DNA ligado a proteínas "in vitro", con una actividad dependiente de la concentración de complejo y esta reactividad complejo-cromatina implica la capacidad del complejo de paladio para afectar al ordenamiento estructural de las proteínas y del DNA constituyentes de la cromatina.

e) Consideraciones adicionales .

Muchas de las experiencias "in vitro" de la actividad de los complejos frente a DNA se han realizado a $pH=7,2$ y en medio $0,1 \times SSC$, lo que supone una concentración moderada de cloruro del orden de $1,5 \times 10^{-2} M$. En estas circunstancias, los productos esterificados $[Pd(L-Et)Cl_2]$ deben existir mayoritariamente como el hidroxocloro-complejo neutro $[Pd(L-Et)Cl(OH)]^0$ y su especie dinuclear μ, μ -dihidroxoc-complejo catiónico $[Pd_2(L-Et)_2(OH)_2]^{2+}$ y como el aqua-hidroxoc-complejo

$[\text{Pd}(\text{L}-\text{Et})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$, también catiónico, por lo que no resulta sorprendente que se trate de complejos muy reactivos frente a DNA y frente a cromatina. Por otra parte, los correspondientes complejos "ácidos" $[\text{Pd}(\text{L}-\text{H})\text{Cl}_2]$, a pH fisiológico y con concentración de cloruro moderada, deben existir fundamentalmente como hidroxocloro-complejos aniónicos $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}(\text{OH})]^-$ en equilibrio con el μ, μ -dihidroxocomplejo dinuclear neutro $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]^0$ y también como el aqua-hidroxoc-complejo neutro $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^0$. Esta especie, que ve favorecida su formación a medida que disminuye la concentración de cloruro, debe también contemplarse como un complejo reactivo frente a DNA nativo (y probablemente frente a cromatina) al no plantear dificultades por la ausencia de carga iónica y contener una molécula de agua coordinada que es un excelente grupo saliente. Además, debe tenerse en cuenta que los procesos de sustitución de ligandos en complejos de paladio(II) se estiman del orden de 10^9 veces más rápidos que los de platino(II), lo que representa una notable agilidad de los equilibrios de interconversión de los diferentes coomplejos de paladio(II) que coexisten para transformarse en aquella especie que pueda ser retirada del medio por reacción con DNA o con otras posible biomoléculas. Sobre esta base, se comprende no sólo la elevada velocidad con que los complejos de paladio(II) investigados reaccionan con DNA nativo de distintas procedencias y con cromatina aislada, sino que también se explica que en los referidos complejos de paladio(II) "ácidos" y "esterificados" no se aprecien diferencias significativas en reactividad frente a DNA nativo que, por el contrario, fueron

señaladas por INAGAKI, KIDANI y cols.³⁷ para los complejos análogos de platino(II).

VI.2. Ensayos "in vivo" con cromatina y cromosomas.

Las referidas experiencias "in vitro" aportan evidencias de la capacidad de los complejos de paladíos investigados para reaccionar con DNA nativo y con cromatina aislada. Sobre esta base y con conocimiento de los resultados de los ensayos microbiológicos y parasitológicos, antes referidos, se planteó la conveniencia de investigar la capacidad de dichos complejos de paladio(II) sobre cromatina y cromosomas "in vivo". Estas experiencias descritas en el apartado IV-2 de la Parte B de la Memoria, se hicieron para poner de manifiesto los posibles efectos de una microinyección (0,5 μ l) de [Pd(dab-Et)Cl₂] (10⁻⁶M) sobre la organización del DNA cromosómico y su transcripción en larvas de la mosca *Drosophyla hydei*, examinándose los cromosomas politénicos gigantes de sus glándulas salivares (que contienen más de un millar de moléculas DNA yuxtapuestas).

La figura 40 muestra las fotografías de un cromosoma normal (control) y de otro tratado (problema) de una larva microinyectada 4 horas antes con disolución del complejo, ambos teñidos con orceína lactoacética. La comparación de ambas fotografías pone de manifiesto un proceso de colapsación de zonas típicas de descondensación "puffs", tras la microinyección del citado complejo. Esta experiencia debe

interpretarse como una evidencia experimental de la capacidad del complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ de interactuar no sólo con el DNA nativo sino para producir "in vivo" cierta desorganización estructural sobre el DNA cromosómico y/o sobre las partículas nucleosomáticas y otras fracciones del DNA asociadas a proteínas.

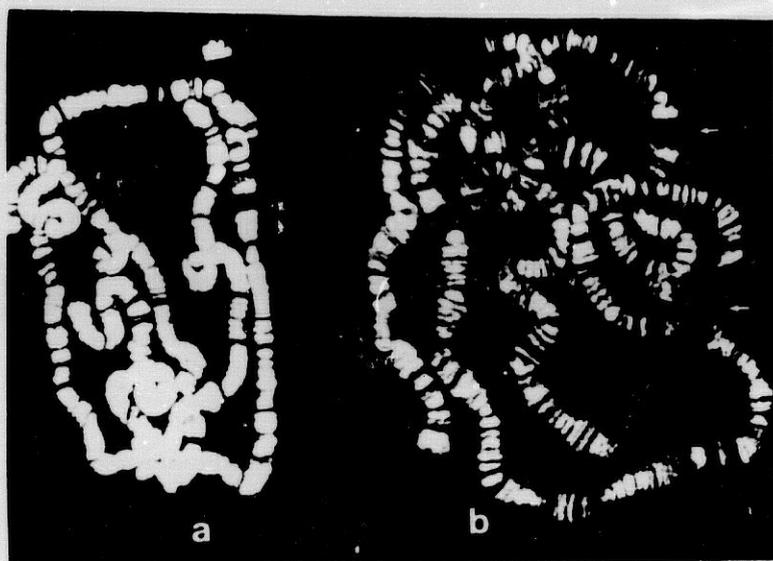


Figura 40.- Fotografías de microscopio óptico (fotónico) de cromosomas de glándulas salivares de larvas de *Drosophyla hydei*, teñidos con orceína lactoacética.

b) Cromosoma control de larva no tratada.

a) Cromosoma de larva previamente (4 horas) microinyectada (0,5µl) con $[Pd(dab-Et)Cl_2] 10^{-6}M$.

Microfotografías de un cromosoma normal y de otro "tratado", de una larva de *Drosophyla* microinyectada 4 horas antes con disolución de $[\text{Pd}(\text{dab-Et})\text{Cl}_2]$ 10^{-6}M , ambos teñidos con anti-cuerpo-fluoresceína, han permitido examinar la formación de los híbridos DNA:RNA. De su examen se pudo concluir que el citado complejo de paladio(II) ejercía "in vivo", en las condiciones de la experiencia, una marcada inhibición a nivel de la transcripción, apreciándose que el nivel de RNAs transcritos nacientes en el cromosoma de la larva tratada es significativamente menor que en el cromosoma control de una larva no tratada con el citado complejo de paladio(II).

VI.3. Consideraciones generales.

La información disponible de las experiencias "in vitro" indican que los complejos de paladio(II) investigados tienen una elevada actividad frente al DNA nativo, al que producen una desestabilización conformacional (sobre todo a nivel de su estructura secundaria) a concentraciones (10^{-6} - 10^{-7}M) 100-250 veces menores que las requeridas por cis-DDP para producir efectos comparables. Los complejos de paladio(II) son también activos frente a cromatina aislada. Sobre esta base, la diferencia esencial en la reactividad frente al DNA del cis-DDP y de los cis-dicloro-complejos de paladio(II) con diaminoácidos y sus ésteres parece ser de origen cinético, que confiere una agilidad mucho mayor a los equilibrios establecidos por los complejos de paladio(II). Esta interpretación es compatible con

la ausencia de diferencias significativas en el comportamiento de los cis-dicloro-complejos de paladio(II) con los diaminoácidos y con sus respectivos ésteres etílicos, que contrasta con la distinta reactividad frente al DNA descrita para los cis-dicloro-complejos de paladio(II) con los mismos diaminoácidos y sus ésteres. La potencial actividad antitumoral de los complejos de paladio(II) investigados se ve, además, resaltada por las experiencias "in vivo" que revelan la capacidad del cis-dicloro(Etil-2,4-diaminobutirato) paladio(II) [Pd(dab-Et)Cl₂], ensayado como complejo representativo de entre los aquí estudiados, para reaccionar, no sólo con el DNA, sino también con las "partículas DNP" en la cromatina y con ordenamientos estructurales de nivel superior como son los cromosomas, a los que produce una apreciable desorganización estructural que afecta incluso al proceso de transcripción, inhibiendo la formación de híbridos DNA:RNA. Esta circunstancia constituye un respaldo importante a las expectativas que los cis-dicloro-complejos de paladio(II) con diaminoácidos y sus ésteres despiertan como potenciales agentes anticancerígenos, dado que se dispone de creciente evidencia experimental, en parte relacionada con los mecanismos de reparación del DNA, que apunta la posibilidad de que las diferencias entre complejos activos e inactivos para el tratamiento del cáncer no sólo implican diferencias en su modo de acción sobre la doble hélice del DNA, sino que también afectan a su actividad frente a las proteínas de los cromosomas (histonas, polimerasas) y sobre el propio ordenamiento estructural (DNA+proteínas) de la cromatina condensada o dispersa.

VII.- CONSIDERACIONES FINALES.

Los resultados del presente estudio revelan un comportamiento electrométrico de disoluciones diluidas ($\sim 10^{-3}M$) de los complejos ácidos $[Pd(LH)Cl_2]$ y esterificados $[Pd(L-Et)Cl_2]$ que difiere, no sólo por los efectos de la disociación del grupo carboxílico o de su esterificación sobre la carga de las especies en equilibrio, sino también por los efectos que conlleva la presencia de estos complejos en un medio rico o pobre en cloruro. En cualquier caso, los equilibrios que se establecen en disolución son lo suficientemente rápidos para seguirse por vía potenciométrica y conductimétrica, circunstancia que explica, para ambos tipos de complejos, la formación de una o varias especies neutras, a pH fisiológico y concentración de cloruro $\sim 0.1M$, capaces de difundir por membranas biológicas para, en el interior de las células, donde la concentración de cloruro desciende a $3-4 \times 10^{-3}M$, dar una o varias especies neutras o catiónicas que, conteniendo un ligando agua, que se comporta como buen grupo saliente, puedan resultar activas frente a otros grupos, como las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.

Los ensayos microbiológicos, parasitológicos y de reactividad frente a DNA nativo y frente a cromatina aislada, revelan que los cuatro complejos de paladio(II) investigados tienen semejante actividad, a concentraciones siempre comprendidas entre $10^{-6}M$ y $10^{-9}M$, sin que se observe en particular la

correlación diaminoacidato / inactivo, diaminoácido esterificado / activo, que han establecido INAGAKI, KIDANI y cols. ³⁷ para complejos análogos de platino(II).

Los datos disponibles no permiten, sin embargo, analizar con mayor detalle las pequeñas diferencias que, en cada experiencia, se observan para los cuatro complejos investigados. Para ahondar en este sentido, sería interesante realizar un estudio potenciométrico más exhaustivo que incluya las valoraciones de disoluciones de complejos en un intervalo de concentraciones más amplio y de menor magnitud (por ejemplo, de $10^{-3}M$ a $10^{-6}M$) y a fuerzas iónicas ajustadas con KCl desde $0.15M$ a $10^{-3}M$, que permita obtener una información más detallada y precisa de las especiaciones que estos sistemas puedan generar en condiciones "modelo" extra- e intra-celulares. El uso combinado de medidas de pH y de Cl^{-} (con un electrodo selectivo apropiado) podrá contribuir a un tratamiento de los datos potenciométricos más amplio por métodos de cálculo, como SUPERQUAD, que conduzcan a sistemas de equilibrios más realistas. Este tipo de experiencias debería también realizarse a temperatura fisiológica de $37^{\circ}C$.

El presente estudio informa también de la actividad del complejo $[Pd(dab-Et)Cl_2]$ sobre los cromosomas politénicos de glándulas salivares de *Drosophyla*, lo que sin duda constituye uno de los datos más prometedores sobre la potencial actividad antitumoral de éste y de los demás complejos de paladio(II) investigados. Este tipo de experiencias debiera extenderse a

ensayos sobre separación del DNA cromosómico de animales tratados que aporte, cuanto menos, un argumento molecular capaz de justificar los resultados histopatológicos obtenidos, que claramente indican la menor toxicidad renal de los complejos investigados frente a la del *cis*-diclorodiaminplatino(II).

Muchas otras experiencias "in vitro" e "in vivo" pueden proyectarse con los complejos de paladio incluidos en el presente estudio, pero la información que de todas o de parte de ellas se deduzca deberá necesariamente utilizarse para diseñar el modo de administración apropiado para ensayar la actividad anticancerígena que, en potencia, se desprende del presente estudio, con animales de experimentación portadores de tumores líquidos o sólidos estandarizados. Las diferencias cinéticas entre complejos de paladio(II) y platino(II) tendrán que contemplarse a este respecto.

CONCLUSIONES

De los resultados del presente estudio y su discusión, en el contexto que marcan los antecedentes bibliográficos, se desprenden las conclusiones siguientes:

A) Sobre las propiedades de los ligandos diaminocarboxilatos y sus ésteres etílicos.

1.- Los diclorhidratos de los compuestos esterificados, α , ω -diaminocarboxilatos de etilo, se comportan en medio acuoso como ácidos dipróticos débiles, con valores de pK_a que, a 25°C y fuerza iónica $I=0.1M(KCl)$, importan 4.88 y 8.32 para 2,3-diaminopropionato de etilo y 6.35 y 9.50 para 2,4-diaminobutirato de etilo.

La magnitud de estas constantes, que se refieren como $pK_1(N)$ y $pK_2(N)$ para cada compuesto, lleva a las siguientes observaciones adicionales:

a) los valores de cada $pK(N)$ respetan la secuencia general $pK(N)$ diaminoácido $>$ $pK(N)$ éster etílico $>$ $pK(N)$ éster metílico, que se explica por la compensación que sobre el efecto $-I$ del grupo α -carboxi ejercen el efecto $+M$ del anión α -carboxilato $>$ efecto $+I$ del sustituyente alquilo (etilo $>$ metilo).

b) Los valores de $pK(N)$ de 2,3-diaminopropionato de etilo y de 2,4-diaminobutirato de etilo son constantes macroscópicas que, como tales, se asignan de forma preferente, aunque no exclusiva, a la disociación de sus grupos α -amónico y β -ó γ -amónico. Esta asignación se apoya

en el carácter interactuante que se deduce para tales grupos en cada compuesto, por analogía y extensión de lo establecido en la bibliografía para los iones α - ω -diamonio-carboxilatos correspondientes.

- 2.- Los espectros IR de los clorhidratos de los aminoácidos, 2,3-diaminopropiónico - clorhidrato, (dapH.HCl), y 2,4-diaminobutírico - diclorhidrato, (dabH-2HCl), y de los diclorhidratos de sus ésteres etílicos, (dap-Et.2HCl) y (dab-Et-2HCl), muestran las absorciones fundamentales de sus grupos funcionales (amónicos y carboxilato o carboxílico o etoxi-carbonílico). En estos espectros:
- No se observan correlaciones entre las frecuencias de los grupos amónicos y su posición relativa (α, β - o α, γ -) en el esqueleto molecular de los compuestos.
 - En todos los casos se registra, entre otros, el desdoblamiento de la banda debida a la deformación simétrica de los grupos amónicos, $\delta_s(\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3)$, señalada por BELLAMY, para los ácidos α, β -dioaminopropiónico y α, β -diaminobutírico.
 - Los efectos de la esterificación se reflejan en la frecuencia de tensión del grupo carbonilo, $\nu(\text{C}=\text{O})$, ligeramente mayor para 2,4-dab-Et que para 2,4-dabH, de acuerdo con el efecto +I del sustituyente etilo amortiguado por la electronegatividad del oxígeno esterificado o protonado.

B) Sobre la obtención y las propiedades fisico-químicas de los complejos investigados.

3.- Por reacción de dicloruro de paladio con los referidos clorhidratos de los α,ω -diaminoácidos o sus ésteres etílicos, en medios ricos en cloruro, ácido neutro, respectivamente, se preparan y aíslan los siguientes cis-diclorocomplejos de paladio(II):

Dicloro(D,L-2,3-diaminopropiónico)paladio(II),

[Pd(dap-H)Cl₂]

Dicloro(D,L-2,4-diaminobutírico)paladio(II),

[Pd(dab-H)Cl₂]

Dicloro(D,L-2,3-diaminopropionato de etilo)paladio(II),

[Pd(dap-Et)Cl₂]

Dicloro(D,L-2,4-diaminobutirato de etilo)paladio(II),

[Pd(dab-Et)Cl₂]

En todos los casos se trata de compuestos policristalinos, de color amarillo-anaranjado, que inician su descomposición pirolítica sobre los 220°C.

4.- Los cuatro compuestos preparados, los α,ω -diaminoácidos (2,3-dapH, 2,4-dabH y sus ésteres etílicos, 2,3-dap-Et, 2,4-dab-Et) se coordinan al paladio(II) por sus nitrógenos amínicos como quelantes bidentados que, en consecuencia, imponen la coordinación cis- a los ligandos cloro que completan la coordinación plano-cuadrada del ion metálico.

Esta conclusión se apoya en la interpretación detallada

de sus espectros IR hecha sobre la base de la esperada estructura plano-cuadrada de los complejos de paladio(II).

5.- El comportamiento potenciométrico (en medio de $[Cl^-] \gg 0.1M$) y conductimétrico (sin electrolito de fondo) de los complejos "ácidos o esterificados", se explica, en líneas generales, por equilibrios que se deducen para la valoración frente a KOH de los diclorocomplejos, $[Pd(LH)Cl_2]$, $[Pd(L-Et)Cl_2]$ y de sus correspondientes diaquo-complejos, $[Pd(LH)(H_2O)_2]^+$, $[Pd(L-Et)(H_2O)_2]^{2+}$. En los complejos ácidos, el primer proceso (Etapa 1, a $2.8 < pH < 4.8$) corresponde a la valoración del grupo carboxílico, mientras que las siguientes etapas (1 y 2, a $4.7 < pH < 8$ y $8 < pH < 11$) corresponden a la sustitución de ligandos cloro o agua por hidroxilo. Los complejos esterificados sólo dan los procesos de sustitución de ligandos cloro o agua por hidroxilo (Etapas 1 y 2, a $4.2 < pH < 8.2$ y $8.2 < pH < 10.3$). En todos los casos, se postula la posibilidad que los mono hidroxilo-complejos condensan dinuclearizándose en μ, μ -dihidroxocomplejos, por eliminación de Cl^- (en medios ricos en este anión) o de agua (en medios pobres en cloruro).

6.- Los estudios potenciométricos revelan que, en condiciones fisiológicas de pH y medios ricos en cloruro, los complejos ácidos $[Pd(LH)Cl_2]$ deben existir en las formas aniónicas $[Pd(L)Cl_2]^-$ y $[Pd(L)Cl(OH)]^-$, y en la especie

dinuclear neutra $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]$, aunque la formación de ésta última esté reprimida por la elevada concentración de cloruro del medio. Se estima, no obstante, que la electroneutralidad de esta especie puede contribuir a la difusión de estos complejos por membranas biológicas.

7.- En medios pobres en cloruro y en condiciones fisiológicas de pH, los estudios conductimétricos sugieren que los complejos ácidos deben coexistir con la especie catiónica $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ y sobre todo las especies neutras $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^0$ y $[\text{Pd}_2(\text{L})_2(\text{OH})_2]^0$. La naturaleza catiónica de $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ y el carácter saliente del ligando agua en $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^0$ deben contribuir a la reactividad de este complejo frente a DNA y otras biomoléculas.

8.- Los estudios potenciométricos revelan que, en condiciones fisiológicas de pH y medios ricos en cloruro, los complejos esterificados, $[\text{Pd}(\text{L}-\text{Et})\text{Cl}_2]$, deben coexistir como tales dicloro-complejos neutros en equilibrio con el hidroxocloro-complejo, $[\text{Pd}(\text{L}-\text{Et})(\text{Cl})(\text{OH})]$, también neutro, y la especie dinuclear catiónica $[\text{Pd}_2(\text{L}-\text{Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$, cuya formación debe estar inhibida por la elevada concentración de cloruro. La electroneutralidad de las especies dicloro- e hidroxocloro-mononucleares debe favorecer su difusión por membranas biológicas.

9.- En medios pobres en cloruro y en condiciones fisiológicas de pH, los estudios conductimétricos revelan que los complejos esterificados deben coexistir sólo como las especies catiónicas $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{L-Et})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$ y $[\text{Pd}_2(\text{L-Et})_2(\text{OH})_2]^{2+}$, que resultarían reactivas frente al DNA.

C) Sobre la actividad de los complejos de paladio(II) frente a Escherichia coli y frente a Tripanosoma cruzi.

10.- Los cuatro complejos investigados inhiben el crecimiento de Escherichia coli (cepa K-12) en medio de cultivo "C" moderadamente rico en cloruro, a concentraciones del orden de 50 a 75 μM , induciendo la formación de formas multinucleadas, de aspecto filamentosas, a concentraciones algo menores que éstas, hechos que revelan indirectamente la capacidad de los cuatro complejos investigados para atravesar las membranas bacterianas y afectar a las biomoléculas responsables de la multiplicación celular.

11.- La actividad biológica de los complejos de paladio investigados se pone también de manifiesto por su capacidad absoluta, a concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de inhibir la multiplicación de formas epimastigotas de tripanosoma cruzi en cultivos de células Hella (500.000 - 1.000.000 parásitos/ml). Esta actividad parasitocida es similar en los cuatro complejos investigados y comparable también a la del cis-diclorodiamín platino(II) con el que

muestran diferencias en la evolución de la actividad con el tiempo, que se atribuyen a la influencia de las cinéticas, rápidas de los complejos de paladio(II) y lenta del cis-platino sobre sus actividades biológicas (parasitológicas).

D) Sobre los efectos toxicológicos de los complejos de paladio(II) en ratones.

12.- Los resultados histopatológicos revelan, además, que a dosis equivalentes a 10 veces la LD₅₀ del cis-DDP, que afectan seriamente al riñón (a nivel corticomedular) y al bazo, el complejo cis-dicloro (2,4-diaminobutirato de etilo) paladio(II) no produce lesiones histológicas apreciables al microscopio óptico, poniendo de manifiesto su evidente menor toxicidad.

E) Sobre la actividad de complejos de paladio(II) frente a DNA, cromatina y cromosomas.

13.- Los ensayos espectrofotométricos, de desnaturalización y de renaturalización, indican que los complejos investigados producen una perturbación del ordenamiento estructural del DNA nativo, desestabilizando en particular su estructura secundaria, de forma prácticamente inmediata, muy eficaz y suficientemente persistente como para ser considerados potenciales

agentes anticancerígenos.

14.- Medidas espectrofotométricas y parámetros de desnaturalización de DNA nativo y tratado con distintos complejos, revelan que la actividad de los complejos de paladio(II) investigados frente al DNA nativo dependen, en cierto modo, de su concentración, creciendo la actividad con cierta regularidad dentro del intervalo de concentraciones ensayado, de $r=0.0005$ a $r=0.0025$. Además, los complejos de paladio(II) investigados ejercen, a concentraciones 10^{-6} - 10^{-9} M, de 100 a 250 veces menores y de forma inmediata, efectos sobre el DNA nativo comparables a los producidos por el cis-platino ($r=0,25$ y 48 horas de incubación).

15.- No se observan diferencias sustanciales en la reactividad de los cuatro complejos de paladio(II) investigados frente al DNA nativo y, en particular, la correlación diaminoácido esterificado/actividad frente a diaminoacidato/inactividad observada en cis-diclorocomplejos de platino(II) con estos quelantes orgánicos no es válida para sus análogos de paladio(II). Esta sustancial diferencia entre dicloro-complejos de platino(II) y de paladio(II) con diaminoácidos y sus ésteres etílicos se explica en base a la influencia de sus cinéticas, lenta y rápida, respectivamente, sobre las especies que de tales productos coexisten en equilibrio, a pH fisiológico y concentraciones de cloruro elevadas (

$\sim 0.1M$) o bajas ($\sim 4 \times 10^{-3}M$) que son propias de fluidos extra- e intra-celulares, respectivamente.

16.- Se demuestra, también, que el complejo cis-dicloro (2,4-diaminobutirato de etilo) paladio(II) produce desnaturalización de la cromatina aislada de eritrocitos de pollo a concentraciones del orden 10^{-7} - $10^{-6}M$, indicando que, en las condiciones ensayadas, el complejo de paladio(II) afecta al DNA asociado a proteínas en la cromatina.

17.- Los ensayos "in vivo" con larvas de la mosca *Drosophyla hydei* revelan, además, la capacidad del complejo dicloro (2,4-diaminobutirato de etilo) paladio(II) para producir cierta desorganización estructural sobre el DNA de los cromosomas politénicos de las glándulas salivares y/o sobre partículas nucleosómicas y otras fracciones del DNA asociadas a proteínas. Esta actividad del complejo sobre la cromatina y los cromosomas "in vivo" se acompaña de una marcada capacidad para inhibir la transcripción, fenómenos que constituyen un importante respaldo para las expectativas que los cis-diclorocomplejos de paladio(II) con diaminoácidos y sus ésteres despiertan como potenciales agentes antitumorales.

B I B L I O G R A F I A

- 01.- B. ROSENBERG, L. VAN CAMP Y T. KRIGAS, Nature (London), 205, 698 (1965).
- 02.- B. ROSENBERG, L. VAN CAMP, J.E. TROSKO y W.H. MANSOUR, Nature (London) 222, 385 (1969).
- 03.- Una selección quincenal de la bibliografía relativa a la quimioterapia del cancer, recogida en el Chemical Abstracts, se tiene en la serie "Antitumor agents" de los "Chemical Abstracts Selects".
- 04.- M.J. CLEARE, "Transition Metal Complexes in Cancer Chemoterapy", Coord. Chem. Red., 12, 349-405 (1974).
- 05.- T.A. CONNORS y J.J. ROBERTS (eds.), "Recent Results in Cancer Receach", Vol. 48, Springer-Verlag, New York, 1974.
- 06.- G.L. EICHHORN (eds.) "Inorganic Biochemistry", Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, 1975. Caps.33 (Complexes of Nucleosides and Nucleotides) y 34 (Complexes of Polynucieotides and Nucleit Asids).
- 07.- H. SIGEL (ed.), "Metal Ions in Biological systems", Marcel Dekker, New York Basel 1974-1987 (cont.), Vol. 1-25 (cont.)
- 08.- T.G. SPIRO (ed.) "Metal Inos in Biology Serie".

Wiley-Interscience, New York, 1980-(cont.), Vol. 1 (Nucleic Acid-Metal Ion Interactions).

- 09.- A.W. PERESTAYKO, S.T. CROOKE y S.K. CARTER (Eds.), "Cisplatinum Current Status and New Developements", Academi Press, New York, 1980.
- 10.- S.J. LIPPARD (ed.), "Platinum, Gold, and Other Metal Chemoterapeutic Agents", ACS Sympuosiun Series N^o 209, Americam Chemical Society, Washington, D.C., 1983.
- 11.- D.C.H. Mc BRIEN y T.F. SLATER (eds.), "Biochemical Mechanism of Platinum Antitumor Drugs", IRL Press, Oxford, 1986.
- 12.- a) S.J. LIPPARD, "Chemistry and Molecular Biology of Platinum Anticancer Drugs", Pure Appl. Chem., 59, 731-42 (1987), Conferencia Inaugural de Red.
- b) J. REEDIJK, A.M.J. FICHTINGER-SCHEPMAN, A.T. VAN OOSTEROM y P. VAN de PUTTE, Platinum amine coordination compounds as anti-tumor drugs. Molecular aspects of the mechanis of accion, Struc. Bonding, 67, 53-89 (1987).
- 13.- a) III International Conference on Bio-Inorganic Chemitry, Noordwijkerhout, Holanda, 1.987.
- b) IV International Conference on Bio-Inorganic Chemistry,

Cambridge, Massachusetts, USA, 1989.

14.- Fifth International Symposium on Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy, Padova, Italia, 1987.

15.- Symposium on Metal Compounds in the Detection and Treatment of Cancer, Marysville, Victoria, Australia, 1989.

16.- B. ROSENBERG, Platinum Metal Rev., 15, 3 (1973).

17.- S. RESLOVA, Chem. - Biol. Interaction, 4, 66 (1971).

18.- B. ROSENBERG, "Platinum Complexes for the Treatment of Cancer", Cap. 1 en ref. 8.

19.- B. ROSENBERG, "Clinical Aspects of Platinum Anticancer Drugs", Cap. 3, Vol. 11 en ref. 7.

20.- M.J. CLEARE y P.C. HYDES, "Antitumor Properties of Metal Complexes", Cap. 1, Vol. 11 en ref. 7.

21.- A.J. THOMPSON, R.J.P. WILLIAMS y S. RESLOVA, "The Chemistry of Complexes Related to $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$. Anti-Tumor Drugs", Struct. Bonding (Berlin), 11, 1 (1972).

22.- M.E. HOWEN-GRANT y S.J. LIPPARD, "Aqueous Platinum(II)

- Chemistry; Binding to Biological Molecules", Cap. 2, Vol. 11 en ref. 7.
- 23.- W. SAENGEL, "Principles of Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag, New York, 1984.
- 24.- R.R. SINDEN, "Supercoiled DNA: Biological Significances", J. Chem. Educ., 64, 294 (1987).
- 25.- J.K. BARTON y S.J. LIPPARD, "Heavy Metal Interactions With Nucleic Acids", Cap. 2. en ref. 8.
- 26.- J.J.ROBERTS Y M.F. PERA, "DNA as a target for anticancer Coordination Compounds", Cap 1. en ref. 10.
- 27.- KINAGAKI y Y. KIDANI, Inorg. Chim. Acta, 46, 35 (1980).
- 28.- R.B. MARTIN, "Hidrolitic Equilibrio and N7 Versus n1 Binding in Purine Nucleoside of cis-Diaminendichloroplatinum(II): Palladium(II) as a guide to Platinum(II) Reactions at Equilibrium", Cap 11 en ref. 10.
- 29.- T.D. TULLIUS, H.M. USHAY, C.M. MERKEL, J.P. CARADONNA Y S.J. LIPPARD, "Structural Chemistry of Platinum-DNA Adducts". Cap. 3 en ref. 10.
- 30.- S. SHERMAN, D. GIBSON, A.H.J. WANG Y S.J. LIPPARD,

Science, 230, 412 (1985).

31.- J.L. VAN DER VEER, G.J. LIGTVOET, H. VANDER ELST Y J. REEDIJK, J. Am. Chem. Soc., 108, 3860 (1986).

32.- J.L. BUTOUR Y N.P. JOHNSON, Biochemistry, 25, 4534 (1986).

33.- W. BECK, H. BISSINGER, M. GIRNTH-WELLER, B. PURCKER, G. THIEL, H. ZIPPEL, H. SCHÖNENBERGER, W. WAPPES Y H. SCHÖNENBERGER, Chem. Ber., 115, 2256. (1982)

34.- J.J. KHARITONOV, H. BISSINGER, E. AMBACH y W. BECK, Z. Naturforsch., 37b, 1034 (1982).

35.- H. SEINBERGER, B. WAPPES, H. SCHÖNENBERGER, W. BECK, M. GIRNTH-WELER Y G. RUCKDESCHEL. Arch., Pharm., 316, 121 (1983).

36.- K. INAGAKI, Y. KIDANI, K. SUZUKI y T. TASHIRO, Chem. Pharm. Bull, 28, 2286 (1980).

37.- J.P. MACQUET., J.L. BUTOUR y N.P. JOHNSON,
"Physicochemical and Structural Studies of the in vivo
Interaction between Platinum(II) Compounds With DNA", Cap.
4 en ref. 10.

38.- R.P. GRAHAM y D.R. WILLIAMS, J. Inorg. Nucl. Chem., 41,
1245 (1979).

- 39.- D.S. GILL, Dev. Oncol., 17, (Platinum Coord. Complexes Cancer Chemother.), 267 (1984).
- 40.- R.D. GRAHAM y D.R. WILLIAMS, J. Chem. Soc., Dalton, 1.123 (1974) y p. 27 en ref. 5.
- 41.- S. KIRSCHNER, A. MAURER Y C. DRAGULESCU, J. Clin. Hematol. Oncol., 7, 190 (1977).
- 42.- M. DAS y S.E. LIVINGSTONE, Brit. J. Cancer, 38, 325 (1978).
- 43.- A.J. CHARLSON, R.J. BANNER, R.P. GALE, N.T. McARDLE, K.E. TRANOR y E.C. WATTON, J. Clin. Hematol. Oncol., 7, 294 (1977) y Cancer Treat. Rep., 61, 469 (1977).
- 44.- R.B. ROBERTS, P.H. ABELSON, D.B. COWIE, E.T. VOLTON y R.J. BRITTEN, "Studies of Biosynthesis in Escherichia Coli", Carnegia Inst. Wash. Publ. 607, 1955.
- 45.- A. ALCOVER, M. IZQUIERDO, B.D. STOLLAR, Y. KITAGAWA, M. MIRANDA y C. ALONSO, Chromosoma 87 262 (1982).
- 46.- R.B. MARTIN, "Complexes of α -aminoacids with chelatable side chain donor atoms", cap. 1 del vol. 9 en ref. 7, 1979.

- 47.- R.W. HAY y P.J. MORRIS, J. Chem. Soc., Perkins II, 1021 (1972).
- 48.- G.BROOKES Y L.D. PETITT, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 42 (1976).
- 49.- A. GERGELY, E. FARKAS, I. NAGUYPAL y E. KAS, J. Inorg. Nucl. Chem., 40, 1709 (1978).
- 50.- M. LOPEZ YERON, "Síntesis y estudio del Acido L-Ornitin-N,N,N'N'-Tetrakis (carboximetil) y de su capacidad complejante frente a Cu(II), Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Dep. Química Inorgánica Farmacéutica, Granada, 1981.
- 51.- A. ALBERT y E.P. SERJEANT, "The Determination of Ionization Constants", Chappman an Hall, London, 1971.
- 52.- L.J. BELLAMY, "The infrared spectra of complex molecules", 3ª Edic., Chappman Hall, London, 1975).
- 53.- K.NAKAMOTO, "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", 3ª Edic. Wiley-Interscience, New York, 1978.
- 54.- M.C. LOPEZ, L.M. RUIZ, D. CRACIUNESCU, A. DOADRIO, A. OSUNA y C. ALONSO, Chem. Biol. Interact, 18, 99 (1986).

55.- J.P. MACQUET y J.L. BOUTOUR, *Biochimie*, 60, 901 (1974).