

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
folio 40 número 109 del libro
irrespondiente.
Sevilla, 18 JUL 1999

El Jefe del Departamento de Fisiología,

Fatima Azzahra



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**MODIFICACIONES DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEOLARES EN CÉLULAS
TUMORALES EN CULTIVO INDUCIDAS POR LA ACCIÓN DE
COMPLEJOS METÁLICOS DE NUEVA SÍNTESIS**

**Tesis Doctoral presentada por
Fatima-Azzahra DELMANI
Sevilla 1999**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD
179

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Titulada: Modificaciones de la cinética de crecimiento y expresión de proteínas nucleares en células humales en cultivo ... sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

FATIMA-AZZAHRA DELMANI

Firmado:

Sevilla, a 09 de 02 de 199 2000

biblio

R. 18.712



**MODIFICACIONES DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEOLARES EN CÉLULAS
TUMORALES EN CULTIVO INDUCIDAS POR LA ACCIÓN DE
COMPLEJOS METÁLICOS DE NUEVA SÍNTESIS**

Trabajo realizado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por la licenciada

Fatima-Azzahra Delmani

Sevilla, 1999

Directores:

Dr. Javier Moreno Onorato
Profesor titular de Biología Celular
Celular
Universidad de Sevilla

Dr. Gregorio García Herdugo
Catedrático de Biología
Universidad de Sevilla

GREGORIO GARCÍA HERDUGO, Catedrático y Director del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: *Modificaciones de la cinética de crecimiento y expresión de proteínas nucleolares en células tumorales en cultivo inducida por la acción de complejos metálicos de nueva síntesis*, presentada por Da. Fatima-Azzahra Delmani para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, se ha realizado en los laboratorios de este Departamento bajo mi Dirección y la del profesor D. Javier Moreno Onorato.



Sevilla, 11-07-99
Fdo. Gregorio García Herdugo



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha contado con el apoyo de muchas personas y no quisiera dejar de expresarles mis sinceros agradecimientos:

En primer lugar, me gustaría expresar a mis directores de tesis, el Dr. Javier Moreno Onorato y el Dr. Gregorio García Herdugo, mi más sincero agradecimiento por todo el asesoramiento y apoyo puestos en la realización de la misma. Ellos han sido mis guías en mis primeros pasos en el largo camino de la investigación científica.

Quisiera agradecer de un modo muy especial a Remedios García Navarro "Reme" su ayuda desinteresada y el apoyo que me ha ofrecido durante todo este tiempo.

Al Dr. José Torreblanca por su ayuda inestimable y por todos los fines de semanas en los que tenía que venir para darles de comer a las células.

A la Dra. Josefina Hidalgo y al Dr. Ángel Velasco por todas las cuestiones que les he planteado y por todo el material que me han prestado durante estos cuatro años.

A todos los miembros del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Sevilla, especialmente, a José-María Sanabria y a Asún, por su ayuda en la manipulación de los microscopios y por sus infinitos intentos de enseñarme cómo sacar una buena foto.

A Emilia Osona Sánchez, secretaria del Departamento, por su amistad y preocupación por mi trabajo.

A los doctores D. Francisco González Vilchez y Dña. Rosario Vilaplana por administrarnos el famoso compuesto RAP.

También quisiera agradecer a todos los miembros del Departamento de Biología Celular por los buenos momentos que hemos pasado juntos, sin olvidar a todas aquellas personas a las que no he nombrado y que de una u otra manera me ayudaron en la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros por tantos buenos ratos vividos y, especialmente, a Ilham Bettahi por haberme apoyado en todo momento durante estos años en España.

A mi familia por haberme aguantado tantos años y por haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí.

Y por último quisiera agradecerle a Raed por haber estado siempre a mi lado, por su amor y, sobre todo, por aguantarme durante todo este tiempo.

**A mis Padres y mis hermanos
A Raed**



ÍNDICE	i
LISTA DE ABREVIATURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
I- Complejos metálicos con actividad antitumoral	1
1-Complejos de platino	1
2-Tipos de enlaces formados con el DNA	2
3-Citotoxicidad inducida por el platino	6
4-Proteínas que reconocen específicamente el DNA modificado por cisplatino	7
4-1-Proteínas de reparación	7
4-2-Otras proteínas que se unen al DNA-cisplatino	8
5-Otros complejos a base de platino	9
6-Complejos a base de rutenio	9
7-Complejos a base de rutenio con ligandos de PDTA	11
8-Síntesis de un nuevo complejo octaédrico antitumoral a base de rutenio	12
II-Nucleolo	15
1-Núcleo y nucleolo	15
1-1-Recuerdo histórico del nucleolo	15
1-2-Otras características del nucleolo	16
1-3-Síntesis y procesamiento de los RNAs	18
2-Componentes nucleolares	20
2-1Centros fibrilares	22
2-2-Componente granular	22
2-3-Componente fibrilar denso	23
2-4-Cromatina asociada al nucleolo	24
3-Región organizadora del nucleolo (NOR)	25

4-Proteínas nucleolares	25
4-1-Factores de transcripción	26
4-2-Otras proteínas nucleolares	28
4-2-1-Proteína B23	28
4-2-2-Proteína C23	28
4-2-3-Fibrilarina	29
5-Variabilidad de la organización nucleolar	29
5-1-Variabilidad durante el ciclo celular	31
5-2-Variabilidad durante la diferenciación	31
5-3-Variabilidad nucleolar inducida	32
III-OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1-Cultivo de líneas celulares	35
1-1-Tratamientos	35
2-Experimentos con linfocitos	36
2-1-Cultivo de células sanguíneas	36
2-2-Extracción y aislamiento de linfocitos	36
3-Obtención de colonias, fijación y tinción	37
4-Anticuerpos	38
5-Proliferación celular E.L.I.S.A.	38
6- Ensayo de electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o “ensayo cometa”	39
6-1-Preparación de los portaobjetos	39
6-2-Preparación de las muestras	39
6-3-Pre-electroforesis y electroforesis	40
6-4-Análisis de imagen	40

7-Análisis de proteínas	41
7-1- Obtención de extractos totales	41
7-2-Tinción de nitrato de plata de proteínas generales	42
8-Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa	42
9-Inmunoprecipitación	43
10-Estudio morfológico e inmunocitoquímico	44
10-1-Inclusión en resina Spurr	45
10-1-1-Deshidratación (a 4°C)	45
10-1-2-Impregnación (a 4°C)	45
10-1-3-Polimerización	46
10-2-Inclusión en Lowicryl K4M	46
10-2-1-Deshidratación (a 4°C)	46
10-2-2-Impregnación (a 4°C)	46
10-2-3-Polimerización	46
10-3-Sección de los materiales	47
10-4-Marcaje con el complejo proteína A-oro	47
10-4-1-Preparación del oro coloidal (8 nm)	47
- <i>Solución de oro</i>	47
- <i>Mezcla reductora</i>	47
10-4-2-Preparación del complejo A-oro	48
11-Marcaje inmunocitoquímico para la detección de proteínas nucleolares	48
 RESULTADOS	 50
 1-Cultivo de líneas celulares	 50
2-Efecto del platino sobre la cinética de crecimiento de células TG	54
3-Proliferación celular E.L.I.S.A.	58
4- Valoración de daño en DNA	60
5-Modificación del patrón de proteínas generales	68
6-Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa	70
7-Inmunoprecipitación	72

8- Estudio de proteínas nucleolares mediante técnicas inmunocitoquímicas	74
DISCUSIÓN	80
Efecto del RAP sobre la proliferación de células tumorales cultivadas	81
Estimación del daño sobre el DNA inducido por complejos metálicos: ensayo cometa	83
Alteraciones en el comportamiento de proteínas específicas	85
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	92

LISTA DE ABREVIATURAS

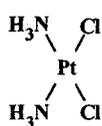
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribosómico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribosómico
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina
DAPI	Diamino-2-Fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Etilendiamino- tetra-acetato
Ep	Eficiencia en placa
FS	Fracción de supervivencia
PBS	Tampón fosfato salino (“Phosphate buffer saline”)
PDTA	1,2-propilendiamino-N,N,N',N'-tetra-acetato
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenil metano sulfonil fluoruro
RAP	(RuLCl ₂)H ₄ H ₂ O, L= PDTA
rpm	Revoluciones por minuto
SCGE	Electroforesis de células aisladas (“Single-cell gel electrophoresis”)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
U.V.	Radiación ultravioleta

INTRODUCCIÓN

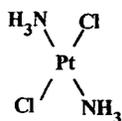
I- Complejos metálicos con actividad antitumoral

1-Complejos de platino

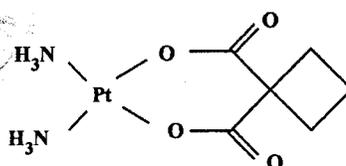
En la década de los años 60, durante un estudio de los efectos de campos eléctricos sobre el crecimiento bacteriano, se observó un fenómeno inesperado cuando se aplicó un campo eléctrico entre los electrodos de platino sumergidos en un cultivo de *Escherichia coli* en condiciones aerobias: las bacterias no se dividían normalmente sino que crecían formando filamentos de longitud superior a 300 veces la normal (Rosenberg et al. 1965). Un producto de electrólisis de los electrodos de platino identificado como *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (Rosenberg et al. 1967), fue el responsable de este sorprendente comportamiento. Más tarde, se encontraron otros complejos metálicos del grupo del platino que eran capaces de inducir crecimiento filamentos en bacterias, curiosamente cuando el componente divalente *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] y sus parientes complejos neutrales *cis*-bis (amino) platino(II) y -platino (IV) eran activos. Por el contrario, los correspondientes isómeros *trans* carecían de esta actividad. Dado que los componentes activos del platino reprimieron la división celular sin matar a la bacteria, se consideró su uso potencial como agentes capaces de detener el crecimiento rápido de células tumorales con poca toxicidad para el animal huésped. Después de unos años, el *cis*-diaminodicloroplatino (II), *cis*-DDP o cisplatino comenzó a utilizarse en el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos (ovárico, cabeza y cuello, vejiga y testicular) con resultados eficaces, en combinación con otros medicamentos. Sin embargo, su isómero el *trans*-DDP o transplatino es mucho menos citotóxico y mutágeno y resulta ineficaz como agente antitumoral (Macquet y Butour 1983, Johnson et al. 1986, Farrell et al. 1989).



cis-DDP



trans-DDP



Carboplatino

Figura 1. Estructura del *cis*-DDP, *trans*-DDP y del carboplatino

Cuando se disuelve el cisplatino o el transplatino en solución acuosa, los iones de cloro se desplazan para permitir la formación de especies que representan las formas reactivas del componente (Lippard 1987). Lo mismo ocurre con el componente cíclico que está unido al platino en el caso del carboplatino (Knox et al. 1986). Por tanto, la concentración de los iones de cloro influye en la reactividad del cisplatino. Tras su administración intravenosa, el cisplatino es relativamente menos reactivo en el espacio extra-celular donde la concentración del cloro es de aproximadamente 100 mM, pero, atravesando la membrana plasmática, su actividad aumenta en el espacio intra-celular donde la concentración del cloro disminuye a 3 mM aproximadamente. El cisplatino activado es un electrófilo potente que puede reaccionar con cualquier nucleófilo, incluyendo los grupos sulfhidrilos en proteínas y los grupos nucleofílicos en ácidos nucleicos (Chu 1994).

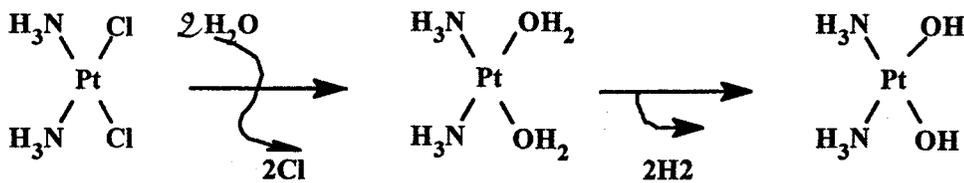


Figura 2. Modificaciones del cisplatino para la formación de especies reactivas en el medio intracelular.

2-Tipos de enlaces formados con el DNA

Las modificaciones inducidas por los compuestos del platino sobre sistemas vivos, desde las bacterias originalmente estudiadas por Rosenberg hasta las células tumorales posteriormente ensayadas, deberían fundamentarse en la existencia de interacciones entre dichos compuestos y moléculas importantes para la homeostasia celular, así como en las modificaciones sufridas por éstas como resultado de tales interacciones. De la estructura de los compuestos con platino citados anteriormente puede deducirse, en principio, que estos compuestos se unen a moléculas celulares mediante los dos enlaces que, en estado nativo, el platino mantiene con los dos cloros. Las moléculas que parecían jugar un papel

fundamental como “blanco” para los compuestos de platino son el DNA, esencialmente, y las proteínas.

Por ello, se cree que la citotoxicidad inducida por del cisplatino es el resultado de la formación de aductos con el DNA incluyendo enlaces cruzados (“cross-links”) DNA-proteínas, monoadductos de DNA que, dado que el cisplatino puede unirse con dos enlaces al DNA, pueden ser de la misma cadena (intracatenarios, “Intrastrand Cross Linking”) o de cadenas complementarias (intercadenarios, “Interstrand Cross Linking”).

Estudios cuantitativos mostraron que las uniones 1,2- intracatenarias entre dos guaninas en sitios d(GpG) y entre una guanina y una adenina en sitios d(ApG) representan el 65 y 25 % respectivamente de todos los aductos del cisplatino-DNA formados *in vitro* (Fichtinger-Schepman et al. 1985, Eastman 1986). Estos aductos no se forman a la misma velocidad, debido a la dificultad de acceso del centro metálico a la base aromática (Payet et al. 1993). Los otros aductos formados son minoritarios y son intracatenarios entre dos guaninas en sitios d(GpXpG) (X corresponde a una base cualquiera) y entre una guanina y una adenina en sitios d(GpA), e intercadenarios entre dos guaninas en sitios d(GpC).d(GpC) (Hopkins et al. 1991, Lemaire et al. 1991) (figura 3); los aductos formados entre DNA-cisplatino y proteína son vestigiales en relación con el total.

El enlace bifuncional intracatenario del cisplatino produce severas distorsiones locales en la doble hélice de DNA, conduciendo a desnaturalización u otras modificaciones potencialmente inductoras de alteraciones en la función (Bellon et al. 1991).

Los aductos del cisplatino ejercen sus efectos inhibiendo la función del DNA, y por tanto la síntesis del RNA (Bruhn et al. 1990), e induciendo la apoptosis o muerte celular (Eastman 1993). Aún no se conoce la naturaleza de las señales que operan a modo de mecanismo de transducción entre el daño en el DNA y el proceso de la muerte celular.

En cambio, el análisis de la muerte celular inducida por el cisplatino (Sorenson et al. 1990, Barry et al. 1990) reveló la fragmentación del DNA en multímeros de 180 pb, consecuente con el corte internucleosomal de la cromatina con una endonucleasa seguido de la pérdida de la integridad de la membrana y de la contracción de la célula. Este proceso se inhibe con la cicloheximidina, sugiriendo que la muerte celular necesita la síntesis de nuevas proteínas. Estos hechos son compatibles con la inducción de la programación de la apoptosis (Wyllie et al. 1980).

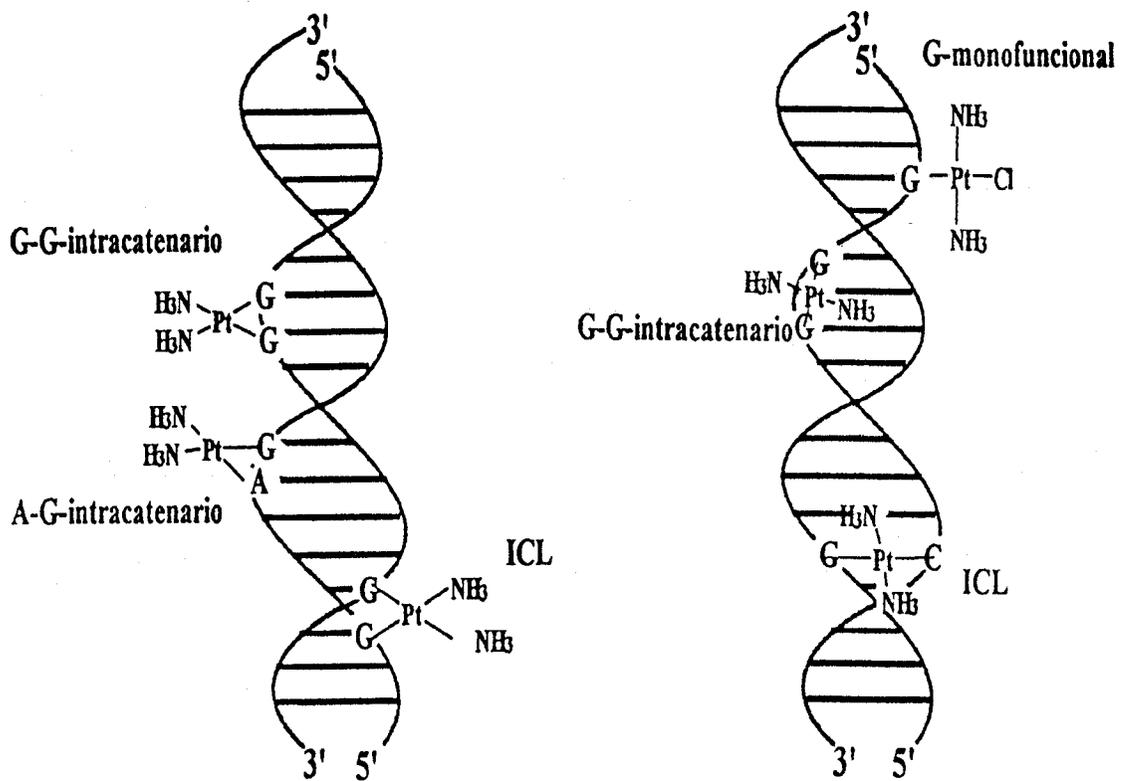


Figura 3. Ejemplos de aductos formados entre el *cis*-DDP y *trans*-DDP y el DNA.
ICL: Enlace intercatenario "Interstrand Cross Linking".

El isómero *trans*, el transplatino, interacciona con el DNA de manera diferente al *cis*-DDP. Así, no puede formar enlaces cruzados 1,2-intracatenarios pero puede formar enlaces cruzados 1,3-intracatenarios e intercatenarios; adicionalmente estos aductos se forman con tasas diferentes e inducen en el DNA distintas alteraciones conformacionales (Sip et al. 1993, Brabec y Leng 1993, Brabec et al. 1993, Malinge et al. 1994). De este modo, el *trans*-DDP puede ser menos citotóxico que la forma *cis* por las diferencias en la estructura de los aductos con el DNA.

El carboplatino tiene dos grupos aminos en configuración *cis* y forma el mismo espectro de aductos de DNA como el *cis*-DDP. El grupo 1,1-ciclobutanodicarboxilato en el carboplatino es mucho menos lábil que el cloro en el cisplatino por lo que las reacciones que conducen a la formación de especies reactivas ocurren muy lentamente (Knox et al. 1986). Como resultado, el carboplatino es más estable y menos reactivo que el cisplatino.

En concreto, el *cis* y el transplatino prefieren unirse a los átomos de nitrógeno de las nucleobases de DNA (revisiones generales: Belluco 1974). Los blancos más importantes para los compuestos de platino son los átomos de nitrógeno endocíclicos de las nucleobases (N^7 -G, N^1 -G, N^7 -A, N^1 -A, N^3 -C, N^3 -T). En condiciones fisiológicas, el átomo más favorecido para que reaccione con el *cis* y el *trans*-DDP es el N^7 -G (Fitchinger-Schepman et al. 1982, 1985, Eastman 1983, Butour y Johnson 1986, Eastman y Barry 1987, Bancroft et al. 1990) (figura 4).

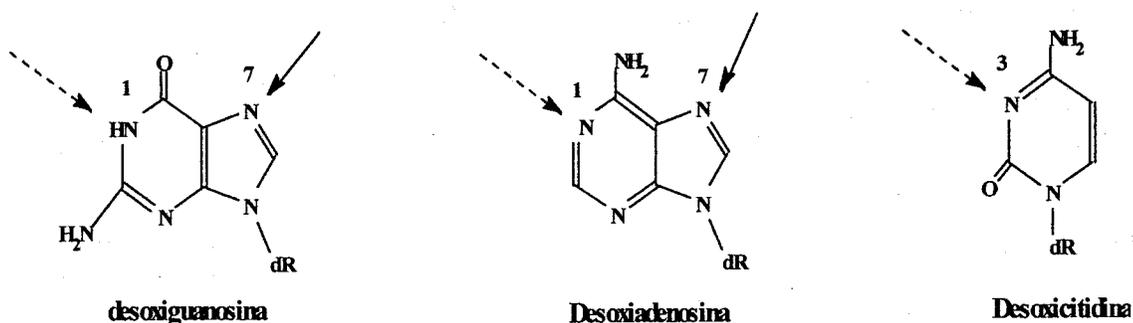


Figura 4. Átomos de las bases nucleofílicas más reactivos frente a los compuestos de coordinación del platino (II).

3-Citotoxicidad inducida por el platino

La capacidad del cisplatino para unirse al DNA celular y provocar su modificación ha sido clásicamente relacionada con sus propiedades citotóxicas (Roberts y Pera 1983). La bifuncionalidad de la droga y la formación de enlaces con el DNA juega un papel muy importante en la citotoxicidad (Zwelling et al. 1979), que depende de la cantidad de los aductos DNA-cisplatino formados y de la capacidad de las células para reparar el daño (Roberts y Fraval 1980, Roberts y Friedlos 1987).

Una de las rutas principales de citotoxicidad causada por el cisplatino es la apoptosis, una manera activa de la programación de la muerte celular. Según se ha demostrado en diversos sistemas experimentales, la apoptosis está guiada por un número de acontecimientos señalados en la célula (McConkey y Orrenius 1994). A pesar de que el mecanismo no está aún suficientemente comprendido, un buen número de agentes antitumorales se han caracterizado por su capacidad para inducir apoptosis en varias líneas celulares (Barq et al. 1990, Sen y D'Incalci 1992, Lowe et al. 1993, Skladanowski y Konopa 1993). Esta inducción se considera un factor importante en el éxito del tratamiento del cáncer (Fisher 1994).

Es conocido que la inhibición del crecimiento celular depende de la duración del tratamiento y de la concentración de cisplatino administrada (Demarcq et al. 1992). Los experimentos de citometría de flujo (Bergerat et al. 1979, Sorenson y Eastman 1988a, b) mostraron que los tratamientos con cisplatino pueden inducir varias perturbaciones en el ciclo celular, como por ejemplo, retraso y bloqueo de la transición en las fases S y G2. Adicionalmente, resultados experimentales (Roberts y Fraval 1980) obtenidos a partir de células V79 del hamster chino mostraron que las células eran más sensibles a la exposición al cisplatino en la fase G1 que en otras fases del ciclo celular.

Puede, por todo ello, esperarse que los acontecimientos moleculares, ligados a los procesos de proliferación, sensibles a la acción citotóxica de diversos agentes antitumorales, particularmente el cisplatino, puedan, en su caso y al menos parcialmente, depender del tipo de tumor o línea celular específica.

4-Proteínas que reconocen específicamente el DNA modificado por cisplatino

Recientemente se ha descrito que un buen número de proteínas celulares interacciona preferentemente con los lugares de DNA dañados por el cisplatino; la formación de los complejos proteínas-DNA dañado probablemente subyacen a la actividad biológica de la droga.

Estudios recientes han propuesto que el efecto sobre la transcripción puede ser ejercido a través de diferentes mecanismos independientes, incluyendo el bloqueo de la síntesis *de novo* de precursores de RNA púricos y pirimidínicos, impedimentos del paso de la polimerasa, posibles alteraciones en la unión del factor de transcripción para reconocer los sitios modificados por el platino, y/o la interferencia en la reorganización de la estructura de la cromatina que se requiere para su transcripción (Mymryk et al. 1995).

La primera proteína que se descubrió con capacidad para unirse preferentemente al cisplatino-DNA dañado fue el XPE ("Xeroderma Pigmentosum group E") (Toney et al. 1989, Donahue et al. 1990, Chu et al. 1990). Posteriormente, muchos laboratorios se interesaron activamente en estudios parecidos, las proteínas que recibieron más atención son las que están implicadas en procesos de reparación del DNA. Sin embargo, no fueron las únicas ya que otras proteínas de diversa naturaleza mostraron afinidad para unirse a aductos DNA-cisplatino.

4-1-Proteínas de reparación

La principal clase de proteínas que reconocen específicamente los aductos del cisplatino son estas proteínas involucradas en el reconocimiento del daño participando en una primera etapa del proceso de reparación. La mayoría de estas proteínas reconocen también otras lesiones en el DNA como las lesiones provocadas por la exposición a la luz ultravioleta (U.V.), agentes químicos, etc...

El XPE es un heterodimero formado por dos polipeptidos de 121 y 41 kDa: de ellos, solamente la subunidad pequeña se encuentra inducida en la respuesta al cisplatino (Chu y Chang 1988 y 1990, Vaisman y Chaney 1995, Vaisman et al. 1996) al haberse observado que el cisplatino induce la acumulación de esta proteína *in vitro*.

El autoantígeno humano Ku (DRP-1), está compuesto de tres subunidades de 80, 70 y 350 kDa. *In vitro*, las dos primeras subunidades se unen al cisplatino-DNA dañado (Turchi y Henkels 1996).

La HSSB ("Human Single-Strand DNA Binding protein") está compuesta de tres subunidades de 70, 34 y 11 kD; *in vitro* esta proteína se une preferentemente al cisplatino-DNA modificado y se une también al DNA dañado con U.V. (Clugston et al. 1992).

4-2-Otras proteínas que se unen al DNA-cisplatino

Entre estas proteínas se encuentran las que, de manera diversa, realizan funciones relativas a la estabilidad y/o modificaciones citofisiológicas en la estructura de la cromatina, o bien, de manera más general, juegan un papel estructural en la conformación de complejos de orden superior del tipo proteínas-DNA o proteínas-proteínas. El hecho de que estas proteínas puedan unirse preferentemente a los sitios del DNA dañado con el cisplatino llamó la atención de los investigadores (Zlatanovaa et al. 1998).

Las proteínas de la familia del grupo de alta movilidad 1 y 2 ("High Mobility Group", HMG), descubiertas en los años 70 (Goodwin et al. 1978), pertenecen al grupo de las proteínas no histónicas. *In vitro*, estas proteínas se unen con alta afinidad a los compuestos terapéuticamente activos: cisplatino, carboplatino e ipoplatino (uno de los compuestos del grupo del platino). También, la unión abundante de esta proteína a los sitios dañados interfiere con el proceso de reparación impidiendo el acceso de las proteínas de reconocimiento del daño (Pil y Lippard 1992, Billings et al. 1992, Turchi et al. 1996).

Por otro lado, las histonas de enlace ("Linker Histones"), *In vitro*, se unen preferentemente al DNA modificado con cisplatino con una afinidad más alta a la de los HMG1 (Yaneva et al. 1997).

En experimentos *In vitro*, el factor de transcripción humano hUBF tiene una alta afinidad al DNA cisplatinado pero no al DNA transplatinado (Treiber et al. 1994). Codony-Servat et al. en 1996 mostraron, mediante experimentos de E.L.I.S.A. con DNA de células de timo, que los anticuerpos anti-NOR utilizados contra el factor de transcripción hUBF aumentaron sus capacidades de unión al DNA cisplatinado más que al DNA no modificado.

5-Otros complejos a base de platino

El oxaliplatino, un agente quimioterapéutico basado en un núcleo de platino con un ligando 1,2-diaminociclohexano (DACH) ha mostrado eficacia tanto *in vivo* como *in vitro* contra diversas líneas celulares, incluso contra aquellas que son resistentes al cisplatino y al carboplatino. Se cree que la retención del anillo DACH implica la formación de aductos platino-DNA que parecen ser más eficientes bloqueando la replicación del DNA y más citotóxicos que los aductos formados a partir del cisplatino. Se propone que los blancos moleculares son diferentes para el oxaliplatino y para el cisplatino, habiéndose demostrado que difieren en algunos mecanismos moleculares asociados con el desarrollo de resistencia al cisplatino. Estudios clínicos en el National Cancer Institute y su aparentemente menor capacidad para desarrollar resistencia hacen que este compuesto pueda ser considerado un buen candidato, con ventajas sobre el cisplatino, para terapias de primera línea ya que, además, se ha demostrado actividad aditiva y/o sinérgica con otros compuestos, por lo que parece ser merecedor de consideración para formar parte de terapias de combinación (Raymond et al. 1998).

El oxaliplatino es más neurotóxico aún que el cisplatino. Dicha neurotoxicidad está correlacionada con una mayor retención del platino en ganglios dorsales (Holmes et al. 1998). El oxaliplatino se incorpora mucho mejor que el cisplatino en las células sanguíneas, proponiéndose que es debido a la mayor hidrofobicidad del grupo DACH (Luo et al. 1999).

El reciente desarrollo del oxaliplatino no permite conocer aún las bases moleculares de su acción y, dado que el cisplatino, su biotransformación y su acción en cuanto a su actividad antitumoral están muy bien establecidos, nuestro trabajo se seguirá refiriendo a él como compuesto antitumoral de referencia.

6-Complejos a base de rutenio

Desde su descubrimiento, el cisplatino se utilizó en el tratamiento de varios tipos de cánceres humanos demostrando su eficacia contra carcinomas de ovario, testículo y de cabeza y garganta (Holland et al. 1980, Jacobs 1980, Williams y Einhorn 1980).

Desafortunadamente, este complejo inorgánico presenta muchos efectos secundarios (Prestayko et al. 1980).

Con el fin de encontrar nuevas drogas antitumorales a base de metales con actividad complementaria al cisplatino, se diseñaron y sintetizaron una serie de moléculas con distintos metales formando parte del centro del complejo. Entre estas moléculas prestaremos especial atención a las que están fundamentadas en la existencia de un átomo de rutenio en el centro, especialmente en estado de baja oxidación (para revisiones: Clarke 1993), probandose asimismo su actividad como agentes antitumorales.

El rutenio pertenece al octavo grupo de los metales de transición (llamado grupo del platino); de un modo parecido al paladio, rodio, iridio, cobalto, galio y otros metales de transición, los complejos del rutenio se estudiaron a fin de alcanzar compuestos más potentes y con menos toxicidad colateral que el cisplatino (Sava et al. 1989, Keppler et al. 1989, Pacor et al. 1991).

Los iones del rutenio tienen una naturaleza que les permite ser incorporados fácil y preferentemente por las células tumorales; para una serie de complejos del rutenio con actividad antiproliferativa, se ha demostrado que las relaciones entre la incorporación de cada complejo a células tumorales y células sanas, incluyendo sangre, músculo e hígado, están claramente en favor de las células tumorales (Sava et al. 1991).

Entre los complejos de rutenio que han mostrado una actividad especialmente favorable en los estudios comparativos, demostrada por su localización preferente en tejidos tumorales, se encuentran los que incluyen ligandos de nitrógeno (Vilaplana et al. en preparación).

El diseño químico de la síntesis de los compuestos del rutenio se fundamentó en la posibilidad de obtener nuevos complejos que mostrasen capacidad para interaccionar con el DNA, dado que éste representa el blanco fundamental para los agentes citotóxicos (Clarke et al. 1988, Clarke y Buchbinder 1988); de hecho, diversos experimentos mostraron que casi todos los compuestos estudiados del rutenio pueden interaccionar con modelos de DNA *in vitro* y también *in vivo* (Monti-Bragadin et al. 1975, Durig et al. 1976, Kelman et al. 1977, Yasbin et al. 1980, Barton y Lolis 1985, Chan et al. 1986, Causi et al. 1987, Alessio et al. 1988, Pyle et al. 1989). Asimismo, la interacción del DNA con los compuestos del rutenio demostró ser tan efectiva o más con respecto al cis-dicloroplatino (II) a pesar de su

estructura octaédrica (Barton y Lolis 1985, Pyle et al. 1989). Las diferencias estructurales significativas entre el rutenio y la mayoría de las drogas antitumorales a base de platino arrojan fundadas esperanzas en relación con la posibilidad de que drogas a base de rutenio puedan ser alternativas apropiadas al cisplatino y al carboplatino.

El rutenio se encuentra en solución acuosa bajo las formas de rutenio (II) y rutenio (III); Los compuestos del rutenio (III) pueden reducirse en condiciones hipóxicas, como lo son la mayoría de los ambientes tumorales, originando especies activas que se unen rápidamente al DNA celular (Frasca et al. 1996). Bajo estas condiciones, los complejos aminos del rutenio pueden activarse *in vivo* para coordinar con la base nitrogenada de manera similar a la de las drogas antitumorales basadas en platino (Clarke 1979, Messori et al. 1996, Navarro et al. 1998).

Los compuestos antitumorales del rutenio, en general, poseen seis coordinaciones en una geometría octaédrica en comparación con el plano cuadrado de los ligandos del cisplatino o del carboplatino. Además, los dos sitios de coordinación adicionales del rutenio en comparación con el centro platino (II) en el cisplatino o en el carboplatino pueden permitir nuevos modos de unión a los objetivos intracelulares y, con algunos ligandos, proporcionar la quiralidad en los complejos y en sus interacciones con la estructura objetivo (Novákova et al. 1995).

7-Complejos a base de rutenio con ligandos de PDTA

En los últimos años se estudiaron muchos compuestos de metales de transición con ácido 1,2-propilenediamino-N,N,N',N'-tetraacético (PDTA) (figura 5) (González-García y González-Vilchez 1970).

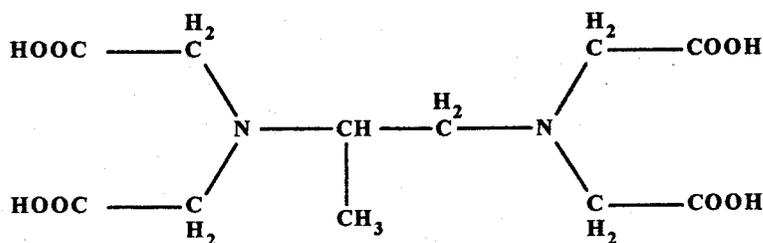


Figura 5. Estructura esquemática del ligando PDTA.

Compuestos formados por este agente quelante, un derivado metilado del EDTA, son más estables que los análogos formados por el ligando matriz. Además, los complejos del rutenio con ligandos de PDTA pueden convertirse fácilmente, gracias a este elemento, de un estado de oxidación a otro según las condiciones experimentales, también sus compuestos tienen una tendencia a hidrolizarse.

La disponibilidad de los estados de oxidación del Ru(III) y del Ru(II) bajo condiciones fisiológicas y la inactividad general de estos iones frente a la sustitución, cuando se coordinan a los ligandos nitrógenos (Clarke 1983), permiten, en principio, la propuesta de que los complejos del rutenio actúan de manera similar al cisplatino (Keppler et al. 1993, Clarke 1993), lo que justificó en su momento la posibilidad de explorar su potencial uso como drogas antitumorales.

Por ello, los complejos del rutenio con agentes quelantes polidentados (“Ligandos secundarios”) pueden considerarse como prodrogas contra diferentes tumores. El papel del segundo ligando es estabilizar el catión Ru (III), así el metal no se incorpora a los tejidos durante su transporte y el complejo, en su conjunto, no modifica su estructura. Al mismo tiempo pudo observarse una disminución drástica de la toxicidad colateral sobre el huésped producida por estas drogas. Una vez el complejo alcanza las áreas hipóxicas propias del tumor, el ión del metal se reduce “*in situ*”, facilitando, esta propiedad, la acumulación del rutenio en las masas del tumor (González-Vílchez y Vilaplana 1986).

Se ha propuesto que los “ligandos principales” (es decir, átomos de cloro o sulfato, aniones de nitrato, carbonato, oxalato, malonato) serían reemplazados por átomos de nitrógeno o de oxígeno de las nucleobases del DNA celular, bases purícas y pirimidínicas, si el DNA fuera el objetivo macromolecular de estos complejos (Clarke 1983).

8-Síntesis de un nuevo complejo octaédrico antitumoral a base de rutenio

Muy recientemente, se ha sintetizado un nuevo complejo antitumoral a base de rutenio (III); el átomo del metal está coordinado octaédricamente con dos átomos de cloro ambos en posición *cis*, y el ligando orgánico ocupando los cuatro vértices que quedan del complejo vía los dos átomos de nitrógeno (*trans* a los dos cloros) y dos grupos carboxilato (Vilaplana et al. 1995) (figura 6).

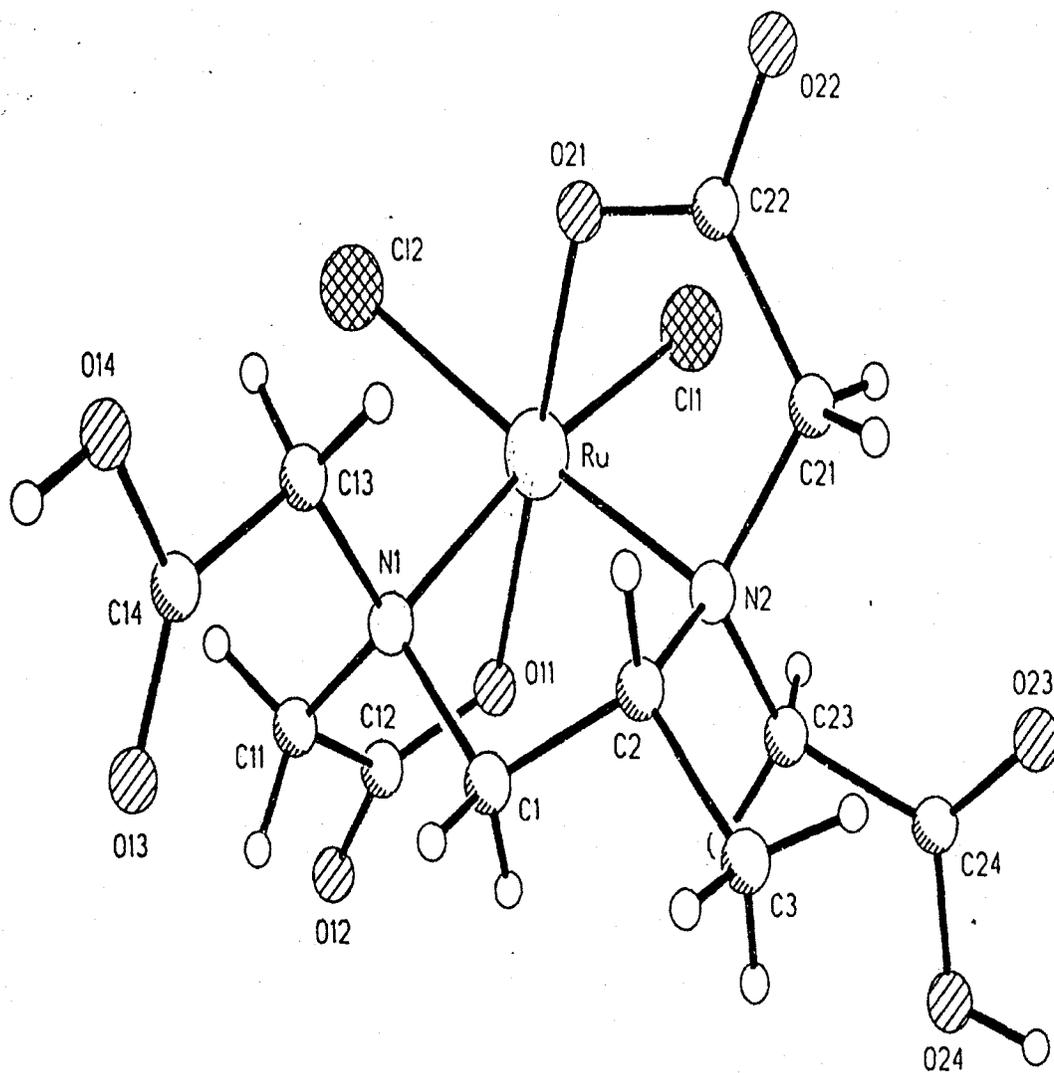


Figura 6. Estructura molecular del complejo $[RuLCl_2] \cdot H_4O$, (L=PDTA) o RAP.



La actividad antitumoral del complejo del rutenio sintetizado se evaluó contra el tumor ascítico de Ehrlich y contra varios tumores humanos mostrando una actividad antitumoral importante.

Las similitudes aparentes encontradas entre los complejos aminos del cisplatino y del rutenio en presencia de biomoléculas llevaron a estudiar la posible interacción de este complejo inorgánico con el DNA. El análisis de los espectros de dicroísmo circular de DNA plasmídico del plásmido pUC 19 y de DNA del mismo plásmido con RAP, mostró una diferencia entre los dos espectros; esta diferencia se atribuyó a la formación de un complejo entre el RAP y las nucleobases de DNA (Vilaplana et al. En preparación).

I-Nucleolo

1-Núcleo y nucleolo

En las células eucarióticas el DNA está protegido en el núcleo representando, este último, alrededor del 10% del volumen total celular, y está rodeado por una envoltura. Los estudios de microscopía electrónica mostraron que la envoltura nuclear consiste en una doble membrana que, a su vez, contiene un espacio perinuclear. El núcleo aparece dividido en dominios estructurales (Spector 1993). Un gran ejemplo es el nucleolo que es, precisamente, el dominio estructural más llamativo del núcleo de células eucarióticas en interfase.

1-1- Recuerdo histórico del nucleolo

Fontana, en el año 1781, fue el primero en describir la presencia de nucleolos como gránulos densos localizados dentro de un cuerpo oviforme. Medio siglo más tarde, en el año 1835, Wagner observó unas estructuras similares en la vesícula germinal a las que denominó “mácula germinativa”, y Valentin, en 1839, introdujo el término nucleolo como pequeño núcleo o núcleo del núcleo (Cit. De Robertis y De Robertis 1981, Risueño y Medina 1986). Durante el siglo XIX, los diversos microscopistas que se interesaron por el nucleolo, estudiaron principalmente su número y tamaño en diferentes células animales y vegetales. Zacharias, en el año 1885, y Montgomery en 1889, fueron pioneros en analizar su composición mediante el uso de diferentes técnicas de tinción (Cit. Busch Y Smetana 1970).

Con la llegada del nuevo siglo aumentó el número de estudios sobre la composición del nucleolo, y varios investigadores como Ruzicka en el año 1899, Simarro en 1900 y Cajal en 1903, empezaron a utilizar técnicas de impregnación con plata para caracterizarlo (Cit. Risueño y Medina 1986).

McGill, en 1906, observó que en el nucleolo parecían existir dos zonas diferentes y Heidenhain, un año más tarde, demostró la existencia de cromatina alrededor del nucleolo describiéndola como “cromatina asociada al nucleolo”. Durante los años cuarenta de nuestro siglo, tanto Brachet como Caspersson y sus colaboradores, iniciaron el estudio del papel del nucleolo en el metabolismo celular aplicando las primeras técnicas de cuantificación

citoquímica. Dichas técnicas permitieron posteriormente proponer que el nucleolo contenía un RNA relacionado de alguna forma con el RNA citoplásmico, que a su vez era abundante en células con una elevada tasa de síntesis de proteínas (Cit. Risueño y Medina 1986).

En los años cincuenta de este siglo, comenzaron a aparecer investigaciones detalladas de la ultraestructura del nucleolo mediante el uso del microscopio electrónico y técnicas autorradiográficas y citoquímicas (Granboulan y Granboulan 1965, Bernhard 1966); de esta forma, Godward, en 1950, fue el primero en observar una estructura filamentosa dentro del nucleolo en *Spirogyra*, que fue descrita también por Estable y Sotelo en 1951 y a la que denominaron "nucleolonema".

En los años sesenta a partir de estudios de su actividad bioquímica, se pensaba que el nucleolo no solo era el lugar de una síntesis limitada del RNA (Nougarède 1969) sino que era capaz de sintetizar grandes cantidades de proteínas incluyendo histonas.

Al microscopio óptico, estos elementos aparecen como cuerpos esféricos solitarios o múltiples que ocupan, particularmente en células en crecimiento activo, una porción importante del espacio nuclear total. En cortes histológicos, el nucleolo se tiñe fuertemente con los colorantes básicos debido a su elevado contenido en ribonucleoproteínas.

1-2-Otras características del nucleolo

El nucleolo es una estructura altamente dinámica ilustrada por su desaparición y reaparición cíclicas durante la mitosis (excepto en células de organismos inferiores con una mitosis "cerrada" caracterizada por la persistencia de la envoltura nuclear) (Scheer y Venavente 1990). Como fue establecido, al principio de los años 30 por Heitz y McClintock, el nucleolo se reforma al final de la mitosis en localizaciones cromosómicas específicas llamadas regiones organizadoras del nucleolo (Nucleolar Organizer Regions, NORs) que contienen los genes de RNA ribosomal o RNAr repetidos en tandem (Howell 1982, Goessens 1984, Hadjiolov 1985).

Existen otros dominios nucleares tales como dominios de replicación vistos durante la fase S (Huberman y Riggs 1968, Nakayasu y Berezney 1989, Raska et al. 1990, Spector 1993), dominios correspondientes a puntos ricos en componentes snRNP "small nuclear ribonucleoproteins" (Lerner et al. 1981, Carmo-Fonseca et al. 1991, Raska et al. 1992,

Spector 1993, Wu et al. 1993), dominios correspondientes a los “coiled bodies” exhibiendo la más alta acumulación de los snRNPs (Moneron y Bernhard 1969, Carmo-Fonseca et al. 1991, Raska et al. 1992, Wu et al. 1993, Lamon y Carmo-Fonseca 1993, Gall et al. 1994) y/o canales intercromosomales correspondiendo a la localización de precursores específicos de RNA mensajeros o RNAm (Lawrence et al. 1993, Xing y Lawrence 1993, Rosbach y Singer 1993, Cremer et al. 1993, Kramer et al. 1994).

En los eucariontes, la transcripción del RNAr se lleva a cabo sobre una secuencia única de DNA repetida de 100 a 1000 veces; el número más alto está asociado con células que son muy activas en la síntesis de proteínas y por lo tanto tienen una gran demanda de ribosomas (Smith y Wood 1997). En general, su estructura está directamente asociada con el ensamblaje, procesamiento y maduración de las partículas ribosómicas (Busch y Smetana 1970, De la Torre y Giménez-Martín 1982, Goessens 1984, Fakan 1986, Fakan y Hernandez-Verdun 1986, Risueño y Medina 1986); también, se han demostrado grandes variaciones de tamaño, forma y distribución de sus componentes según la especie y el estado fisiológico de la misma célula.

El nucleolo en interfase lleva a cabo importantes reacciones en el metabolismo de los RNAs: Síntesis (Lewin 1980), procesamiento (Sollner-Webb y Mougey 1991, Moore et al. 1993), y transporte al complejo del poro para la salida al citoplasma (Mehlin et al. 1992). En células procariotas la síntesis del RNA (transcripción) y la síntesis de proteínas (traducción) tienen lugar simultáneamente: los ribosomas traducen el extremo 5' de la molécula de RNA mientras todavía se está transcribiendo su extremo 3'. Por ello existen pocas oportunidades de modificar el RNA antes de ser traducido a proteínas. En eucariotas, por lo contrario, la transcripción (nuclear) está separada tanto temporal como espacialmente de la traducción (citoplasmática). Los transcritos de RNA en el núcleo se empaquetan inmediatamente en complejos ribonucleoproteicos y son sometidos al proceso de maduración del RNA, en el cual se eliminan algunas zonas de la secuencia de nucleótidos (Crick 1979, Hickey y al. 1989, Dreyfuss et al. 1993). Las proteínas de empaquetamiento se desprenden cuando ha finalizado la maduración del RNA, y éste es transportado desde el núcleo al citosol, donde los ribosomas empiezan a traducir el RNA a proteína (Alberts et al. 1996).

Durante los últimos años, el nucleolo ha sido revaluado en patología tumoral después del descubrimiento de un nuevo parámetro que permite utilizar los cambios detectables en la morfología nucleolar para ser objetivamente evaluado en citopatología rutinaria. Este parámetro concierne la distribución del marcaje de plata en las NORs en interfase. El marcaje preferente del nucleolo con el nitrato de plata fue señalado primero por Tandler en 1954; al microscopio óptico, el procedimiento pareció marcar el nucleolo entero. Más recientemente, una técnica de marcaje con plata amoniaca, descrita por Howell et al. en 1975, resultó específica en los sitios cromosomales que contienen las NORs; estos investigadores describieron el marcaje en el pie y en constricciones secundarias y porciones satélite de los cromosomas acrocéntricos humanos de los grupos D y G, estas áreas correspondieron a la NOR. En el mismo año, Goodpasture y Bloom demostraron la especificidad de la plata para las proteínas asociadas a los genes ribosomales; además, esta técnica de marcaje con plata puede detectar los genes ribosomales transcripcionalmente activos en interfase como en anafase.

1-3-Síntesis y procesamiento de los RNA

Los nucleolos son compartimentos subnucleares que contienen genes de RNAr (Rittosa y Spiegelman 1965, Sollner-Webb y Mougey 1991), la maquinaria de síntesis y procesamiento del RNAr (Scheer y Rose 1984, Kass et al. 1990, Rendón et al. 1992), de formación de pre-ribosomas (Raska et al. 1992, Scheer et al. 1993, Spector 1993, Wachtler y Stahl 1993) y la maquinaria de ensamblaje de ribosomas (Busch y Smetana 1970). La función biosintética del nucleolo se puede poner de manifiesto por marcaje radiactivo mediante pulsos cortos con uridina-³H separados por intervalos de incubación con medio no marcado, se pueden separar los genes de RNAr del cromosoma mediante fraccionamiento subcelular, y se puede conseguir un aislamiento del nucleolo marcado, en forma bastante pura. Estos experimentos han mostrado que el transcrito 45S es empaquetado formando un gran complejo con proteínas procedentes del citoplasma donde se sintetizan todas las proteínas de la célula. En esta etapa se incorporan tanto la mayor parte de las 80 proteínas que forman el ribosoma como el RNAr 5S. Para el procesamiento del RNAr 45S y para dirigir el proceso de ensamblaje son necesarias otras proteínas. Así pues, el nucleolo

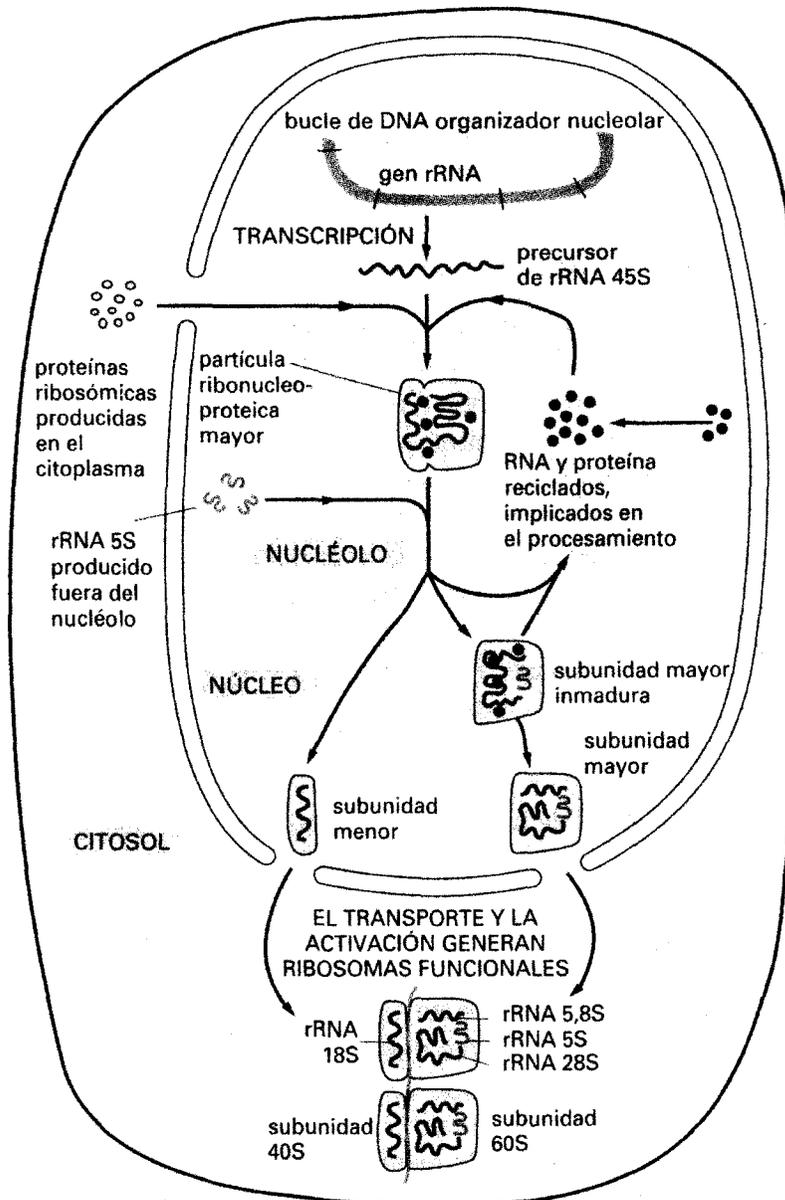


Figura 7. Síntesis y procesamiento del RNA. La envoltura nuclear mantiene a los ribosomas fuera del núcleo, evitando que los transcritos de RNA sean traducidos a proteínas, hasta que hayan sido procesados extensamente y transportados al exterior del núcleo.

contiene otras proteínas de unión al RNA y ciertas partículas ribonucleoproteicas, las cuales según parece, colaboran en la construcción de los ribosomas. Cuando las subunidades ribosómicas son exportadas al citoplasma en su forma definitiva, estos componentes permanecen en el núcleo. A medida que se procesa el complejo ribonucleoproteico al que, en principio, se asocia el RNA 45S va perdiendo algo de RNA y de proteína y luego se divide para dar lugar a los diferentes precursores de las subunidades ribosómicas mayor y menor. A los 30 minutos del pulso de marcaje radiactivo, emergen del núcleo y aparecen en el citoplasma celular las primeras subunidades ribosómicas pequeñas maduras, con sus RNAr 18S. El ensamblaje de la subunidad ribosómica mayor madura, con sus RNAr 28S, 5.8S y 5S, tarda alrededor de una hora en aparecer; por ello, el nucleolo contiene más subunidades ribosómicas grandes incompletas que subunidades pequeñas incompletas (Long y Dawis 1980).

2-Componentes nucleolares

En preparaciones convencionales para microscopía de transmisión, los nucleolos aparecen en su mayor parte compuestos de fibrillas y gránulos de 150 nm. Después de una tinción con acetato de uranilo seguida de otra con citrato de plomo, las fibrillas muestran dos tipos de opacidad: algunas aparecen muy teñidas y reciben el nombre de componente fibrilar denso, otras constituyen regiones claras y se llaman centros fibrilares (Recher et al. 1969). Muchas veces, los centros fibrilares se ven rodeados en su periferia por el componente fibrilar denso. Alrededor de las fibrillas, se encuentra el componente granular. En la periferia del nucleolo, se observan estructuras altamente contrastadas que corresponden a la cromatina asociada al nucleolo que, en algunos sitios, penetra profundamente en el cuerpo nucleolar a través de los intersticios nucleolares y alcanza los centros fibrilares (figura 8).

Algunos autores concluyeron que los genes del RNAr están localizados exclusivamente en los centros fibrilares y en algunas masas de cromatina condensada intranucleolar (Thiry y Thiry-Blaise 1989, 1991, Puvion-Dutilleul et al. 1991, Puvion-Dutilleul et al. 1992), otros localizaron la mayoría de estos genes en el componente fibrilar denso (Schwarzacher y Wachtler 1991, Wachtler et al. 1992).

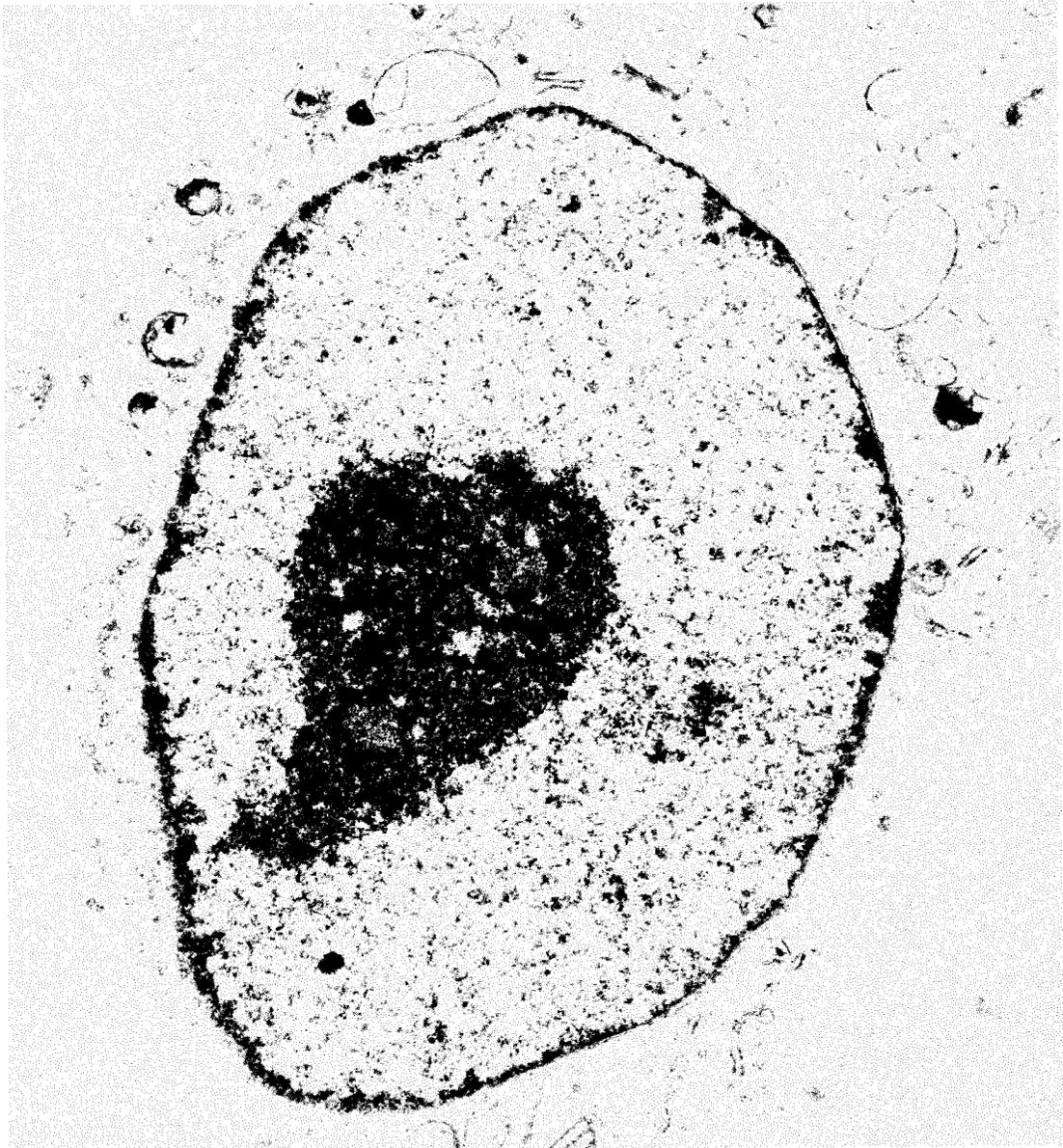


Figura 8. Micrografía al microscopio electrónico del núcleo de células TG. El nucleolo muestra un componente granular y varios centros fibrilares rodeados por el componente fibrilar denso. (20.000 x).

El RNA pre-ribosomal de nueva síntesis se acumula en el componente fibrilar denso mientras que las moléculas resultantes del procesamiento del RNAr se localizan en el componente granular (Fakan 1978, Goessens 1984, Hernandez-Verdun 1986). Las secuencias de RNA se encuentran en los centros fibrilares (Thiry y Thiry-Blaise 1989) y en el componente fibrilar denso (Wachtler et al. 1989).

2-1-Centros fibrilares

Bajo microscopía electrónica, los centros fibrilares se ven como áreas poco densas caracterizados por una fina textura fibrilar (Recher et al. 1969). Se ha demostrado por citoquímica ultraestructural que los centros fibrilares se componen de proteínas (Smetana et al. 1968, Recher et al. 1969, Goessens 1973, Mirre y Stahl 1978) y de DNA (Busch y Smetana 1970, Goessens 1973, 1976, 1979, Lafontaine y Lord 1973, Antenuis et al. 1979, Pouchetet et al. 1975, Bertaux et al. 1978, Mirre y Stahl 1978, Risueño et al. 1982), pero no contienen RNA ya que no son capaces de incorporar precursores de RNA marcados radioactivamente (Fakan 1978). El 1% del DNA nuclear representa DNA ribosomal o DNAr (Bachelierie et al. 1977). Además del DNAr los centros fibrilares contienen enzimas esenciales para la transcripción de los genes de RNAr, RNA polimerasa I (Scheer y Rose 1984, Scheer y Benavente 1990, Thiry et al. 1991) y DNA topoisomerasa I (Scheer y Benavente 1990, Thiry et al. 1991). También se ha encontrado cromatina condensada asociada a la periferia de los centros fibrilares. El tamaño y número de los centros fibrilares en el nucleolo son variables y dependen de su actividad (para revisiones: Puvion y Moyne 1981, Goessens 1984).

2-2-Componente granular

El componente granular contiene partículas de 15-20 nm de diámetro que se encuentran preferentemente en la periferia del nucleolo (Marinozzi 1964). Basándose en resultados citoquímicos y autorradiográficos, se acepta que estas partículas representan pre-ribosomas (Busch y Smetana 1970, Hadjiolov 1985), es decir, estructuras, en distinto grado de maduración, precursoras de las subunidades ribosómicas.

En los nucleolos normales, el componente granular y los centros fibrilares suelen aparecer entremezclados, mientras que en determinadas condiciones fisiológicas o experimentales tienden a segregarse (Recher et al. 1971, Fernández-Gómez et al. 1972, Jordan et al. 1985, Moreno et al. 1989, 1990) mostrándose una separación nítida entre sus componentes.

Se ha demostrado que tras un marcaje durante 5 minutos con uridina-³H en cultivo, los granos de plata se localizaron predominantemente sobre los centros fibrilares, mientras que después de una exposición prolongada, se marcó también el componente granular; esto demuestra la existencia de migración, al menos parcial, del RNA nucleolar recientemente sintetizado desde los centros fibrilares al componente granular (Granboulan y Granboulan, 1965).

2-3-Componente fibrilar denso

Se manifiesta bajo la formación de filamentos finos de aproximadamente 5 nm de espesor de carácter ribonucleoproteico formando un borde concéntrico alrededor de los centros fibrilares (Marinozzi 1964). El componente fibrilar denso ha sido caracterizado como el lugar donde se encuentran las cadenas primarias de los pre-RNA 45S (Bernhard 1966, Goessens 1984, Hernandez-Verdun 1986).

El estudio de autorradiografías de microscopía electrónica de células marcadas radioactivamente mediante pulsos cortos con uridina-³H reveló una incorporación preferencial del ³H en el componente fibrilar denso, este resultado se tomó como prueba del origen de los RNAr recientemente sintetizados en este componente (Hadjiolov 1985, Schwarzacher y Wachtler 1991, Jordan 1991). Sin embargo, después de una exposición prolongada de las autorradiografías, los centros fibrilares se marcaron también (Thiry y Goessens 1991), lo que significa que los pre-RNAs se sintetizan en los centros fibrilares y se acumulan en el componente fibrilar denso.

2-4-Cromatina asociada al nucleolo

Los cromosomas de células eucarióticas están constituidos por alrededor de un tercio de DNA y dos tercios de proteínas. El complejo de DNA cromosómico y proteína (que forma una nucleoproteína) se denomina cromatina. La parte proteica de la cromatina consiste en pequeñas proteínas básicas llamadas histonas, y proteínas adicionales generalmente llamadas proteínas no histónicas. Las diferentes histonas pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico o por electroforesis; todas las células eucariotas contienen cinco tipos de histonas, llamadas, H1, H2A y H2B, H3 y H4 cuyas secuencias están sumamente conservadas entre especies (Smith y Wood 1997).

En los núcleos en interfase, la cromatina está presente como heterocromatina, que se tiñe densamente, o eucromatina, más difusa. Hay pruebas de que la heterocromatina es genéticamente inerte, y se replica tarde durante la fase S del ciclo celular. En contraste, la eucromatina comprende fundamentalmente aquellos genes que la célula necesita transcribir activamente, los llamados genes de “mantenimiento”, que producen moléculas de RNA, así como las correspondientes regiones reguladoras. Como la eucromatina está empaquetada menos apretadamente que la heterocromatina, quizá no sea sorprendente que se replique al inicio de la fase S (Smith y Wood 1997).

La cromatina asociada al nucleolo es un concepto que se corresponde con el conjunto de acúmulos de cromatina que constituye una capa discontinua de cromatina perinucleolar que separa el cuerpo del nucleolo del nucleoplasma y que, a su vez, está conectada a acúmulos de cromatina intranucleolar, es decir, la cromatina asociada al nucleolo se compone de cromatina condensada peri e intranucleolar. Se ha observado que los centros fibrilares se encuentran unidos y son una continuación de esta cromatina condensada (Goessens 1984). Mediante análisis citoquímicos y autorradiográficos se ha demostrado la presencia de DNA en la cromatina asociada al nucleolo, observándose una descondensación gradual del DNA en ciertas porciones de la cromatina perinucleolar que acaba por extenderse en las regiones fibrilares del nucleolo (Busch y Smetana 1970, Antenuis et al. 1979).

3-Región del organizador nucleolar (NOR)

En cromosomas metafásicos las NORs aparecen como segmentos caracterizados por una baja coloración alrededor de la cual los nucleolos se reforman durante la telofase (Heitz 1931, McClintock 1934). En las NORs se localizan la mayoría de los genes de los RNAs ribosómicos (Jordan 1984), es decir, de los genes cuya transcripción y procesamiento originan los RNAs que se encuentran en las subunidades pequeña y grande del ribosoma. Existe una excepción, los genes del RNAr 5S no se encuentran en la NOR, sino en otras regiones de los cromosomas (Leweke y Hemleben 1982, Hadjiolov 1985, Narayanswami y Hamkalo 1990).

Se ha demostrado que las NORs constituyen las zonas donde tienen lugar los acontecimientos que definen la iniciación de la nucleologénesis, es decir, donde los cuerpos prenucleolares que han emigrado con los cromosomas durante la anafase convergen y fusionan en telofase para formar nucleolos en interfase (Ochs et al. 1985). La síntesis del RNAr está integralmente asociada a las NORs activas (Miller et al. 1976).

El número de las NORs varía según la especie y en líneas celulares en cultivo: existe una sola NOR localizada en el cromosoma X en células PtK2, mientras que en humanos existen 5 NORs localizadas en el brazo acrocéntrico de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (Howell 1982).

4-Proteínas nucleolares

Si definimos el nucleolo como el compartimento nuclear que es, en términos del ya clásico texto de Alberts et al. (Long y Dawid 1980), “una maquinaria productora de ribosomas”, y si, además, tenemos en cuenta la composición molecular del producto final de la biosíntesis, resulta evidente la riqueza, en cantidad y variedad, de proteínas en su composición. A fin de simplificar, en este apartado nos referimos a algunas proteínas no ribosómicas cuya actividad se encuentra directamente ligada al nucleolo, bien como proteínas residentes o como preferentemente localizables en el mismo.

Varias proteínas no histónicas están presentes en las NORs, citamos la RNA pol I que es una enzima esencial para la síntesis del RNAr (Matsui y Sandberg 1985, Reimer et al. 1987), la DNA topoisomerasa I importante para la transcripción y la replicación del DNA (Guldner et al. 1986), la proteína nucleolar U3-RNP o fibrilarina que, recientemente, se ha demostrado que es requerida para el procesamiento del pre-RNAr (Kass et al. 1990, Tollervey et al. 1991) y la NOR-90, proteína nucleolar de 90 kDa que se localiza exclusivamente en las NORs en células en división y en nucleolos en interfase (Rodríguez-Sánchez et al. 1987).

4-1-Factores de transcripción

Los genes que codifican los RNAr están localizados en el nucleolo y son transcritos por la RNA pol I. La tasa de síntesis de RNAr está en gran medida modulada según los cambios en el metabolismo celular. Las células en crecimiento tienen un nivel alto de actividad transcripcional mientras que en células quiescentes, la síntesis del RNAr tiene una regulación baja (Grummt et al. 1976, Mishima et al. 1979, Buttgreit et al. 1985, Tower et Sollner-Webb 1987, Schnapp et al. 1990).

Se ha demostrado que el complejo de la RNA pol I necesita la presencia de al menos dos factores auxiliares para iniciar la transcripción del RNAr, estos factores son el SL1 y el UBF "Upstream Binding Factor" (Learned et al. 1985).

El factor SL1 se identificó como el primer factor de transcripción de la RNA pol I y está involucrado en la iniciación de la transcripción del DNAr. El SL1 fue identificado inicialmente en el sistema de ratón (Mishima et al. 1982) y posteriormente purificado a partir de células humanas (Bell et al. 1988). Ha recibido los nombres de SL1 en humano y rata, TIF-IB, factor D o SL1 en ratón y Rib-I en rana (para revisiones: Paule 1993). El factor SL1 humano o Rib-I de rana no puede unirse al promotor central ("core promoter") respectivo sin la presencia del factor UBF.

El UBF es uno de los factores necesarios para la iniciación de la RNA pol I (Imai et al. 1994). A pesar de que se identificó en varios eucariotas superiores e inferiores, la purificación de la proteína se ha logrado solamente a partir de células humanas y células de rana (Jacob 1995). La proteína purificada de estos eucariotas superiores exhibe un intervalo

de masa molecular de 85 kDa a 97 kDa. Este factor existe en dos isoformas que provienen del procesamiento diferencial de los transcritos primarios, comunes a ambos, a partir de un gen único (O'Mahony y Rothblum 1991): las dos isoformas, grande y pequeña, se llaman UBF₁ y UBF₂ respectivamente. Se han aislados algunos homólogos del hUBF de diferentes especies de vertebrados: hUBF de células humanas (Bell et al. 1988, Jantzen et al. 1990, O'Mahoney y Rothblum 1991), xUBF de *Xenopus laevis* (Pikaard et al. 1989), rUBF de células de rata (Pikaard et al. 1990, Smith et al. 1990) y también se ha purificado de células de ratón (O'Mahoney y Rothblum 1991, Schnapp y Grummt 1991). La comparación de estos homólogos ha conducido a la observación que la especificidad de la unión al DNA del UBF se ha conservado intensamente de protozoos animales a plantas superiores (Rodrigo et al. 1992). En roedores, el UBF₁ es más activo transcripcionalmente que el UBF₂ (Kuhn et al. 1994).

In vitro, los experimentos de transcripción indican que la formación del complejo hUBF-hSL1 es esencial para la activación de la transcripción (Learned et al. 1986, Bell et al. 1988). Por tanto, SL1 y UBF parecen ser componentes importantes para la maquinaria transcripcional de la RNA pol I responsable del reconocimiento del promotor del gen que codifica el RNA 45S y realizan su función exclusivamente en el nucleolo.

Importantes herramientas que pudieron facilitar nuevos análisis del UBF han sido anticuerpos dirigidos contra este factor de transcripción, el suero anti-NOR obtenido a partir de pacientes con artritis reumatoide reacciona específicamente con una proteína doblete llamada NOR-90 de 92-88 kDa y con un pI de 7.5 en extractos totales de células HeLa, esta proteína doblete corresponde exactamente al hUBF (Rendón et al. 1992). Las secuencias de DNA complementarios (DNAC) que codifican el factor de transcripción hUBF y la proteína NOR-90 han sido clonadas y se ha visto que ambas secuencias de DNAC eran idénticas excepto para la delección del amino ácido 37 (111 nucleotidos) en la segunda forma (Chan et al. 1991). La NOR-90 se identificó como el factor de transcripción nucleolar hUBF (Chan et al. 1991), la NOR-90/hUBF existe en dos formas moleculares de 97 y 94 kDa (Jantzen et al. 1990).

4-2-Otras proteínas nucleolares

4-2-1-Proteína B23

Una de las proteínas nucleolares no ribosomales mayoritarias ha sido llamada B23 (Orrick et al. 1973), se llama también nucleofosmina (Busch et al. 1984), numatrina (Feuerstein y Mond 1987) o NO38 (Schmidt-Zachmann et al. 1987). La proteína B23 se localizó originalmente en la región granular del nucleolo y se cree que está involucrada en las últimas etapas del ensamblaje de ribosomas (Spector et al. 1984). Sin embargo, trabajos más recientes han sugerido que la B23 se encuentra también en el componente fibrilar denso donde colocaliza con la nucleolina (Biggiogera et al. 1989).

4-2-2- Proteína C23

La nucleolina o proteína C23 de 100 kDa se localiza predominantemente en el nucleolo en células en interfase (Guetzow y Busch 1981, Michalik et al. 1981), en las NORs en cromosomas mitóticos (Lischwe et al. 1981) y en otros componentes nucleolares, si bien son las regiones del componente fibrilar denso las que contienen una concentración más alta de esta proteína (Spector et al. 1984, Escande et al. 1985). También, se ha considerado como un constituyente no ribosomal de las partículas pre-ribosomales (Prestayko et al. 1974). La nucleolina contiene varias regiones altamente ácidas y muchos grupos fosfóricos (Mamrack et al. 1979); es una proteína ubicua y multifuncional (Lapeyre et al. 1987, Bugler et al. 1987, Erard et al. 1988), se piensa que está involucrada en la regulación de la transcripción del DNAr (Bouche et al. 1984); esta proteína interviene también en la maduración de los pre-RNAr nacientes (Herrera y Olson 1986, Bugler et al. 1987), en el ensamblaje de los pre-ribosomas y está asociada a la cromatina nucleolar en interfase y a las NORs en cromosomas metafásicos durante la mitosis (Olson et al. 1983, Gas et al. 1985, Herrera y Olson 1986).

Se ha visto que la proteína B23 y la nucleolina son dos proteínas que se mueven, bidireccionalmente, entre el nucleolo y el citoplasma (Borer et al. 1989) aunque poco se sabe de los mecanismos en virtud de los cuales estas proteínas nucleolares se dirigen hacia el nucleolo. Así, se ha propuesto que estas proteínas juegan el papel de lanzaderas

transportadoras de proteínas ribosomales desde el citoplasma al nucleolo. Esta última actividad, tal vez, se utiliza en el transporte de otras proteínas, no nucleolares, como la proteína del virus humano de inmunodeficiencia (HIV-1) (Frankhauser et al. 1991).

4-2-3-Fibrilarina

En el nucleolo se ha caracterizado un polipéptido de 34 kDa y pI de 8.5-10 con preferencia en el componente fibrilar denso (Ochs et al. 1991), esta proteína ha sido identificada, primero, en *Physarum polycephalum* y la llamaron proteína B-36 (Chrisensen et al. 1977), después, la llamaron fibrilarina por encontrarse en el componente fibrilar denso en células de mamíferos, lo que se puso de manifiesto mediante sueros autoinmunes de pacientes con Scleroderma (Ochs et al. 1985). Posteriormente, se localizó en varios organismos y se secuenció en *Saccharomyces cerevisiae* en donde el gen homólogo se ha denominado NOP1 (Henriquez et al. 1990). Se ha demostrado también que la fibrilarina es componente de estructuras extranucleolares llamadas "coiled bodies" (Raska et al. 1991) y componente de la partícula U3 snoRNP "Small Nucleolar Ribonucleoprotein" (Parker y Steitz 1987). La fibrilarina aparece involucrada en el procesamiento de pre-RNA_r, metilación de RNA_r y ensamblaje ribosomal (Tollervey et al. 1993). Esta proteína nucleolar está altamente conservada de humanos (Aris y Blobel 1991) a levaduras (Schimmang et al. 1989, Henriquez et al. 1990, Jansen et al. 1991), la comparación de secuencias de clones de DNA complementarios o DNAC de la fibrilarina revela un 70 % de similitud entre levaduras y humanos y un 74 % entre levaduras y ratón (Turley et al. 1993).

5-Variabilidad de la organización nucleolar

Una de las características del nucleolo es su variación de una especie a otra (Smetana y Busch 1974). La organización nucleolar varía según el ciclo celular, la fisiología de la célula, el tejido, el grado de diferenciación y, por último, la especie. Incluso es posible ver diferentes organizaciones nucleolares en el mismo núcleo. Es bien conocido que los cambios morfológicos en el nucleolo son características constantes de las células cancerosas, las células malignas muestran frecuentemente nucleolos de forma más larga e irregular que las

células benignas (Derenzini y Trerè 1991).

Tras la observación bajo microscopía electrónica de transmisión se han descritos clásicamente varios tipos de nucleolos con una organización diferente de sus componentes; nucleolos compactos, reticulados, en anillo y segregados. Se pueden encontrar otras formas intermedias o atípicas, especialmente en condiciones patológicas. Los nucleolos compactos y reticulados se encuentran en células en estado activo de transcripción, mientras que los nucleolos en anillo y los segregados se localizan en células quiescentes o en células tratadas con ciertas drogas inhibitoras de la transcripción (Hernandez-Verdun 1986).

Los nucleolos compactos se caracterizan, como su nombre lo indica, por una organización compacta del componente granular, en el que pueden aparecer intersticios y vacuolas, y por la presencia de varios centros fibrilares de distintos tamaños rodeados por el componente fibrilar denso (Goessens y Lepoint 1974, Derenzini et al. 1983).

Los nucleolos reticulados presentan una red de cordones de similar espesor constituidos por el componente fibrilar denso y por el componente granular, siendo los centros fibrilares difíciles de detectar. Esta red se denomina "nucleolonema" (Ploton et al. 1982).

Los nucleolos en anillo han sido descritos en linfocitos y consisten en un centro fibrilar delimitado por una pequeña cantidad de componente fibrilar denso que, a su vez, está rodeado de componente granular (Hernandez-Verdun 1986).

Los nucleolos segregados aparecen en determinadas condiciones fisiológicas o como consecuencia del bloqueo de la síntesis del RNAr mediante tratamientos experimentales con diferentes agentes tanto físicos como químicos; estos nucleolos se caracterizan por la separación de los componentes nucleolares mayoritarios. La segregación nucleolar ocurre de distinta manera, en células animales los principales componentes del nucleolo se separan en tres zonas diferenciadas, una fibrilar, otra granular y una última de matriz proteica difusa (Hernandez-Verdun 1986); mientras que en células vegetales el componente granular se distribuye rodeando al fibrilar (Fernández-Gómez et al. 1972, 1975, Moreno et al. 1990).

5-1-Variabilidad durante el ciclo celular

Durante el ciclo celular, la transcripción de los genes ribosomales comienza en telofase tardía, y los prenucleolos se diferencian en el mismo periodo, generalmente cerca de la envoltura nucleolar; están compuestos por un centro fibrilar rodeado por un componente fibrilar denso (Goessens y Lepoint 1974, Hernandez-Verdun y al. 1980); en este momento, puede ocurrir la fusión de los prenucleolos. Luego, el componente granular aparece y los nucleolos presentan una morfología típica reticulada, una organización compacta o un estado intermedio entre estas dos formas.

Estudios estereológicos demostraron que el volumen nucleolar aumenta durante la interfase; en células del tumor ascítico de Ehrlich, tanto el volumen nuclear como el nucleolar se duplican durante la interfase y todos los componentes nucleolares participan en el aumento del volumen durante la interfase (Lepoint y Goessens 1982). Este aumento empieza al principio de la fase G1 y se completa en el medio de la fase S (Goessens 1984).

En células vegetales, también, se ha observado la existencia de un patrón de crecimiento nucleolar prácticamente restringido a la primera mitad de la interfase, tras el cual se alcanza un tamaño nucleolar final aparentemente sometido a control génico, con independencia de la existencia de diferentes velocidades de crecimiento experimentalmente inducidas (Guerrero et al. 1989).

El porcentaje del área nucleolar total ocupado por cada componente ultraestructural varía con la tasa de la síntesis del RNA; en los fibroblastos humanos diploides, el número de centros fibrilares aumenta según la actividad celular, pero el volumen de cada uno disminuye (Jordan y Mc Govern 1981), esto indica una cierta estabilidad del volumen total del centro fibrilar; pueden ser pequeños, numerosos y dispersados en el nucleolo, o pocos y grandes dependiendo de la actividad de la célula.

5-2-Variabilidad durante la diferenciación

Durante la diferenciación la ultraestructura del nucleolo sufre importantes cambios, un ejemplo típico se observó en el epitelio de los intestinos delgados que reúnen diferentes tipos de variaciones en el nucleolo que podemos encontrar en otros sistemas durante la

diferenciación (Altmann y Leblon 1982). El área del nucleolo y sus componentes se midió en seis niveles del epitelio correspondiendo a las etapas de la migración y diferenciación de la célula desde la base de la crypta al extremo de la vellosidad. Las células más basales presentan un nucleolo grande ($3.1 \mu\text{m}^2$), irregular y reticulado; con la migración y diferenciación de las células, el nucleolo disminuye en tamaño ($1.7 \mu\text{m}^2$) y se vuelve esférico, pero queda reticulado; en células completamente diferenciadas, el nucleolo se vuelve pequeño y compacto ($0.9 \mu\text{m}^2$) y cuando la célula presenta las primeras señales de degeneración, el nucleolo se ve aún más compacto ($0.5 \mu\text{m}^2$) (Hernandez-Verdun 1986).

5-3-Variabilidad nucleolar inducida

Agentes que interfieren con la síntesis del rRNA, maduración y transporte producen profundas alteraciones morfológicas de los nucleolos (Simard 1966); algunas patologías como el cáncer o infecciones víricas también inducen una grand variabilidad en la ultraestructura nucleolar (para revisiones: Simard et al. 1974, Smetana y Busch 1974, Bouteille y al. 1982). Es conocido que los nucleolos de las células cancerosas generalmente exhiben un tamaño más grande que las células normales, las células cancerosas están caracterizadas por un aumento marcado de la transcripción del RNA y del número de genes ribosómicos (Miller et al. 1979), también sus nucleolos muy a menudo presentan una organización reticulada (Ploton et al. 1982). Además, las células cancerosas parecen tener proteínas nucleolares no detectadas en células normales (Davis et al. 1979).

El efecto de varios inhibidores del rRNA sobre la morfología nucleolar es similar a los efectos descritos durante las condiciones patológicas. Un número de drogas conocidas por interferir con la síntesis del rRNA produce profundas alteraciones morfológicas en los nucleolos, caracterizados esencialmente por el colapso del nucleolonema, la redistribución de varios componentes nucleolares y por la aparición de nuevas entidades estructurales (para revisiones: Bernhard 1971, Simard et al. 1974, Recher et al. 1976, Bouteille et al. 1982).

III-OBJETIVOS

La presente Tesis forma parte de un proyecto encaminado a la valoración de los efectos producidos por complejos metálicos de nueva generación, en un intento de desarrollar alternativas al cisplatino u otros complejos relacionados con capacidad de unión al DNA, a ser incorporados preferentemente por células de tumores sólidos, y a mostrar menos efectos laterales que los del complejos basados en el platino.

En este contexto, dado el amplio conocimiento de los efectos de los complejos de platino y el amplio uso que se hace de ellos como parte de las estrategias quimioterapéuticas contra tumores sólidos, nos planteamos contribuir al establecimiento de algún marcador, entendiéndose como tal algún efecto común inducido por complejos de naturaleza muy distinta, que pudiera ser utilizado en futuras evaluaciones de nuevos complejos.

En el presente trabajo hemos utilizado un complejo de rutenio, el RAP ($[\text{RuLCl}_2] \cdot \text{H}_4\text{H}_2\text{O}$, $\text{L} = \text{PDTA}$), un nuevo complejo metálico con un átomo de rutenio en el centro coordinado octaédricamente con dos átomos de cloro ambos en posición *cis*, y el ligando de PDTA ocupando los cuatro vértices que quedan del complejo, diseñado y sintetizado por el grupo del Prof. F.González Vílchez, del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Sevilla, del que se conoce su capacidad para unirse al DNA y provocar cambios en su conformación, así como sus efectos sobre tumores en ratón.

Como paso previo nos planteamos el establecimiento de una concentración de trabajo que, sin ser letal, interfiriera con los procesos de crecimiento y proliferación de células tumorales en cultivo.

Establecida dicha concentración de trabajo, nos planteamos el estudio de las posibles modificaciones inducidas por el RAP sobre la replicación, así como la valoración del posible daño sobre el DNA inducido por el complejo.

Adicionalmente, nos propusimos investigar las posibles alteraciones sobre la localización de proteínas específicas de alta especificidad topográfica dentro del núcleo celular como manifestación de la capacidad de los aductos DNA-RAP para constituirse en trampas moleculares para determinadas proteínas. Al mismo tiempo, dadas las condiciones no letales de nuestro experimento, nos propusimos valorar las modificaciones inducidas sobre el contenido total de aquellas proteínas cuya localización fuera alterada por el

tratamiento, como manifestación de disfunciones inducidas sobre la elaboración de dichos productos génicos.

MATERIAL Y MÉTODO



1-Cultivo celular

Como material experimental se utilizaron las siguientes líneas celulares humanas: TG (cáncer de útero), H4 (neuroglioma) y Hs-683 (glioma) procedentes de la "American Type Culture Collection".

Las células fueron cultivadas en monocapa en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 g/ml de estreptomicina y 50 unidades/ml de penicilina (todos de Gibco BRL, Gaithersburg, EE.UU.). Al medio de las células TG, se añadió piruvato sódico. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂.

1-1-Tratamientos

Las células fueron tratadas con un complejo de nueva síntesis RAP ([RuLCl₂]H₄H₂O donde L es PDTA) a 1, 10, 100 ó 1000 µg/ml durante 7 días cambiando el medio de cultivo todos los días.

En otros experimentos, las células TG fueron tratadas con *cis*-DDP o cisplatino ("cis-platinum(II)diammine dichloride") (Sigma) a 2 ó 5 µg/ml durante 7 días cambiando el medio de cultivo todos los días.

En todos los casos, la dilución de 1000 µg/ml se mostró altamente tóxica, provocando muerte celular generalizada y no encontrándose, por tanto, incremento en el número de células.

Para evaluar el número de células, tras levantarlas mediante tripsinización, se procedió a su conteo en una cámara de Thomas modificada (Hycor, Kova Glastic, 10 portaobjetos con regillas). Cuando fue necesario, los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de t de Student; la diferencia estadística se consideró significativa para un valor de P<0.001.

2-Experimentos con linfocitos

2-1-Cultivo de células sanguíneas

10 ml de sangre humana heparinizada, de un donante voluntario varón sano, fueron extraídos en esterilidad y añadidos a 100 ml de medio RPMI (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 g/ml de estreptomina y 50 unidades/ml de penicilina. A la mezcla sangre-medio se añadió fitohemaglutinina al 2% (Gibco BRL) para estimular la entrada de los linfocitos en ciclo. La sangre se cultivó en suspensión en frascos estériles. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ durante 48 horas en agitación suave. Tras las 48 horas de estimulación, se trató la sangre con RAP a concentraciones de 100 µg/ml durante 4 días antes de proceder al aislamiento de los linfocitos. En paralelo se llevó un control sin tratamiento.

En los experimentos hechos con cisplatino, la sangre fue extraída y directamente se procedió al aislamiento de los linfocitos antes de tratarlos con el complejo metálico.

2-2-Extracción y aislamiento de linfocitos

La sangre se recogió en tubos de ensayo estériles de 10 ml y se dejó decantar antes de centrifugar a 1200 rpm durante 6 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril dejando un poco en el tubo para evitar pérdida de células. Se resuspendió el pellet suavemente a mano y se le añadió 10 ml de medio RPMI nuevo. Tras una nueva centrifugación en idénticas condiciones, se desechó el sobrenadante y se volcó lentamente sobre otro tubo de ensayo estéril conteniendo ficoll (Pharmacia Biotechnology) en proporción 3:4 (el precipitado de células no debería mezclarse con el ficoll). Tras una centrifugación de 10 minutos a 2000 rpm sin freno entre 18 y 20°C, se estableció un gradiente en el que los linfocitos aparecieron como una capa intermedia, que se recogió con mucho cuidado y se lavó con 3 ml de PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 6.7 mM y KH₂PO₄ 1.46 mM) resuspendiendo los linfocitos suavemente con una pipeta Pasteur estéril. Se centrifugaron los tubos a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron los linfocitos en 3 ml de PBS, se procedió a una nueva centrifugación en las

mismas condiciones y se recogió el pellet de linfocitos para su utilización posterior.

Se contaron los linfocitos en la cámara de Thomas para tener aproximadamente entre 50000 y 80000 células por preparación. En el caso del tratamiento con cisplatino, se sembraron los linfocitos aislados directamente sin estimular con 25 µg/ml de cisplatino durante 1 y 2 horas en medio de cultivo RPMI a 37 °C antes de proceder a la técnica del cometa.

3-Obtención de colonias, fijación y tinción

A partir del último día de tratamiento con los complejos RAP y cisplatino, se sembraron varias placas con células tratadas y células controles. Estas placas fueron cultivadas de 12 a 15 días con medio de cultivo suficiente, procediéndose, a continuación, a la fijación y tinción de las colonias celulares formadas. Para ello se desechó el medio de las placas y se trataron durante 10 minutos con metanol puro, se lavaron brevemente con PBS y se tiñeron con Giemsa al 10% en el mismo tampón durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de Giemsa con agua destilada y se dejaron las placas secar a temperatura ambiente. Se contaron aquellas colonias que presentaban un tamaño correspondiente a un número de células superior a 50 y se calculó la eficiencia en placa (Ep), que representa el porcentaje correspondiente al número de células capaces de dividirse en las condiciones normales de cultivo, y la fracción de supervivencia (FS) que representa el porcentaje de células viables tras un tratamiento dado. Se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$Ep = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias observadas en placas controles}}{\text{N}^\circ \text{ total de células sembradas}} \times 100$$

$$FS = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias observadas en placas tratadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células sembradas en placas tratadas} \times Ep} \times 100$$

4-Anticuerpos

Para nuestro estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos:

-Anticuerpos policlonales anti-NOR 90 de sueros autoinmunes procedentes de enfermos con artritis reumatoide previamente caracterizada su actividad (Rendon et al. 1992).

-Anticuerpos monoclonales anti-Fibrilarina procedentes de pacientes con escleroderma.

-Anticuerpo secundario "anti-mouse IgG" de conejo de la casa comercial ICN (Radiochemicals, Cleveland, Reino Unido).

-Anticuerpo secundario "anti-human IgG" conjugado con fosfatasa alcalina de la casa comercial Boehringer Mannheim.

5-Proliferación celular E.L.I.S.A.

Esta técnica está basada en la incorporación del análogo de la pirimidina 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) en lugar de la timidina en el DNA de células proliferativas. Después de su incorporación en el DNA, el BrdU se detecta por inmunoensayo.

Para ello, las células TG se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning) a 37°C durante 5 días, se añadió el BrdU (Boehringer Mannheim) a 100 µM y se incubaron a diferentes tiempos (2, 8, 12, 18 y 24 horas). Durante este período de marcaje, el BrdU se incorporó en lugar de la timidina en el DNA de las células. Al final del tratamiento, se desechó el medio de cultivo de las placas dejándolas secar antes de fijar las células y el DNA fue desnaturalizado añadiendo la solución FixDenat (Boehringer Mannheim) durante 30 minutos (la desnaturalización del DNA es necesaria para mejorar la accesibilidad del BrdU incorporado para su detección por el anticuerpo), luego se añadió la solución anti-BrdU-POD (Boehringer Mannheim) a la dilución 1:100 durante 90 minutos (El anti-BrdU-POD se une al BrdU incorporado al DNA celular sintetizado nuevamente). Las placas se lavaron 3 veces durante 15 minutos y para la detección de los complejos inmunes se añadió la solución de sustrato (Boehringer Mannheim) durante 15 minutos. El producto de la reacción se cuantificó mediante absorbancia a 450 nm usando para ello el lector E.L.I.S.A. (scanning multiwell spectrometer). Posteriormente, se procedió a la correlación de los valores de

absorbancia, según el color desarrollado en la reacción, con el DNA sintetizado y el número de células proliferativas en placa.

6-Ensayo de electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o "ensayo del cometa"

6-1-Preparación de los portaobjetos

Se utilizaron portaobjetos con borde esmerilado y se cubrieron con agarosa de punto de fusión normal previamente preparada al 0.65% en PBS y fundida en el baño María a 65°C. Se dejaron los portaobjetos secar verticalmente (se puede guardar en la nevera hasta un mes antes de usarlos).

6-2-Preparación de las muestras

Las células fueron tratadas con RAP o cisplatino durante varios días. Al mismo tiempo se llevó un control sin tratamiento. En cada uno de los experimentos en los que se utilizó esta técnica se prepararon 3 replicas de cada tratamiento. Las células fueron lavadas con PBS y se tomó el volumen necesario para tener aproximadamente 100000 células /porta. Se procedió a una centrifugación a 800 rpm y el precipitado fue precalentado a 37°C antes de añadirle 85 µl de agarosa de bajo punto de fusión previamente preparada al 0.5% en PBS y mantenida a 37°C al "baño María". Se echaron las células mezcladas con agarosa en el centro del portaobjetos con la primera capa, colocando rápidamente un cubreobjetos largo (24 x 66 mm), se dejaron gelificar en frío al menos 10 minutos disponiéndolos encima de una placa metálica horizontal sobre hielo picado. A continuación, se quitaron los cubreobjetos levantándolos cuidadosamente y se añadieron 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión; seguidamente se colocó encima del porta otro cubreobjetos, se dejaron gelificar en frío otros 10 minutos y se sumergieron después de quitarles los cubreobjetos en una solución de lisis de membranas de pH alcalino (pH 12) recién preparada (10 mM Tris pH 10, 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 0.5 M NaOH al que se añadió 1% (v/v) de Tritón X-100 y 10% (v/v) de "dimetil sulfoxido" (DMSO) en el momento de utilizarlo). Las preparaciones se dejaron en

esta solución al menos 1 h a 4°C hasta un máximo de 72 horas para permitir la lisis del material celular entero.

El pH alto se utiliza, generalmente, para facilitar la desnaturalización, el desenrollamiento y la expresión de las lesiones de simple cadena, como las roturas en el DNA que aparecen después de una exposición a los alkalis (llamadas también, lesiones lábiles) (Faibairn et al. 1995).

6-3-Pre-electroforesis y electroforesis

La pre-electroforesis permite el desenrollamiento del DNA antes de la electroforesis. Las preparaciones se sacaron de la solución de lisis y se colocaron horizontalmente sobre una cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis frío (aproximadamente 12°C) y recién preparado, (1 mM Na₂-EDTA y 300 mM NaOH, pH > 12) procurando no dejar espacios entre los portas, durante 30 minutos. Se preparó la cantidad suficiente para cubrir los portas de aproximadamente 2 mm de espesor. Para mantener esta temperatura, la cubeta se colocó sobre hielo picado. Transcurrido este tiempo, se inició la electroforesis en frío durante 20 minutos a 300 mA (el voltaje depende del tamaño de la cubeta).

Los portaobjetos se sacaron del tampón de electroforesis y se colocaron horizontalmente procurando no perder la capa de agarosa, para ello, se limitaron los puntos de apoyo del porta a 2. Los portas se lavaron con tampón de neutralización (0.4 M Tris, pH 7.5) 3 veces durante 5 minutos cada una con objeto de eliminar las sales y detergentes que podrían interferir con la tinción posterior. Después del último lavado, los portas se secaron a temperatura ambiente y se fijaron a continuación en metanol absoluto durante 15 segundos.

Una vez secos y antes de la observación al microscopio (Olympus AHBT3), los portas fueron teñidos con 5 µg/ml de DAPI (Diamino-2-fenilindole, Sigma) .

6-4-Análisis de imagen

Las células teñidas con DAPI fueron examinadas bajo microscopio de fluorescencia, las imágenes fueron captadas usando una cámara Leica DC 100 (Leica) y almacenadas en ordenador. Aproximadamente 80 células de cada tratamiento fueron analizadas utilizando

el programa PCBas Software Computer. Las imágenes obtenidas se utilizaron para estimar el DNA contenido en el núcleo individual, también para evaluar el grado de daño representando la fracción de DNA total en la cola. Las células fueron clasificadas en 10 clases: 1 (<10% de DNA en la cola, no dañadas), 2 (11-20%), 3 (21-30%), 4 (31-40%), 5 (41-50%), 6 (51-60%), 7 (61-70%), 8 (71-80%), 9 (81-90%) y 10 (>90% de DNA en cola).

$$\%DNA = \frac{D.O. \text{ cometa} - D.O. \text{ núcleo}}{D.O. \text{ cometa}} \times 100$$

En ciertos experimentos se determinó igualmente la longitud de la cola, estableciéndose para cada caso el valor del momento del cometa (M), definido por la formula:

$$M = \% \text{ DNA en cola} \times \text{Longitud de cola}$$

7-Análisis de proteínas

7-1-Obtención de extractos totales

Tras 7 días de tratamiento con RAP, las células fueron lavadas con PBS e incubadas a 37°C durante 5 minutos con 0.025% de tripsina a fin de levantarlas de las placas de Petri. Después, las células fueron transferidas a tubos estériles con medio de cultivo y centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en PBS y centrifugado otra vez a 800 rpm durante 5 minutos.

Con objeto de tener extractos de proteínas del mismo número de células en control que en problema, las células fueron contadas en la cámara de Thomas.

Las proteínas totales de los extractos fueron resuspendidas en tampón para muestras de electroforesis y calentadas durante 10 minutos a 98°C para permitir sus desnaturalización. Las proteínas liberadas fueron analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE según el

método de Laemmli (Laemmli 1970). Se utilizaron geles con una concentración de acrilamida del 12%.

7-2-Tinción de nitrato de plata de proteínas generales

Después de correr la electroforesis con extractos de proteínas totales de los diferentes tratamientos, se fijaron los geles durante 1 h, como mínimo, en una solución conteniendo metanol al 50%, ácido acético al 12% y 0.5 ml/l de formaldehído al 37%. Se lavaron en metanol al 50% tres veces durante 20 minutos cada una de ellas. Se procedió a un pre-tratamiento de los geles con tiosulfato sódico en concentración de 0.2 g/l durante 1 minuto, y a continuación a tres lavados rápidos de 20 segundos con agua destilada. Se impregnaron los geles con una solución conteniendo 0.2% de nitrato de plata y 0.75 ml/l de formaldehído al 37% durante 20 segundos. Se lavaron rápidamente con agua destilada 2 veces y se revelaron con una solución de carbonato sódico al 6%, tiosulfato sódico en concentración de 4 mg/l y 0.5 ml/l de formaldehído al 37%. Nuevo lavado con agua destilada dos veces durante 2 minutos cada uno y se paró la reacción con metanol al 50% más ácido acético al 12% durante 10 minutos. Por último, los geles fueron transferidos a una solución de metanol al 50% y posteriormente se almacenaron a 4°C.

Las bandas visualizadas fueron escaneadas y cuantificadas usando para ello el escaner Mustek MFS-12000CX y el programa PCBas Software Computer (versión 2.0).

8-Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa se realizó según el método de Towbin (Towbin et al. 1979) en tampón Tris 37 mM pH 8.3 con glicina 292 mM, metanol 4.88M y SDS al 10%. La transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida se hizo a 4°C toda la noche a 2 mA/cm² usando para ello el aparato de transferencia modelo 200/2.0 Power Supply (BioRad). Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron incubadas durante al menos 1 hora en tampón bloqueante (Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 8.0 y 5% de leche en polvo sin materia grasa) y a continuación en una dilución 1:500 de anticuerpo anti NOR 90/hUBF en el mismo tampón bloqueante durante 1 hora a 37°C. Tras lavar durante 15

minutos 3 veces con el mismo tampón, se procedió a una segunda incubación con el anticuerpo secundario "anti-IgG" de humano conjugado con fosfatasa alcalina a la dilución 1:7000 durante 1 hora a temperatura ambiente. El revelado de la actividad de la fosfatasa alcalina se realizó a temperatura ambiente, en tampón Tris-HCl 100 mM pH 9.5 con NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NBT ("Nitro Blue Tetrazolium") 0.33% (p/v) y BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato) al 0.16% (p/v).

9-Inmumoprecipitación

-Los inhibidores de proteasas utilizados: La Benzamidina, la mezcla CLAP (leupeptina 5 mg, antipaina 5 mg y pepstatina A 5 mg en 330 µl de DMSO "Dimetil Sulfoxido"), la aprotinina y el inhibidor de la tripsina de soja fueron adquiridos de la casa comercial Sigma, el PMSF (Fenilmetano Sulfonil Fluorido) 1 mM de la casa comercial Fluka.

-La albúmina de suero bovino BSA fue adquirida de la casa Sigma.

Al sexto día del tratamiento con el complejo RAP, las células fueron marcadas toda la noche con 50 µCi/ml de un precursor radioactivo, metionina-cisteina-³⁵S ("Trans ³⁵S-methionine-cysteine-label") (1000-1100 Ci/mmol, ICN Radiochemicals, Cleveland, EE.UU.). Al día siguiente, las células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar el exceso de radioactividad antes de contarlas en la cámara de Thomas para tener el mismo número de células en el control que en el tratado. Las células se lisaron con tampón NET (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 400 mM, Na₂-EDTA 5 mM y 1% de Tritón X-100) e inhibidores de proteasas (benzamidina 5 mM, PMSF 1 mM, mezcla CLAP 100 µg/ml, aprotinina 0.1 TIU/ml y 100 µg/ml del inhibidor de la tripsina de soja). Las células fueron sonicadas durante 1 a 2 minutos para romper las membranas y liberar el contenido de las células, luego, se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13.700 rpm.

Al sobrenadante, se le añadió 100 ml de tampón NET y la cantidad adecuada de los anticuerpos a inmunoprecipitar según el título de cada uno. Las muestras se incubaron en eppendorph con agitación a temperatura ambiente (25°C) durante 2 horas 30 minutos o a 4°C durante 16 horas. Posteriormente, se añadió a cada eppendorph 10% de proteína A-Sefarosa CL4B (Sigma) en tampón NET suplementado con 1mg/ml de BSA y se incubaron durante 1

hora 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. A continuación, se procedió a la centrifugación de las muestras y los inmunoprecipitados fueron lavados secuencialmente 3 veces con tampón NET, 2 veces con tampón NET con doble concentración de NaCl (800mM) y 2 veces con Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y Na₂-EDTA 1 mM .

Las proteínas inmunoprecipitadas procedentes de lisados de células fueron eluidas de la matriz de Sefarosa CL4B mediante desnaturalización, los inmunoprecipitados fueron resuspendidos en tampón para muestras de electroforesis con DTT (ditiotreitól) 10 mM y 4% de SDS, calentados de 5 a 10 minutos a 98°C. Las proteínas extraídas fueron analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE. Se utilizaron geles con una concentración de acrilamida del 8% y del 12%, los cuales, tras una fijación de 30 minutos a temperatura ambiente en una mezcla de isopropanol/agua/ácido acético (2.5 ml/ 6.5 ml/ 1 ml), fueron procesados para fluorografía con una solución amplificadora (Amplify; Amersham, Burckinghamshire, Reino Unido). Los geles fueron secados a 80°C en un secador de geles modelo 583 (Biorad) y las bandas visualizadas en los fluorogramas, siendo a continuación cuantificadas en un densitómetro (Fujix Bas 1000), usando para ello el programa PCBas Software Computer (versión 2.0).

10-Estudio morfológico e inmunocitoquímico

Tras 7 días de tratamiento con RAP, las células se sometieron a una fijación en placa de 1 hora, se levantaron de la misma por arrastre y se recogieron en tubo de ensayo para ser posteriormente centrifugados a 2000 rpm hasta formar un pellet.

Para el estudio morfológico, se fijaron las células en glutaraldehído al 1.6% en tampón cacodilato 0.1 M a pH 7.2-7.4 (cacodilato sódico 100 mM y cloruro de calcio 3 mM) durante 2 horas a 4°C y se postfijaron en tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% durante 2 horas a 4°C después de lavarlos con el mismo tampón.

Para el estudio inmunocitoquímico, el material fue fijado en para-formaldehído al 4% más glutaraldehído al 0.1% en tampón cacodilato 0.1 M a pH 7.2 durante 1 hora a 4°C. Las muestras fueron lavadas con tampón cacodilato seguido de un tratamiento con cloruro de amonio (NH₄Cl) 0.5 M en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2 durante 4 h a temperatura ambiente para bloquear los grupos aldehídos libres e inhibir la actividad de hidrolasas

lisosomales. Después se lavaron otra vez con el mismo tampón.

10-1-Inclusión en resina Spurr

Las muestras procesadas para el estudio morfológico fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en resina siguiendo el método de Spurr en 1969.

10-1-1-Deshidratación (a 4°C)

La deshidratación de las muestras se realizó en concentraciones crecientes de acetona a 4°C:

- Acetona al 30%, un paso de 15 minutos.
- Acetona al 50%, un paso de 15 minutos.
- Acetona al 70%, un paso de 15 minutos.
- Acetato de uranilo al 1% en acetona al 70% durante 4 h.
- Acetona al 70%, dos pasos de 15 minutos.
- Acetona al 80%, dos pasos de 15 minutos.
- Acetona al 90%, dos pasos de 15 minutos.
- Acetona al 100%, dos pasos de 15 minutos.
- Oxido de propileno dos pasos de 15 minutos.

10-1-2-Impregnación (a 4°C)

La impregnación de las muestras se realizó en concentraciones ascendente de resina Spurr (Fluka) a 4°C:

- Acetona 100%-resina Spurr 3:1 durante 60 minutos.
- Acetona 100%-resina Spurr 1:1 durante 60 minutos.
- Acetona 100%-resina Spurr 1:3 durante 60 minutos.
- Resina Spurr pura durante 12 horas a temperatura ambiente.

10-1-3-Polimerización

Se trasladó el material a cápsulas Beem cónicas y se polimerizó a 70°C durante 7 horas.

10-2-Inclusión en Lowicryl K4M

La inclusión a baja temperatura con la resina hidrofílica Lowicryl K4M (Fluka) se llevó a cabo según el método descrito por Roth en 1983 con pequeñas modificaciones.

10-2-1-Deshidratación

Las muestras destinadas al estudio inmunocitoquímico fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de metanol a temperaturas progresivamente menores:

- Metanol al 50%, dos pasos de 15 minutos cada uno, a 0°C.
- Metanol al 80%, dos pasos de 30 minutos cada uno, a -20°C.
- Metanol al 90%, dos pasos de 60 minutos cada uno, a -35°C.

10-2-2-Impregnación

El agente deshidratante utilizado durante la infiltración a -35°C con Lowicryl K4M fue metanol al 90%.

- Lowicryl-metanol 90% 1:1, 30 minutos a -35°C.
- Lowicryl-metanol 90% 2:1, 60 minutos a -35°C.
- Lowicryl 100%, dos pasos de 60 minutos cada uno a -40°C.
- Lowicryl 100% durante 12 h a -40°C.

10-2-3-Polimerización

Se trasladó el material a cápsulas Beem cónicas tapadas y en ausencia de aire y la resina se polimerizó mediante irradiación indirecta con luz ultravioleta a 360 nm, obtenida

con una lámpara fluorescente Philips de 15 W durante 24 horas, a una temperatura que puede variar entre -30°C a -50°C. Posteriormente, se prosiguió la polimerización con la luz U.V. a temperatura ambiente durante 2 a 3 días.

10-3-Sección de los materiales

Las secciones semifinas y finas de los materiales incluidos en resinas se obtuvieron en un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E.

Las secciones semifinas de 500 nm se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con Azul de Toluidina.

Las secciones finas de 80 nm de material incluido en resina Spurr fueron montadas en rejillas de cobre, procediéndose a continuación a la contratincción con acetato de uranilo y citrato de plomo para el posterior estudio morfológico ultraestructural.

El estudio inmunocitoquímico se llevó a cabo en material incluido en Lowicryl K4M. Para ello, las secciones finas de 120 nm fueron montadas en rejillas de oro o nickel previamente cubiertas con una película de colodión, sombreada con carbón. Posteriormente las muestras fueron procesadas con técnicas para su observación a microscopía electrónica.

10-4-Marcaje con el complejo proteína A-oro

10-4-1-Preparación del oro coloidal (8 nm)

-Solución de oro: -1 ml de tetracloruro de oro al 1%.

- 79 ml de agua bidestilada y filtrada.

-Mezcla reductora: -4 ml de solución de citrato trisódico bihidratado al 1%.

-0.125 ml de solución de ácido tánico al 1%.

-Agua bidestilada y filtrada en cantidad suficiente para 20 ml.

Se calentaron por separado ambas soluciones hasta alcanzar los 60°C, y se añadió entonces la mezcla reductora sobre la solución de oro rápidamente y con agitación. Se calentó la solución hasta ebullición y se mantuvo al menos durante 10 minutos. Una vez fría, se ajustó la solución a pH a 6.9 con K₂CO₃ 0.2 M

10-4-2-Preparación del complejo proteína A-oro

Se disolvió 1 mg de proteína A en 0.2 ml de agua bidestilada y filtrada. Se mezcló con 10 ml de oro coloidal, se agitó suavemente en una probeta 2 o 3 veces y se dejó reposar 2 minutos. Se añadió 0.2 ml de polietilenglicol 2000 (PEG) al 1% y se dejó reposar.

Se centrifugó la solución a 20.000 rpm durante 4 horas a 4°C, recuperándose el sedimento rojo oscuro del complejo proteína A-oro en 3 ml de PBS pH 7.4 conteniendo 0.2 mg/ml de PEG.

11-Marcaje inmunocitoquímico para la detección de proteínas nucleolares

Siguiendo el método descrito por Hansmann (Hansmann et al. 1986). Para ello, las rejillas se bloquearon, en una gota de PBS pH 7.4 conteniendo BSA al 1%, Tritón X-100 al 0.05% y Tween 20 al 0.05%, mediante flotación con las secciones del tejido hacia abajo, durante 30 minutos. Todos los pasos se realizaron a temperatura de laboratorio y ambiente húmedo. Tras un lavado en PBS, se incubaron las rejillas en el primer anticuerpo diluido en PBS durante 1 hora seguido de un lavado en PBS y de otra incubación con la proteína A-oro diluida en la solución de bloqueo durante 1 h. A continuación, se procedió a un lavado con PBS seguido de otro lavado con agua destilada y de la contratinción con acetato de uranilo al 2% en oscuridad durante 5 minutos.

Por otro lado, se llevaron a cabo controles sin anticuerpos primarios para demostrar la especificidad del marcaje.

En el caso del anticuerpo monoclonal anti-fibrilarina, tras la primera incubación las secciones con el anticuerpo secundario o con el anticuerpo puente de conejo anti ratón "rabbit-anti-mouse" antes de incubar con la proteína A.

Las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico se analizaron cuantitativamente en relación con la cantidad detectada de inmunoprecipitado por unidad de superficie (μm^2).

RESULTADOS

1-Cultivo de líneas celulares

Con el objeto de detectar a nivel celular la posible expresión de la interacción RAP-DNA, establecimos las curvas de crecimiento de cultivos de células TG normales y tratadas con RAP. La figura 1 muestra la evolución con el tiempo del número total de células TG cultivadas en ausencia (control) y presencia del RAP. De esta forma, observamos la alteración inducida sobre la cinética de crecimiento a diferentes dosis del complejo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de la t de student. La diferencia estadística se consideró significativa para un valor de $p < 0.001$.

Las dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ indujeron una intensidad de proliferación menor, en comparación con el control, durante los 7 días de tratamiento, si bien esta diferencia solamente fue estadísticamente significativa al comparar la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ con el control (figura 1). Tras el tratamiento con la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ y a partir de las 48 horas, las células TG aumentaron el tiempo de duración de sus ciclos celulares de forma significativa, pasando de tener un ciclo celular de aproximadamente 28-29 horas a 33-35 horas tras el tratamiento.

Al realizar un estudio a microscopía óptica, no observamos alteraciones morfológicas ni figuras de muerte celular en ambas condiciones.

La dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ se eligió para los experimentos posteriores, siendo esta concentración la que indujo una clara interferencia con la proliferación celular sin producir muerte celular.

En el caso de las líneas celulares H4 y Hs-683, la manifestación de la alteración del crecimiento se produjo tras un tiempo superior de tratamiento, pasando de aproximadamente 33-34 horas en células Hs-683 controles a 35 horas tras el tratamiento con RAP, en este tipo celular, la diferencia significativa apareció a partir de las 144 horas sin evidenciar cambios morfológicos aparentes (figura 2). En células H4 la duración del ciclo celular aumentó pasando de 28 horas a 29 horas aproximadamente, la diferencia significativa la encontramos a partir de las 96 horas del tratamiento (figura 3), estas células no mostraron modificaciones morfológicas con respecto al control de células sin tratar.

Sin embargo, al aumentar la dosis de tratamiento con el complejo inorgánico RAP a 1000 $\mu\text{g/ml}$ notamos una disminución drástica en la división de las células H4 que a partir de las 48 horas de tratamiento causó muerte celular.

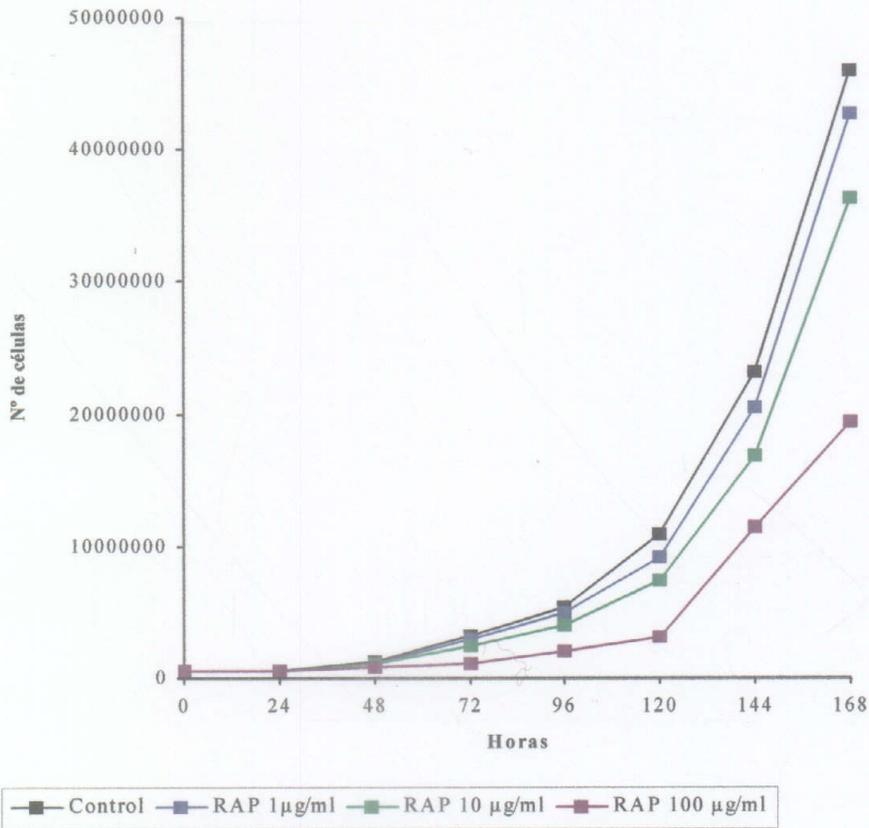


Figura 1. Efecto del RAP sobre la cinética de crecimiento de células humanas en proliferación. Las células TG fueron tratadas con el complejo RAP durante 7 días.

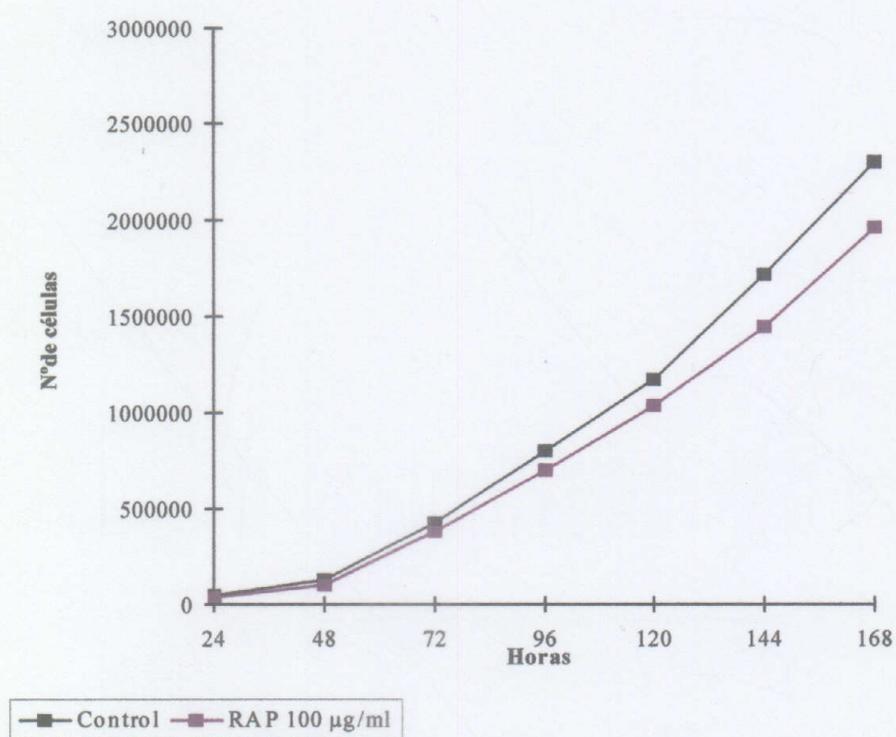


Figura 2. Efecto del RAP sobre la cinética de crecimiento de células humanas en proliferación. Las células Hs-683 fueron tratadas con el complejo RAP durante 7 días.

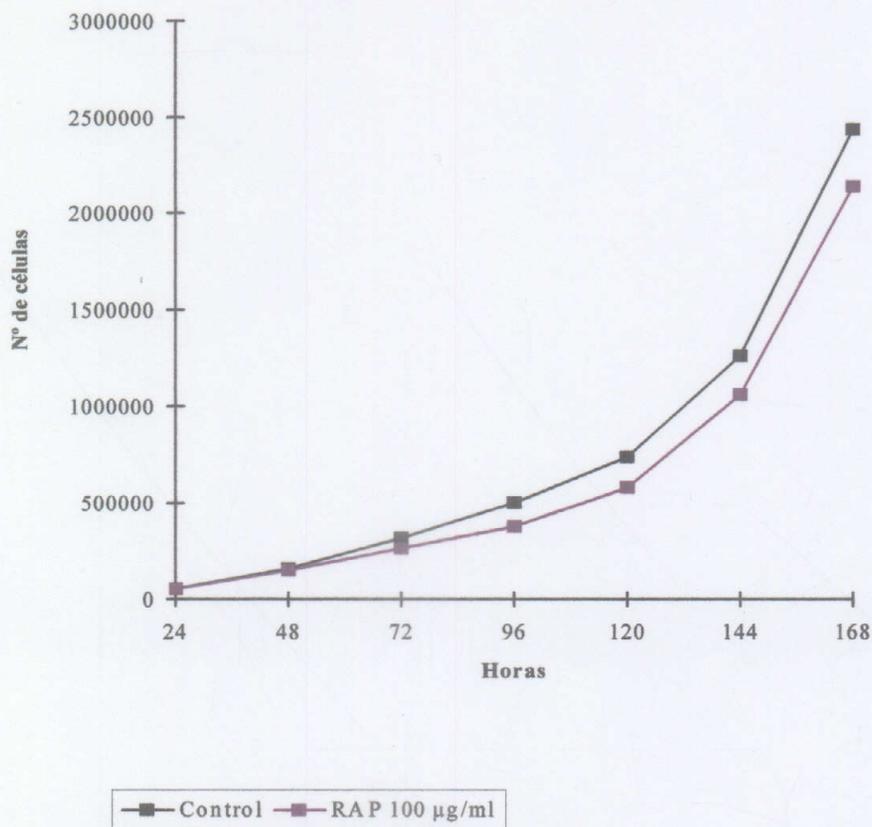


Figura 3. Efecto del RAP sobre la cinética de crecimiento de células humanas en proliferación. Las células H4 fueron tratadas con el complejo RAP durante 7 días.



2-Efecto del cisplatino sobre la cinética de crecimiento de células TG

Dado que el diseño y elaboración de complejos metálicos de nueva generación forma parte de una estrategia que intenta proponer alternativas y mejoras en los resultados terapéuticos obtenidos tras el uso de agentes de la familia del cisplatino, hemos utilizado este complejo a fin de comparar sus efectos con los obtenidos utilizando RAP en aquellos aspectos en los que pudieran aparecer diferencias entre nuestros datos y los referidos al cisplatino por otros autores

Así pues, en un experimento preliminar, intentamos establecer una concentración de cisplatino que tuviera un efecto similar al del RAP 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la cinética de crecimiento de los cultivos de células TG. Para ello, procedimos a la determinación de la curva de crecimiento de células TG en cultivo tratándolas con cisplatino durante 7 días. La dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$ indujo una intensidad de proliferación menor a la del control sin provocar muerte celular, una diferencia significativa apareció a partir de 72 horas de tratamiento. Sin embargo, aumentando la dosis de cisplatino a 5 $\mu\text{g/ml}$, las células TG empezaron a mostrar figuras de muerte celular a partir de las 24 horas de tratamiento (figura 4).

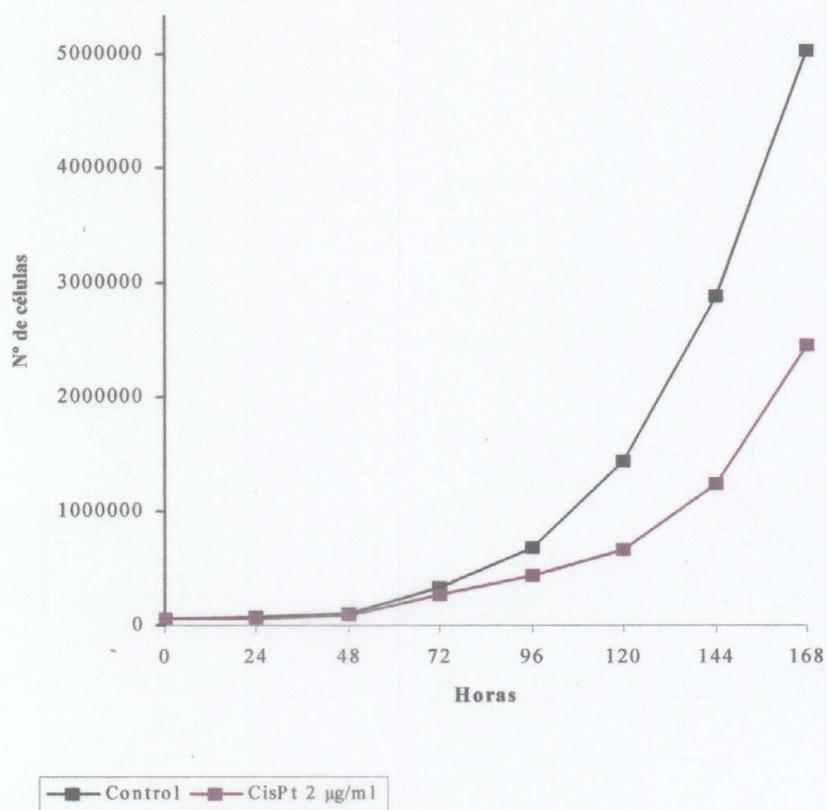


Figura 4. Efecto del cisplatino sobre la cinética de crecimiento de células humanas en proliferación. Las células TG fueron tratadas con el cisplatino durante 7 días.

Teniendo en cuenta, como hemos visto, que el tratamiento con RAP alarga el ciclo celular, procedimos al estudio de la fracción de supervivencia de los cultivos. Para ello, se sembraron placas con células después del séptimo día de tratamiento y se dejaron durante 15 días antes de su fijación y tinción. Se calculó la fracción de supervivencia con relación a la eficiencia en placa del cultivo de células controles. Los resultados obtenidos en células TG y Hs-683 mostraron una recuperación alta tras el tratamiento con el compuesto inorgánico con un 84 % en células TG y un 74.54 % en células Hs-683; las células H4, por el contrario, presentaron un nivel bajo de recuperación, solo un 53.5 % de células sobrevivieron tras el tratamiento con el RAP.

Línea celular	TG	Hs-683	H4
Ep	35 %	1.3 %	25 %
Ep control	100%	100%	100%
FS	84 %	74.54 %	53.5 %

Tabla. 1 Eficiencia en placa (Ep) y de la fracción de supervivencia (FS) de las tres líneas celulares TG, Hs-683 y H4. Tras el tratamiento con RAP, las células controles y problema se sembraron en placas de Petri y se incubaron durante 15 días a 37 °C.

Para hacer una aproximación del porcentaje de recuperación de las células de las tres líneas celulares TG, Hs-683 y H4 después de su tratamiento con RAP, procedimos al conteo del número de colonias repartiéndolas en tres clases, 1 (colonias pequeñas con menos de 400 μm de diámetro), 2 (colonias medianas con 400 a 1500 μm de diámetro) y 3 (colonias grandes con más de 1500 μm de diámetro). En células TG control, más del 80 % de colonias eran grandes; tras el tratamiento con RAP, las colonias contadas se repartieron en un 37.64% de colonias medianas y un 62.36 % de colonias grandes. En células Hs-683 controles, las colonias contadas se repartieron de la siguiente forma: más del 80 % eran colonias medianas

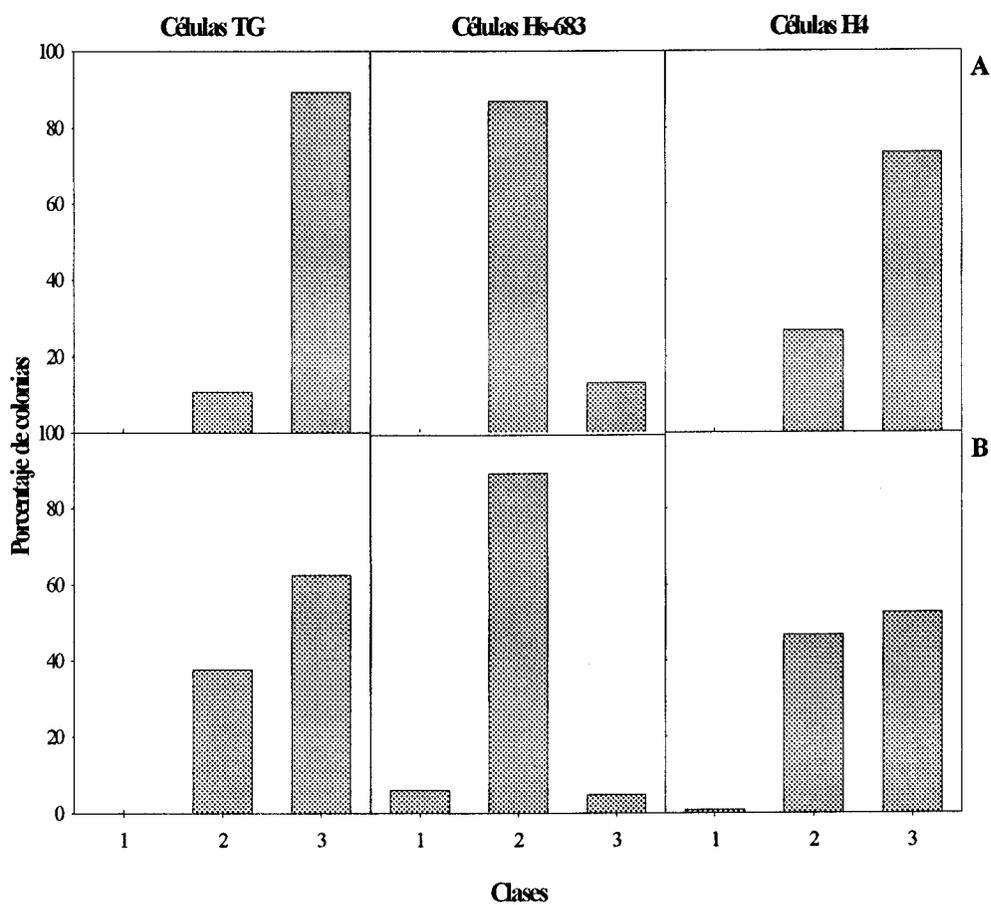


Figura 5. Formación de colonias a partir de células de las tres líneas celulares TG, Hs-683 y H4. Las células se trataron durante 7 días con RAP y luego se incubaron con medio de cultivo suficiente durante 12 a 15 días; las colonias se tiñeron con Giemsa y se contaron según sus tamaños clasificandolas en 3 clases: 1 (menos de 400 μm de diámetro), 2 (400-1500 μm) y 3 (más de 1500 μm). **A.** células controles; **B.** células tratadas

y el 13 % eran grandes; tras el tratamiento con RAP, encontramos aproximadamente un 90% de colonias medianas y el resto repartidos entre colonias pequeñas y grandes. En células H4, el control presentó más del 70 % de colonias grandes y menos del 30% de colonias medianas; después del tratamiento con RAP, se encontraron los siguientes valores: el 52.50 % de colonias grandes, el 46.67 % de colonias medianas y menos del 1 % de colonias pequeñas (figura 5).

3-Proliferación celular E.L.I.S.A.

La alteración de la duración del ciclo celular observada en células TG tratadas puede ser, de manera similar a lo ya establecido por el cisplatino (Kasamatsu et al. 1995), debida a la interacción del RAP con el DNA. Para estudiar una posible alteración de la función normal del DNA durante el ciclo celular como consecuencia de la interacción anteriormente citada, llevamos a cabo el ensayo de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), análogo de la pirimidina, en células TG en placas multipocillos durante un tiempo de 5 días. Tras finalizar el tratamiento con el complejo RAP, la BrdU se añadió a diferentes tiempos, 2, 8, 12, 18 y 24 horas a 100 μ M. Posteriormente, la incorporación de BrdU se detectó por inmunoensayo.

Los resultados obtenidos fueron, a nuestro juicio, sorprendentes dado el alto incremento en la incorporación por parte de las células tratadas en relación con las células controles.

La figura 7 muestra la incorporación de BrdU, expresada como absorbancia en unidades arbitrarias, en células control y tratadas con RAP a lo largo del tiempo. Ya desde la primera determinación, es decir, sólo tras 2 horas en presencia de BrdU, las células tratadas muestran un valor para su incorporación que es del orden de cinco veces el correspondiente a los controles. Adicionalmente, las respectivas pendientes de incremento son superiores a las células tratadas. Estos resultados muestran que, como consecuencia de la acción del RAP, las células tratadas incorporan mucho más BrdU que los controles. Tal incorporación podría, en principio, ser atribuida a reparación de un posible daño en el DNA como consecuencia del tratamiento.

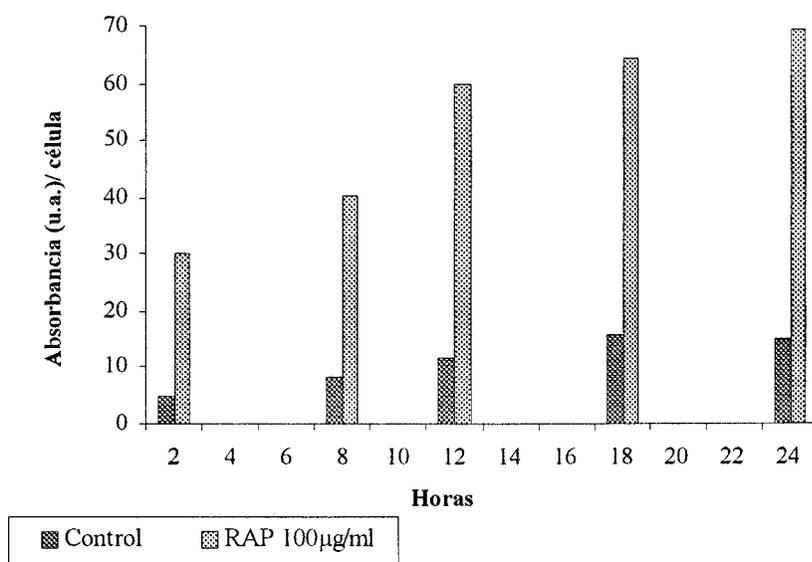


Figura 7. Incorporación del BrdU en células TG controles y tratadas con RAP. Las células se trataron con RAP durante 5 días y el BrdU se añadió a las placas a 100 µM durante 2, 8 12, 18 y 24 horas antes de proceder al inmunoensayo E.L.I.S.A.

3-Valoración de daño en DNA

Los experimentos de incorporación de BrdU anteriormente descritos sugirieron fuertemente la posibilidad de existencia de daño en el DNA inducido por su posible interacción con el RAP. Dado que tal daño, de existir, no se manifestaba de manera detectable como aberraciones en la estructura de los cromosomas mitóticos (datos no mostrados), se procedió a realizar, tanto en células tratadas con RAP como en células control, el “ensayo cometa” o técnica de electroforesis en gel de agarosa de células aisladas. A través de esta técnica se puede visualizar y, en su caso, cuantificar la migración de DNA dañado como consecuencia de la acción del campo eléctrico propio de las condiciones a las que se realiza la electroforesis en núcleos de células previamente sometidas a un tratamiento alcalino (Singh et al. 1988). En estas condiciones, los núcleos no dañados muestran un contorno circular en tanto que aquéllos en los que existe DNA dañado se manifiesta una migración, dando a la figura que se observa en estos casos el aspecto de un cometa (figura 8).

Tras la aplicación de la electroforesis se cuantifica, por cada célula, la fluorescencia debida a la tinción con DAPI que se encuentra formando parte de la cola y se expresa como porcentaje de la fluorescencia total del núcleo. Este parámetro se considera estar directamente relacionado con el daño en el DNA (Olive et al. 1990). Los resultados obtenidos a partir de determinaciones individuales se agruparon en diez clases, desde la clase 1, núcleos sin daño detectable, a la clase 10, núcleos con máximo daño.

Las células TG fueron sometidas a tratamiento continuo con RAP durante 7 días antes de proceder a la aplicación de la técnica. Las células control mostraron un 80% de células sin daño detectable (menos de 10% de DNA en la cola), un 13.75% de células con 10 a 20% de DNA dañado y un 6% de células con un DNA dañado que representó del 20 al 30% del DNA total, no encontrándose células en clases de daño superior (Figura 9.A). En las células TG tratadas con RAP (figura 9.B) sólo se detectaron el 12.5% de las células en la clase 1 en la que se mostraba la totalidad de la población celular control y con el resto repartido entre las otras clases (10 a 100% de daño).

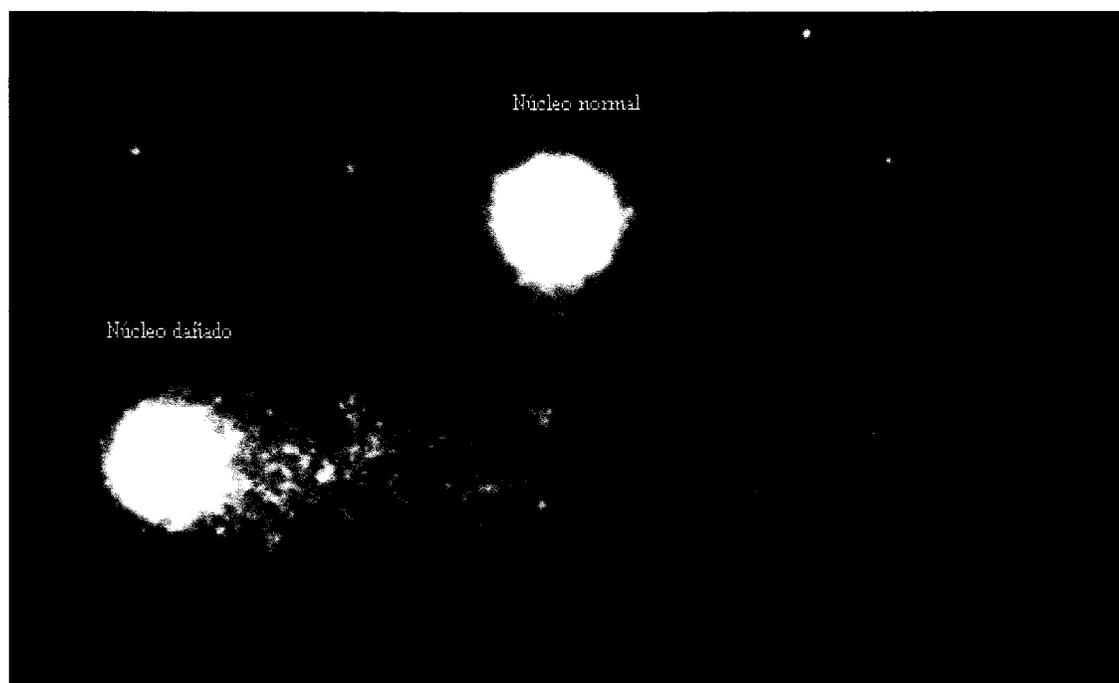


Figura 8. Aspecto de los núcleos tras el ensayo del cometa. Tras la lisis celular y la electroforesis los núcleos control tienen un aspecto redondeado, mientras que los núcleos dañados adquieren la forma de un cometa, ya que los fragmentos de DNA migran hacia el ánodo.

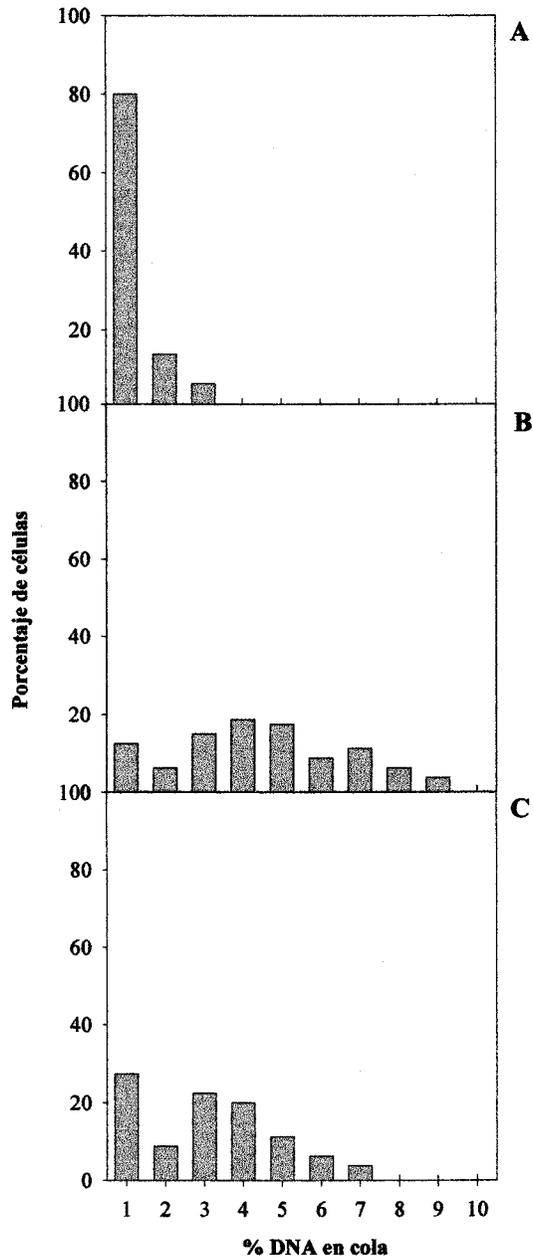


Figura 9. Distribución del daño celular en líneas celulares humanas en el ensayo cometa. Células TG control (A) y tratadas con RAP durante 7 días (B). Células TG tratadas con RAP durante 7 días e incubadas durante 48 horas sin tratamiento antes de proceder al ensayo del cometa(C)

En la tabla 2 se muestran los valores medios para la proporción de DNA en la cola, su longitud y el momento calculado, encontrándose diferencias significativas para todos los parámetros entre los controles y los obtenidos tras el tratamiento.

	% DNA en cola	Longitud (μm)	Momento
Control	3.47 ± 0.4	11.85 ± 0.2	0.4 ± 0.04
RAP 100 $\mu\text{g/ml}$	$29.64 \pm 2.34^*$	$59.33 \pm 3.49^*$	$22 \pm 2.36^*$
RAP 100 $\mu\text{g/ml}$ (tras 48 horas de recuperación)	$20.31 \pm 1.82^{*\#}$	$71.72 \pm 5.45^{*\#}$	$19.34 \pm 2.8^*$
Cisplatino 2 $\mu\text{g/ml}$	$5.54 \pm 0.63^*$	$21.19 \pm 1.85^*$	$1.17 \pm 0.25^*$

Tabla 2. Valores medios del % de DNA, longitud de la cola y momentos correspondientes a los diferentes tratamientos en células TG.

Media \pm Error Estándar de la media

* Diferencia significativa a $P < 0.01$ con respecto al control.

$\#$ diferencia significativa a $P < 0.01$ con respecto al RAP.

Tras este experimento se procedió a realizar un estudio en relación con la posible recuperación al tratamiento como determinación de la capacidad celular para expresar la reparación del daño inducido por el RAP. Con este objetivo, y tras tratar las células TG de manera continuada durante 7 días con RAP, se mantuvieron 48 horas con medio de cultivo sin el complejo metálico antes de proceder al tratamiento alcalino y subsiguiente electroforesis. La aplicación del ensayo cometa y su cuantificación mostró un desplazamiento de los valores obtenidos hacia clases de menor daño, sin que, al menos en las condiciones de este experimento, existiera una desaparición total de células en las clases de daño superior (figura 9.C). Al comparar los valores medios de los parámetros citados anteriormente (tabla 2) se observan diferencias significativas con los valores de las células control, así como entre ambos tratamientos para la proporción de DNA en la cola y su longitud, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de los momentos. En todo caso, estos resultados muestran que las células TG, tras el tratamiento con RAP, han podido

al menos iniciar un proceso de recuperación y que la maquinaria de reparación no permite que el daño sea absolutamente irreversible.

El ensayo cometa sobre células Hs-683 y H4 se llevó a cabo tras 3 días de tratamiento con el complejo RAP. En células Hs-683, de toda la población cuantificada, el control presentó aproximadamente un 86% de células sin daño aparente y un 13% de células que representaron del 10 al 20% de daño en el DNA total (figura 10.A); un porcentaje mínimo de células (1.32%) presentaron un DNA con máximo daño. Tras el tratamiento con RAP, las células Hs-683 se distribuyeron de la siguiente forma: un 15.8% de células de la clase 1 (menos de 10% de daño), un 58% de células de las clases 2 a 5 y un 26.3% con daño superior al 50% (figura 10.B).

En células H4, el control presentó un 82.5% de células sin daño aparente y un 16.25% de células con un DNA dañado del 10 al 20% del DNA total (figura 10.C). Tras el tratamiento con RAP, más del 40% de células presentaron daño mayor en su DNA (clases 5 a 9), 52.5% con daño correspondiente a las clases 2 a 4 y un 2.5% de células correspondieron a la clase 1 (figura 10.D).

Las células TG se sometieron a otro tratamiento continuo con el complejo cisplatino a 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 7 días, el ensayo cometa nos reveló datos muy distintos a los obtenidos tras el tratamiento de las células TG con RAP: el 77.5% de células de la población cuantificada tenían menos del 10% de daño en su DNA, 11.25 % con daño correspondiente a las clases 2, 3 y 4 y el resto con más del 50 % de daño en la cola (clases 5 a 7) (figura 11).

Podemos observar que el número de células TG aparentemente no dañadas o con daño mínimo no es modificado por el tratamiento continuo con cisplatino a la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ que, como se ha indicado, tiene sobre la cinética de proliferación unos efectos similares a los del RAP 100 $\mu\text{g/ml}$.

Con el doble objeto de poner a punto esta técnica en nuestro laboratorio y, al mismo tiempo, estudiar el posible daño producido por el tratamiento con el complejo RAP sobre células normales, elegimos los linfocitos humanos por la facilidad de cultivo y por su sensibilidad frente a agentes de muy diversa naturaleza capaces de provocar daño en el DNA. Las figuras 12.A y 12.B muestran la distribución del daño en el DNA de linfocitos humanos, el control presentó más del 90% de células sin daño aparente (figura 12.A); los linfocitos tratados presentaron aproximadamente un 78% de células con daño superior al 50 % y sólo

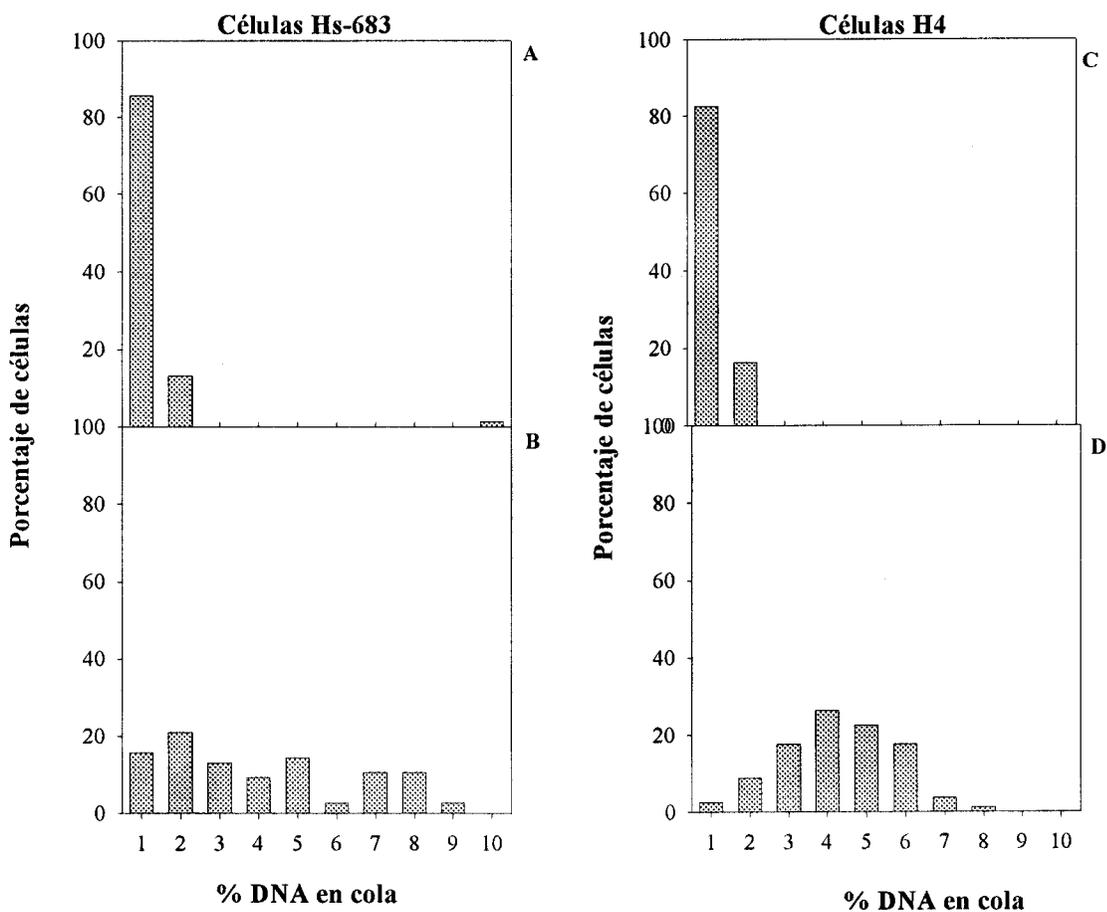


Figura 10. Distribución del daño celular en líneas celulares humanas en el ensayo del cometa. Células Hs-683 controles (A) y tratadas con RAP durante 3 días (B). Células H4 controles (C) y tratadas con RAP durante 3 días (D).

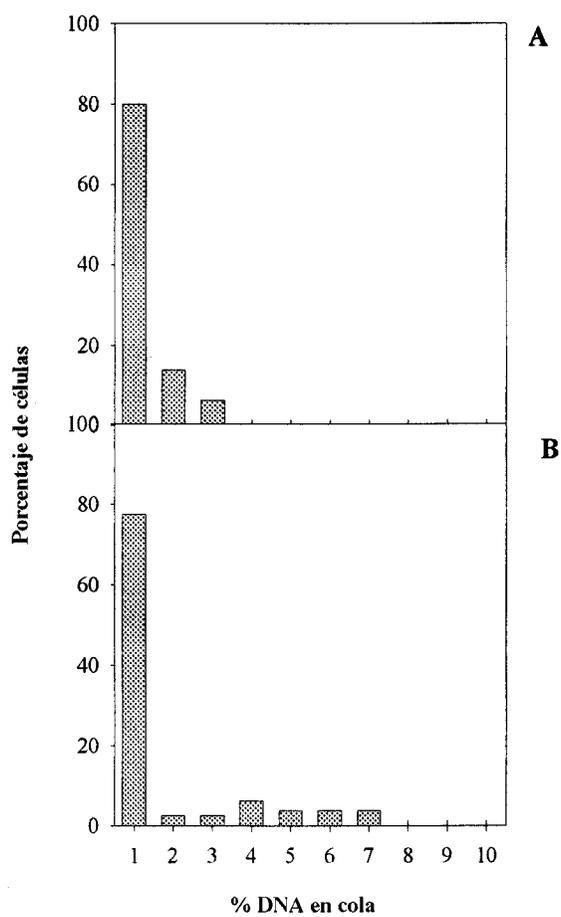


Figura 11. Distribución del daño celular en líneas celulares humanas en el ensayo cometa. Células TG control (A) y tratadas con cisplatino durante 7 días (B).

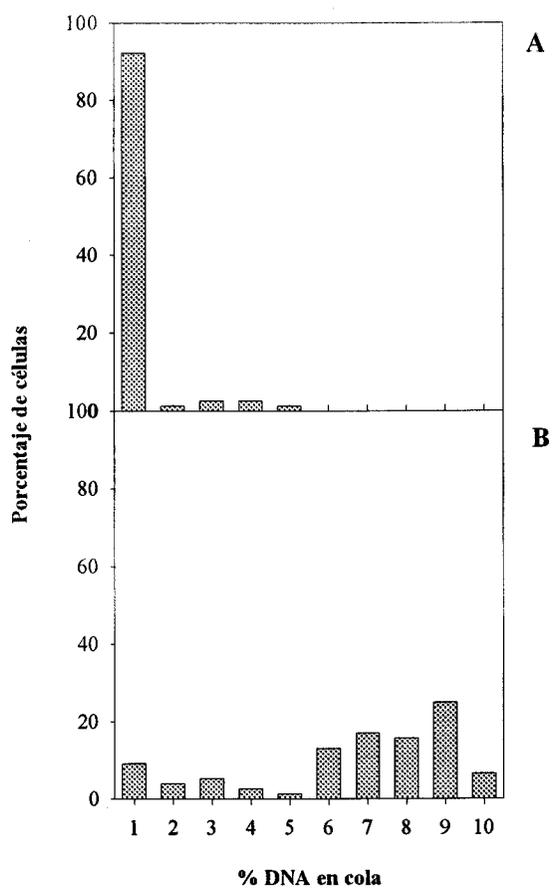


figura 12. Distribución del daño celular en linfocitos humanos en el ensayo cometa. Células controles (A) y células tratadas con RAP durante 4 días (B).

un 9% de células con daño mínimo o no dañadas (figura 12.B).

5-Modificación del patrón de proteínas generales

Los datos obtenidos con la curva de crecimiento de las células TG controles y las tratadas con RAP muestran una clara diferencia en el comportamiento de estas células en presencia del complejo inorgánico. Esta observación nos sugirió la posible existencia de alteraciones en el patrón de proteínas totales de las células como consecuencia del tratamiento, determinándose por la cuantificación de intensidad de tinción con plata en las distintas bandas encontradas tras realizar la electroforesis.

El estudio se inició con la extracción de proteínas totales de células TG (7×10^6 células) tras 7 días de tratamiento. Las bandas visualizadas tras la electroforesis y la tinción con nitrato de plata fueron analizadas y cuantificadas. A primera vista, en los geles teñidos no apareció ninguna diferencia en la expresión de las proteínas totales de los extractos celulares de células TG; aparentemente, el RAP no provocó la represión de las proteínas existentes en los extractos controles. Analizando los perfiles de las bandas de proteínas de los extractos totales control y problema, observamos diferencias cuantitativas (figura 13). Las proteínas con peso molecular bajo a medio se encuentran en menor cantidad en las células tratadas, y por el contrario, las proteínas con peso molecular alto se hallan en mayor cantidad en las mismas células al compararlas con células controles.

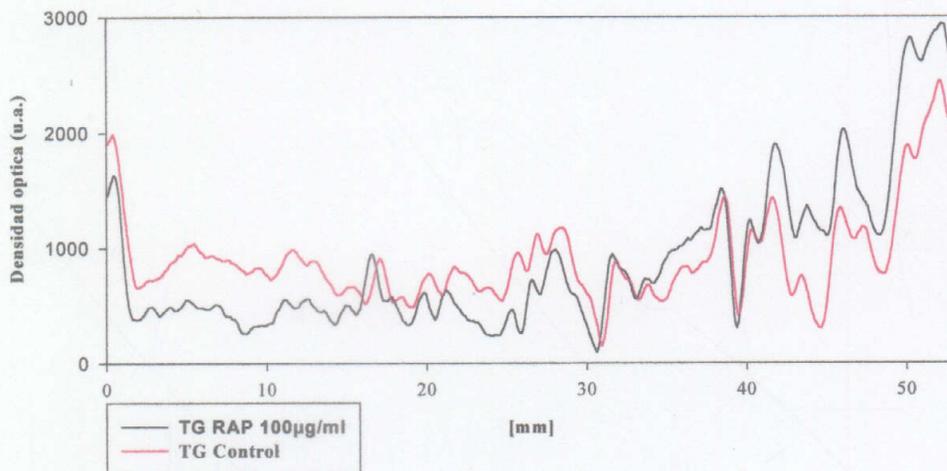


Figura 13. Perfiles de proteínas generales en células TG. Extractos de proteínas totales de células TG (7×10^6 células) controles y tratadas con RAP durante 7 días. Las proteínas totales de los extractos fueron resuspendidas en tampón para muestras de electroforesis y analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE. Las bandas visualizadas fueron escaneadas y cuantificadas.

6-Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa

En nuestro trabajo, hemos utilizado dos proteínas nucleolares directamente implicadas en la transcripción y maduración del RNA ribosómico como patrón para el estudio de posibles alteraciones del comportamiento celular.

La primera proteína ensayada fue la NOR-90/hUBF correspondiente al factor de transcripción nucleolar hUBF que se une al gen promotor del RNAr e inicia la actividad transcripcional de la RNA polimerasa I; esta proteína se encuentra en dos isoformas UBF₁ y UBF₂ de 97 kDa y 94 kDa respectivamente (Jantzen et al. 1990), las dos isoformas presentan una afinidad diferente a unirse al gen promotor ribosomal (Kuhn et al. 1994).

La segunda proteína utilizada fue la fibrilarina de 34 kDa, que es una de las proteínas más abundantes en el componente fibrilar denso; esta proteína está involucrada en el procesamiento de los pre-RNAr, metilación de los RNAr y ensamblaje ribosomal (Tollervey et al. 1993).

En el caso de la NOR-90/hUBF inmunodetectada mediante electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa e incubación con anticuerpos policlonales anti-NOR-90, después de revelar las membranas aparecieron las dos bandas correspondientes a las dos isoformas del factor de transcripción hUBF. Como puede observarse en la figura 14.a, la densidad de las bandas visualizadas en el carril correspondiente a las proteínas de los extractos celulares tratados con el complejo inorgánico se ve más intensa comparándolas con el carril del control.

En el caso de la fibrilarina inmunodetectada por incubación con anticuerpos monoclonales anti-fibrilarina de ratón, la banda de 34 kDa en el carril correspondiente a las proteínas de los extractos celulares tratados con RAP presentó menos intensidad a compararla con el carril control (figura 14.b). Como se pudo comprobar ambas proteínas presentaron un comportamiento contrario frente al mismo tratamiento.

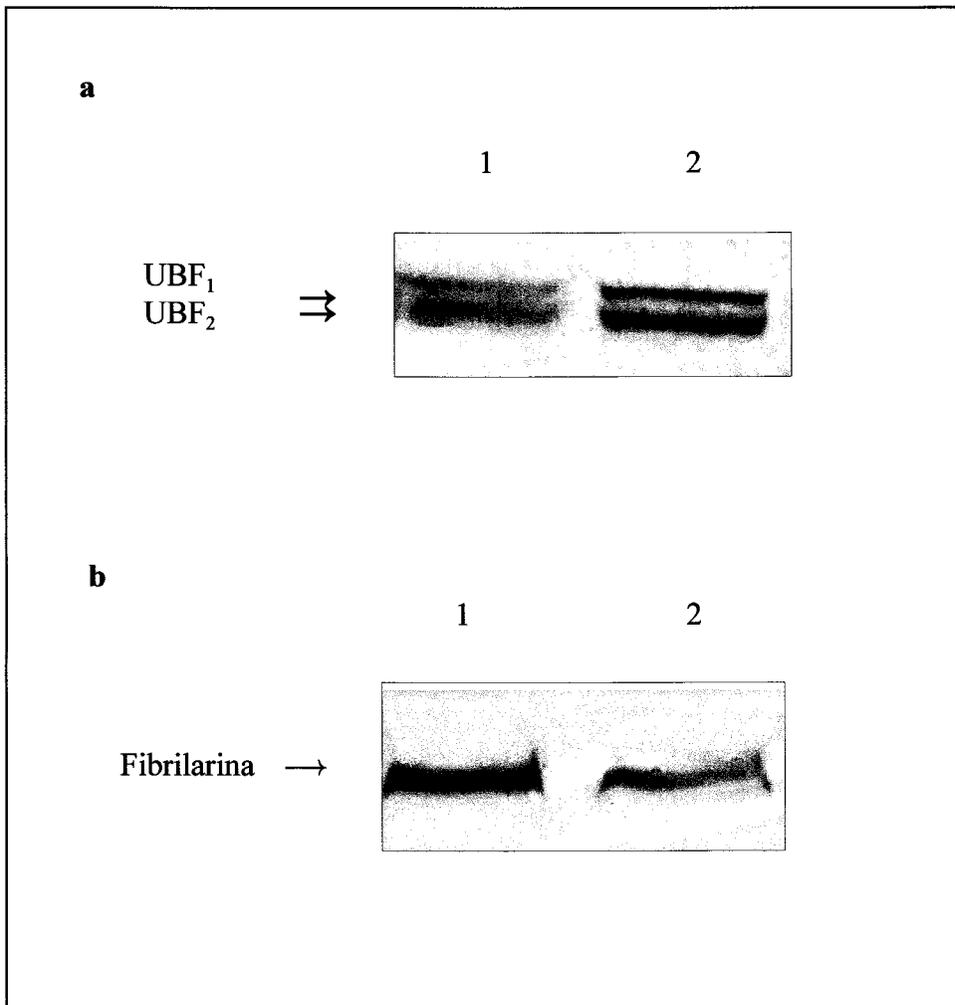


Figura 14. Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en extractos totales de células TG. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-NOR-90/UBF (a) y anti- fibrilarina (b) La unión de estos anticuerpos a las muestras fue detectada mediante anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina. Los carriles 1 y 2 corresponden respectivamente a los extractos de células TG controles y tratados con RAP durante 7 días.

7-Inmunoprecipitación

La técnica de detección de proteínas nucleolares mediante incubación con anticuerpos y revelado con fosfatasa alcalina nos proporcionó datos sobre las posibles modificaciones a nivel molecular de las células TG tras su tratamiento con RAP.

Basándonos en estos resultados, llevamos a cabo la técnica para inmunoprecipitar estas dos proteínas nucleolares marcándolas con un precursor radioactivo metionina-cisteína-³⁵S.

Los resultados obtenidos tras la inmunoprecipitación de estas dos proteínas confirman los de la inmunodetección en membranas de nitrocelulosa; las dos bandas correspondientes al factor de transcripción (UBF₁-UBF₂) se ven más intensas en extractos de células TG tratadas. Las dos isoformas se expresan en cantidad superior en extractos de células tratadas al compararlas con extractos de células controles (figura 15.a). Presumiblemente, ante estos resultados, podemos decir que las células TG tratadas con RAP incrementan su contenido en este factor de transcripción al DNA.

Por el contrario, la banda visualizada a 34 kDa corresponde a la fibrilarina; esta proteína, como se presumía tras la electrotransferencia, se inmunoprecipitó menos en extractos de células TG tratadas que en células controles (figura 15.b).

La tabla 3 reúne las densidades ópticas de las bandas correspondientes a las proteínas NOR-90/hUBF y fibrilarina.

	Control	Tratado
UBF ₁	20022	72438
UBF ₂	16231	27672
Fibrilarina	11113	7436

Tabla 3. Densidad Óptica de las bandas correspondientes a las dos isoformas del factor de transcripción hUBF y de la fibrilarina. Las proteínas procedentes de células TG fueron inmunoprecipitadas y analizadas mediante electroforesis, las bandas visualizadas en los geles fueron cuantificadas.

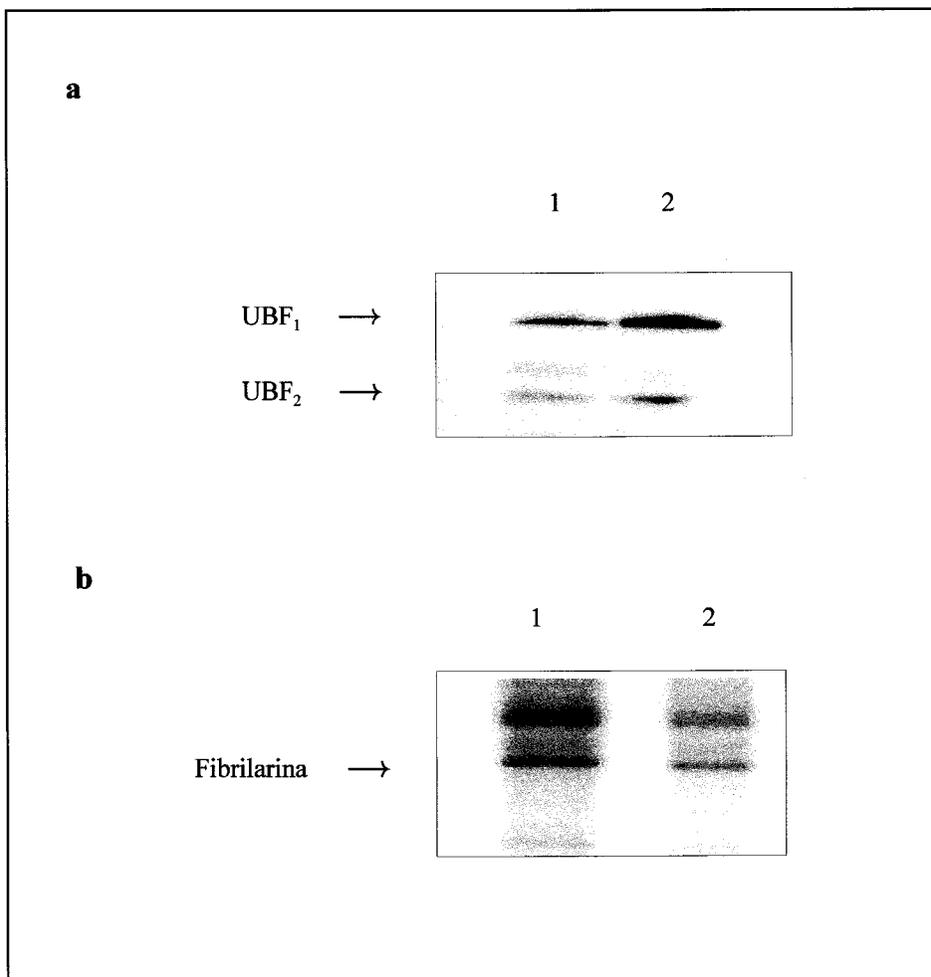


Figura 15. Inmunoprecipitación del factor de transcripción hUBF y de la fibrilarina a partir de células TG.

Las células fueron tratadas con RAP durante 7 días y luego se incubaron con metionina-cisteína marcadas con ³⁵S; los lisados celulares fueron inmunoprecipitados y sometidos a electroforesis en SDS-PAGE.

a. Inmunoprecipitación del hUBF, **a.** Inmunoprecipitación de la fibrilarina.

Células TG controles (1) y tratadas con RAP (2).

8-Estudio de proteínas nucleolares mediante técnicas inmunocitoquímicas

La observación a microscopía electrónica de los nucleolos de células TG nos permitió comparar la morfología compacta de los mismos. La distribución del componente fibrilar se establece en centros fibrilares rodeados por el componente fibrilar denso. Estos dos subcompartimentos de apariencia finamente granulosa queden embebidos en el componente granular (figura 16)

Estudios de microscopía electrónica localizaron el inmunomarcaje con el suero anti-NOR en los centros fibrilares y en el componente fibrilar denso de nucleolos de células HeLa (Rendón et al. 1992) donde tiene lugar la transcripción del RNAr (Jordan 1991). La fibrilarina se detectó en el componente fibrilar denso mediante estudios inmunocitoquímicos con sueros anti-fibrilarina (Ochs y Smetana 1991) (figura 17).

La figura 18 y la tabla 4 muestran los datos obtenidos tras cuantificar la inmunodetección con el suero anti-NOR en distintos subcompartimentos nucleares de células TG control y tratadas con RAP 100 µg/ml durante 7 días desde su inicio.

Los resultados obtenidos sobre células TG control muestran, de forma similar a lo establecido para otros tipos celulares (Rendón et al. 1992, Rodrigo et al. 1994), que el factor UBF se inmunolocalizó con el suero anti-NOR preferentemente en los centros fibrilares y en el componente fibrilar denso. Tanto en el componente granular como en el nucleoplasma, su localización es muchísimo menor.

En las células tratadas con RAP se sigue manteniendo una distribución similar. Sin embargo, resulta llamativo el incremento, en unas 3.5 veces, de la cantidad de UBF localizado en el nucleoplasma, en relación a los correspondientes valores de los controles. Estos datos son, en principio, coherentes, con los resultados obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación.

Para la otra proteína nucleolar localizada, la fibrilarina, nuestros resultados confirman que esta proteína, aún siendo una proteína fundamental en el nucleolo, no se encuentra estrictamente localizada dentro de sus límites (Raska 1991). Así se localiza escasamente en los centros fibrilares y fundamentalmente en los componentes fibrilar denso y granular, siendo apreciable igualmente su localización extranucleolar.

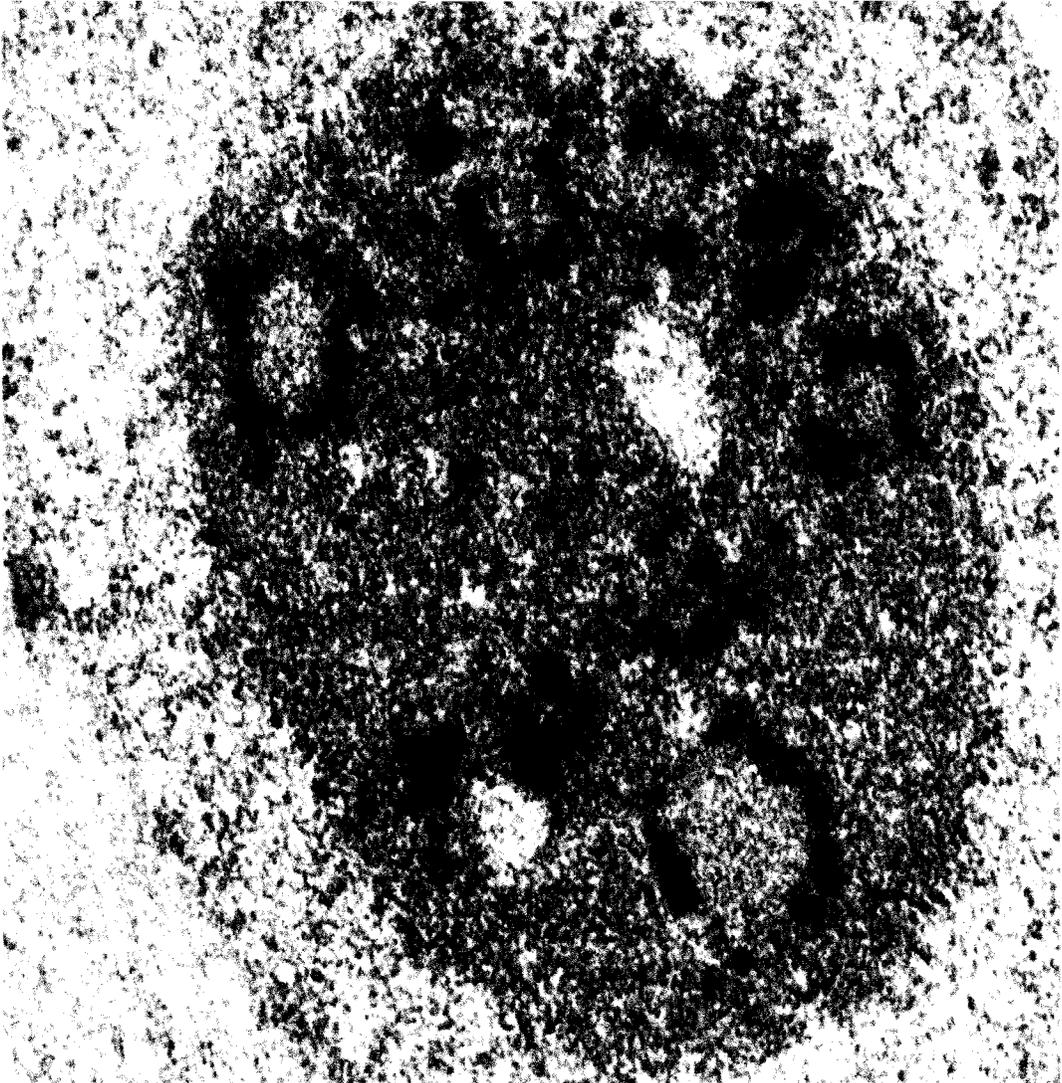
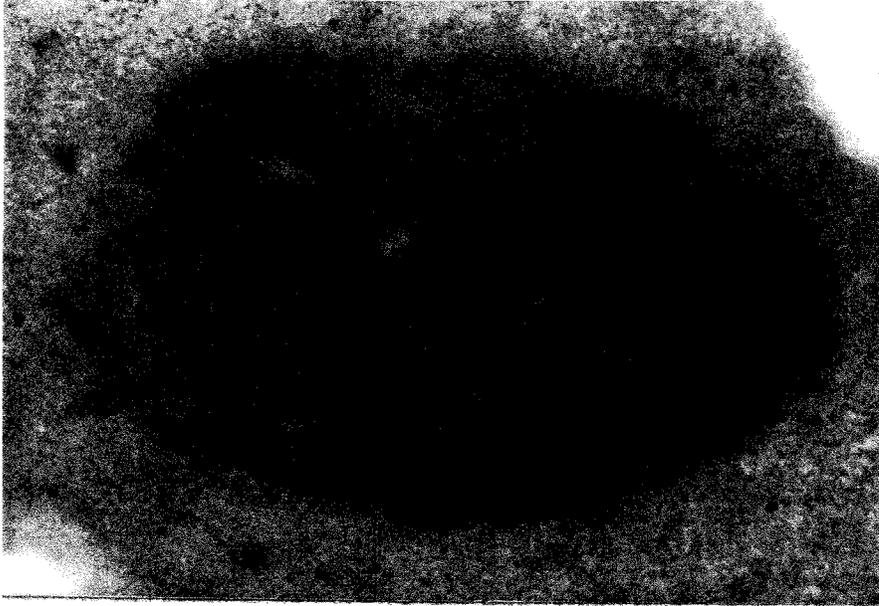


Figura 16. Nucleolo compacto de células TG. Notese los centros fibrilares, el componente fibrilar denso y el componente granular (15.500 x).

A



B

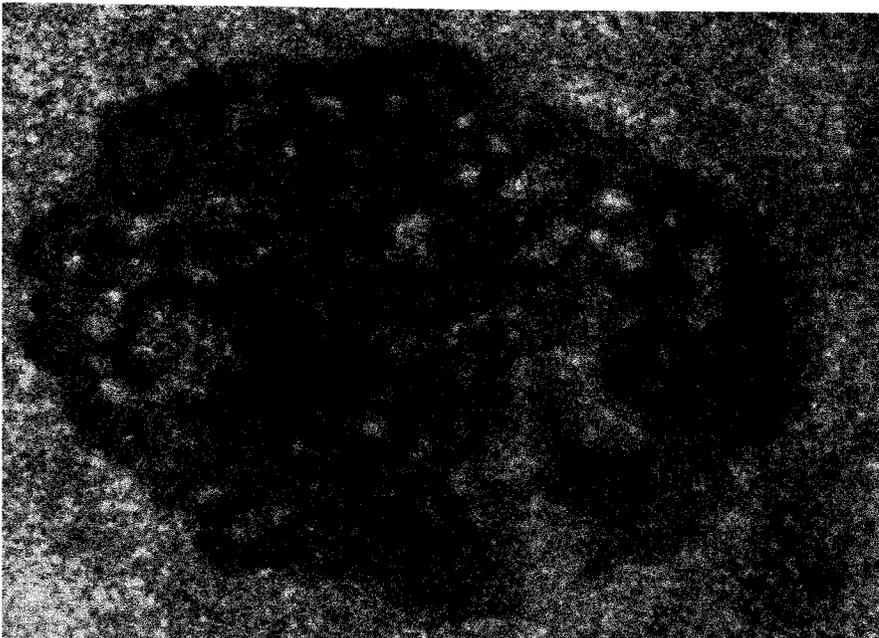


Figura 17. Inmunolocalización y distribución de partículas de oro coloidal en los diferentes compartimentos nucleolares sobre secciones finas incluidas en Lowicryl K 4M de células TG.

A. Marcaje con el suero anti-NOR-90 sobre los centros fibrilares y componente fibrilar denso (15.500 x).

B. Marcaje con anticuerpos anti-fibrilarina sobre el componente fibrilar (15.500 x).

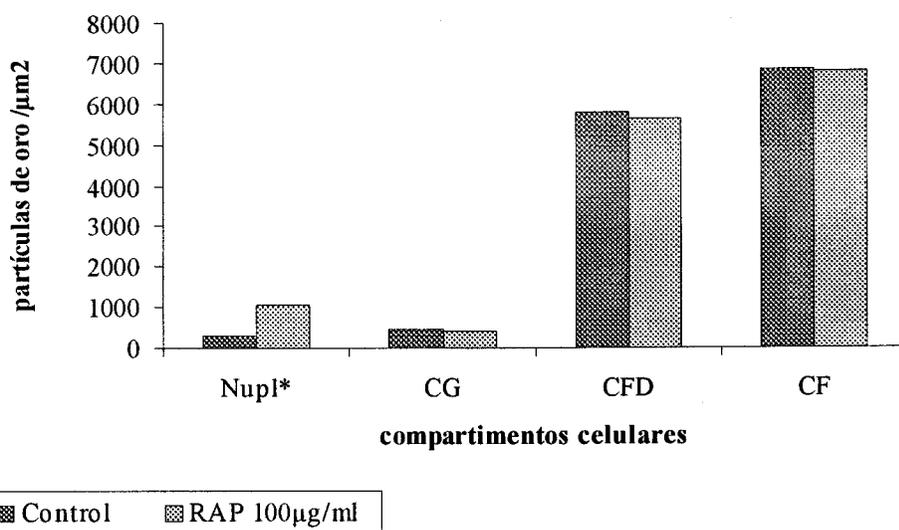


Figura 18. Cuantificación del marcaje inmunocitoquímico para la detección de la NOR-90/hUBF expresado como densidad de oro coloidal (partículas / μm^2) en Nucleoplasma (Nupl), Componente Granular (CG), Componente Fibrilar Denso (CFD) y Centros Fibrilares (CF) sobre secciones de células TG control (barras densas) y tratadas con RAP (barras claras).

* Diferencia significativa a $P < 0.01$.

Compartimentos nucleares	Control	RAP 100µg/ml
Nucleoplasma	284 ± 12.15	1054 ± 162.10*
Componente Granular	446 ± 16.21	405 ± 81.05
Componente Fibrilar Denso	5795 ± 486.30	5633 ± 607.87
Centros Fibrilares	6849 ± 932.07	6808 ± 648.40

Tabla 4. Distribución de la NOR-90/hUBF según los compartimentos nucleares en células TG (en partículas de oro / μm^2).

Media ± Error estandar de la media.



La figura 19 y la tabla 5 muestran comparativamente los resultados obtenidos tras cuantificar la inmunolocalización de la fibrilarina en células controles y tratadas con RAP. Estos datos muestran una disminución significativa en su localización en los centros fibrilares y nucleoplasma, manteniéndose muy parecidos los valores hallados sobre los otros dos componentes nucleolares.

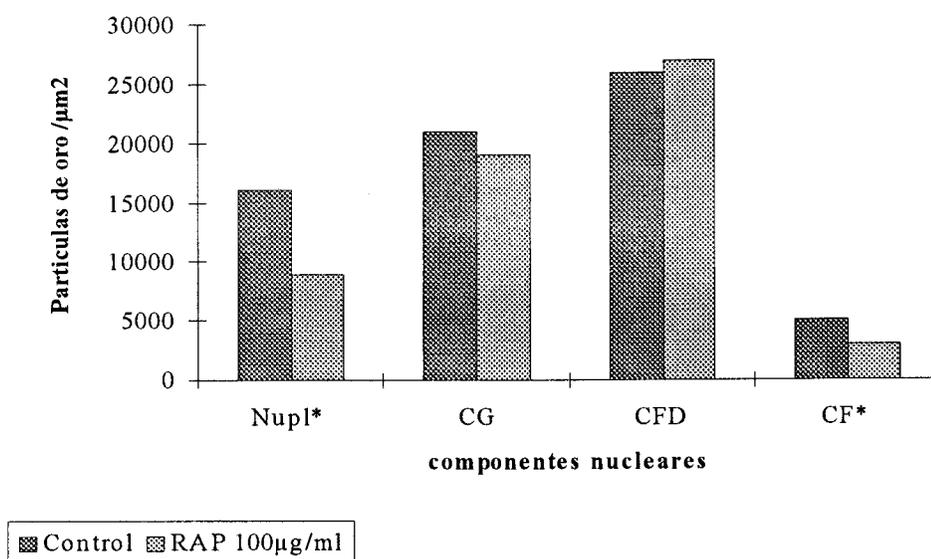


Figura 19. Cuantificación del marcaje inmunocitoquímico para la detección de la fibrilarina expresado como densidad de oro coloidal (partículas / μm^2) en Nucleoplasma (Nupl), Componente Granular (CG), Componente Fibrilar Denso (CFD) y Centros Fibrilares (CF) sobre secciones de células TG control (barras densas) y tratadas con RAP (barras claras).

* Diferencia significativa a $P < 0.01$.

Componentes nucleares	Control	RAP 100µg/ml
Nucleoplasma	16000 ± 300	9000 ± 426*
Componente Granular	21000 ± 825	19000 ± 672
Componente Fibrilar Denso	26000 ± 104	27000 ± 970
Centros Fibrilares	5000 ± 402	3000 ± 274*

Tabla 5. Distribución de la fibrilarina según los compartimentos nucleares en células TG (en partículas de oro / μm^2).

Media ± Error estandar de la media.

DISCUSIÓN

En el desarrollo experimental anteriormente descrito se ha realizado un estudio sobre los efectos que, sobre distintas líneas celulares en cultivo, tienen complejos bioinorgánicos de nueva síntesis, caracterizados por poseer un átomo de Rutenio como núcleo metálico.

Este trabajo forma parte de un proyecto multidisciplinar que intenta la síntesis, caracterización y evaluación de nuevos compuestos que, con actividad antitumoral, pudieran ser considerados como propuestas alternativas al cisplatino en las estrategias terapéuticas relacionadas con el tratamiento de tumores sólidos, conjugando una buena actividad citotóxica con una menor toxicidad colateral. Este contexto justifica que, a lo largo de este apartado, se realicen frecuentes referencias a los datos previos disponibles en relación con las propiedades del cisplatino, tanto en su vertiente fundamental de interacción con el DNA como en relación con sus efectos a nivel celular.

Efectivamente, con los primeros resultados obtenidos en relación con la utilización del cisplatino en terapia antitumoral, este complejo mostró efectos muy significativos e incluso relativamente mejores que los de otros compuestos químicos disponibles en el momento (Prestayko et al. 1980, Yarbrow et al. 1989). Por el contrario, el estereoisómero de este complejo de coordinación, el transplatino, no mostró propiedades comparables.

Sin embargo, en quimioterapia clínica, el cisplatino presentó efectos secundarios severos (Prestayko et al. 1980) tales como ototoxicidad, neurotoxicidad, vómitos, náuseas (Talley et al. 1973) acompañados de una toxicidad renal importante como consecuencia indeseable más general en los enfermos tratados. Este último efecto lateral puede deberse muy probablemente al hecho de que la principal ruta de eliminación del cisplatino es vía riñón, demostrándose su acumulación en el cortex renal. Tras la administración del cisplatino aparecen cambios degenerativos en túbulo proximales (con vacuolización citoplásmica intensa), dilatación tubular y degeneraciones picnóticas e hidrópicas (Fillastre y Raguenez-Viotte 1989). El mecanismo molecular de la nefrotoxicidad debida al cisplatino aún está por ser establecido claramente. En este sentido, los efectos del cisplatino sobre la función y estructura del riñón están relacionados con un incremento de la producción de radicales libres, al menos parcialmente, debidos al incremento en la presencia de hierro con actividad catalítica (Baliga et al. 1998).

En todo caso, existe un generalizado consenso en atribuir los efectos citotóxicos del cisplatino, fundamentalmente, a los considerables daños derivados de su interacción con el DNA celular, expresada por la formación de aductos DNA-cisplatino estabilizados por enlaces inter e intracatenarios (Pinto y Lippard 1985) y a las alteraciones sobre el metabolismo celular derivadas en la existencia de dichos aductos, es decir, reparación, e, incluso, infra- o sobre-expresión génica.

Efectos del RAP sobre la proliferación de células tumorales cultivadas

Con los antecedentes citados anteriormente, hemos realizado un primer estudio sobre los efectos que un complejo de nueva síntesis, el RAP (*cis*-dicloro-1,2-propilendiamino-N,N,N',N'-tetraacetato rutenio (III), $[\text{RuLCl}_2]\text{H}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, donde L = 1,2-propilendiamino-N,N,N',N'-tetraacetato o PDTA), tiene, en principio, sobre la cinética de crecimiento de poblaciones cultivadas de células tumorales, basándonos en los datos previos relativos a la interacción de este complejo de rutenio con el DNA, muy especialmente a los datos de dicroísmo circular. En este sentido el complejo metálico RAP purificado interaccionó significativamente con la doble hélice de DNA plasmídico, de tal manera que el estudio comparativo de los espectros de dicroísmo circular obtenidos del DNA solo y del RAP-DNA sugirió la quelación del ión del metal por las nucleobases apropiadas del DNA e indicó una coordinación bifuncional del ión como el modo de unión más adecuado entre el RAP y la correspondiente nucleobase (Vilaplana et al. En prensa).

Los resultados obtenidos muestran una clara interferencia del RAP con el crecimiento de la población celular en cultivo, en relación con los controles, en las dosis más altas utilizadas 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Si comparamos los resultados obtenidos con los existentes en la bibliografía utilizando el cisplatino sobre distintas líneas tumorales en cultivo, se ha citado la capacidad que tienen las células de entrar en apoptosis cuando se someten a tratamientos con dicho complejo metálico. La apoptosis inducida por el cisplatino se comparó con la debida a la carencia de suero en el medio de cultivo, encontrándose el mismo grado de citotoxicidad en condiciones de presencia y ausencia de suero más cisplatino (Kasamatsu et al. 1995). Por tanto, según estos autores, los efectos citotóxicos del cisplatino no se acoplaban con los

programas de apoptosis como para producir sinergia en la muerte celular.

Por otra parte, se han descrito distintas sensibilidades al cisplatino por parte de distintas líneas tumorales, Raaphorst et al. (1998) utilizaron cuatro líneas celulares tumorales humanas (dos líneas de carcinoma ovárico, una sensible y otra resistente al cisplatino, una línea de melanoma y otra de glioma) en relación con su capacidad para sufrir apoptosis cuando se someten a tratamiento con cisplatino o se someten a hipertermia. Los datos de estos autores indican que tanto el cisplatino como la hipertermia pueden inducir apoptosis en células tumorales, que el grado de inducción es altamente dependiente de la línea celular y que existe una correlación entre las respectivas series de resistencia a ambos tratamientos en líneas celulares emparentadas.

En nuestros experimentos se ha observado el bloqueo del crecimiento en células en cultivos tratadas con RAP 1000 $\mu\text{g/ml}$, así como figuras de muerte celular. Por otra parte, la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ tenía efectos significativos sobre la cinética de proliferación en células TG y algo menor en las otras dos líneas celulares utilizadas, sin que se produjeran fenómenos apreciables de muerte celular.

Estas observaciones nos impulsaron a elegir la menor concentración de las citadas anteriormente debido a que la alteración sin bloqueo de la proliferación y la no letalidad del tratamiento podrían permitirnos, en su caso, centrar nuestra atención en el análisis de aquellos efectos del RAP sobre el equilibrio interno celular que estuvieran más directamente derivados de la interacción entre el complejo metálico y el DNA. Ello justifica que, siendo la muerte celular, programada o no, una consecuencia indirecta de las posibles interacciones, y a pesar de la importancia y actualidad de los fenómenos de apoptosis, hemos optado por realizar las aproximaciones experimentales que siguieron en condiciones no letales.

La siguiente etapa consistió en comparar la cinética de incorporación del BrdU, como indicador de intensidad de replicación, en condiciones de control y en presencia de RAP 100 $\mu\text{g/ml}$. Existen antecedentes que incluyen datos según los cuales el cisplatino induce un cuadro de incorporación de la BrdU algo parecido al encontrado por nosotros utilizando RAP. Demarcq et al. 1992 al estudiar la incorporación del análogo bromado en células de carcinoma de pulmón tras un tratamiento con cisplatino durante 24 horas, registró un aumento significativo tanto en intensidad de incorporación como en número de células tratadas que incorporaron el análogo en relación con los controles respectivos. Este aumento

se relacionó tanto con una prolongación de la fase S debida al tratamiento con cisplatino, como con un efecto más específico sobre la última porción del período S, sugerido por una mayor acumulación de células en esta subetapa del ciclo celular.

Estos y otros resultados (Sorenson y Eastman 1988a, b) sirvieron de base para proponer que la potencial inhibición de la síntesis del DNA inducida por el cisplatino no es crítica como indicador de citotoxicidad. Dado que la acumulación de células en el período G₂, o más exactamente, en la transición G₂-Mitosis está correlacionada con la supervivencia, se propuso que dicha acumulación es un buen indicador de la citotoxicidad. Posteriormente, se propuso que las células que salen de la parada en G₂ deben progresar hasta el final del ciclo celular o provocar la apoptosis como es el caso del cisplatino, dependiendo de hasta que punto el daño se puede reparar durante esta parada (Ormerod et al. 1994, Sorenson Y Eastman 1988a, b).

Cuando hemos analizado la incorporación de BrdU sobre células TG sometidas a tratamiento continuo con RAP encontramos una modificación en la cinética de incorporación muy distinta y de tales características que difícilmente se justifica el aumento tan llamativo encontrado con un simple alargamiento del período S. Es más, la cinética de incorporación del análogo sólo difiere en los valores absolutos y en las pendientes respectivas de controles y tratados, pero los valores máximos se alcanzan en momentos similares. Ello sugiere que el alargamiento del período S, en nuestras condiciones experimentales, no parece ser muy llamativo.

En todo caso, y aunque un análisis más detallado de la alteración de los períodos del ciclo inducida por el RAP aportaría información adicional sobre sus efectos, las grandes diferencias encontradas por nosotros desde el inicio del tratamiento nos sugirió que, muy probablemente, deberían deberse fundamentalmente a incorporación del análogo asociada a reparación de daño en el DNA inducido por el complejo de rutenio.

Estimación del daño sobre el DNA inducido por complejos metálicos: ensayo cometa

Hemos aplicado la técnica de electroforesis de células aisladas, conocida por ensayo cometa, sobre las tres líneas tumorales cultivadas, TG, Hs-683 y H4, en condiciones de cultivo normal y sometidas a tratamiento continuo con RAP. En todos los casos hemos

encontrado una disminución llamativa, en relación con los controles, de las células sin daño o con daño mínimo y una aparición significativa de células con daño estimado superior al 30%.

Estos resultados muestran un cuadro inducido por el RAP de naturaleza claramente distinta al encontrado por otros autores utilizando cisplatino (Pfuhrer y Wolf 1996, Merk y Speit 1999). Estos autores encontraron que tanto el cisplatino como otros agentes capaces de inducir "crosslinking", es decir, enlaces de carácter covalente intra o intercatenarios del DNA, amortiguaban el daño aparente inducido sobre linfocitos humanos observable mediante la aplicación del ensayo cometa. Es más, los autores citados anteriormente utilizan este hecho experimentalmente probado para criticar severamente la utilización del ensayo cometa en la valoración del daño en el DNA, ya que, como se ha comentado, la acción de agentes químicos del tipo del cisplatino son capaces, aparentemente, de cancelar el daño observado con el uso de esta técnica e inducido por radiaciones, más concretamente rayos X.

Dado que los trabajos citados estaban realizados sobre células sanguíneas normales, nosotros hemos aplicado igualmente el ensayo cometa a células TG tratadas con cisplatino 2 µg/ml durante 7 días y hemos obtenido unos resultados que difieren significativamente de los obtenidos tras el tratamiento con RAP. La diferencia más llamativa es que las células tratadas con cisplatino se muestran con una cantidad de DNA en la cola del cometa menor al 10 % del total, en una proporción muy similar a los correspondientes controles.

Con el mismo razonamiento, hemos sometido linfocitos humanos, estimulados para proliferar, a tratamiento con RAP durante cuatro días. Los resultados obtenidos indican una clara inducción del daño aparente detectado por esta técnica y un cuadro distinto al encontrado por los autores citados como consecuencia de tratamiento con cisplatino.

Con todo lo anterior, la comparación entre los resultados obtenidos al aplicar este tipo de ensayo a células tratadas con RAP o con cisplatino nos sugiere fuertemente que, aún asumiendo que esta técnica no es la más adecuada para valorar el daño inducido por el cisplatino, al menos puede afirmarse que el tipo de interacción RAP-DNA debe ser distinto al correspondiente cisplatino-DNA lo cual permitiría, como es nuestro caso, la detección, tras la aplicación del ensayo cometa, del daño inducido por el RAP, lo que es más difícil para el cisplatino dada su capacidad estabilizante del DNA a través de sus enlaces cruzados intra o inter-catenarios (Lippard y Sherman 1987).

Adicionalmente, hemos realizado un estudio en relación con la recuperación del tratamiento con RAP en células TG. En las condiciones de nuestro experimento, esto es, 7 días de tratamiento continuo y dos días de recuperación sin que los cultivos llegaran a la confluencia, hemos encontrado un inicio aparente de recuperación, estimada por el significativo aunque ligero aumento de las células con daño aparente menor del 10% y la desaparición de células con daños mayores. En todo caso, la cancelación del daño no parece ser inmediata.

Está establecido que el mecanismo de unión del cisplatino al DNA es a través de la unión a dos guaninas de la misma cadena (unión intracatenaria). Este modelo ha sido fundamentalmente defendido por Lippard y su grupo (Takahara et al. 1995), sobre todo a partir de datos obtenidos estudiando por métodos cristalográficos la unión del cisplatino a un oligonucleótido sintetizado de secuencia conocida. A pesar de lo ampliamente aceptado de este modelo de unión no habría, en principio, que descartar la existencia de un cierto grado de unión intercatenaria para el cisplatino.

Está aún por establecer la naturaleza de los aductos RAP-DNA y, por consiguiente mecanismo de unión entre ambos. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que ambos interrogantes tendrán respuesta de naturaleza distinta para cada complejo metálico.

Alteraciones en el comportamiento de proteínas específicas

Un aspecto relativo a las alteraciones celulares inducidas por RAP fue el contenido de proteínas totales de la célula. Los datos previos concernientes al cisplatino eran aparentemente contradictorios. Así pues, mientras según Sorenson y Eastman (1988) concentraciones de cisplatino capaces de inducir la inhibición de la síntesis de DNA en células L1210 (leucemia mieloide en ratón) impiden también la transcripción, por el contrario, Oswald et al. (1990) proponen la coexistencia tanto de transcripción como de traducción con el bloqueo de la replicación debida al cisplatino en células BDF1 (otra línea de leucemia, esta vez linfocítica, de ratón).

En todo caso, los resultados obtenidos por nosotros tras la cuantificación de las bandas mostradas por las electroforesis de proteínas totales de células control y su comparación con las correspondientes a células tratadas con RAP muestran una modificación

llamativa en el patrón de densidades y, presumiblemente, en el contenido relativo de proteínas en cada una de las condiciones citadas. Las características de tal modificación permiten observar que, preferentemente, las células tratadas con RAP muestran un menor contenido en proteínas de bajo peso molecular y, por el contrario, una mayor abundancia de proteínas de alto peso molecular, siempre con relación a los correspondientes controles.

En relación con las modificaciones inducidas por el cisplatino relativas a proteínas específicas, está bien establecido que los aductos cisplatino-DNA son reconocidos por diversas proteínas nucleares. En principio, se demostró la unión preferente de diversas proteínas, de 26.5, 28, 90 y 97 kDa, al DNA tratado con cisplatino, mostrando el análisis de la secuencia de los extremos amino-terminales que las proteínas de 26.5 y 28 kDa eran idénticas de las de las proteínas HMG 1 y HMG 2 respectivamente (Hughes et al. 1992).

Casi al mismo tiempo, se describió la unión con alta afinidad de las proteínas HMG ("High mobility group") 1 y 2 al DNA unido a cisplatino (Billings et al. 1992), proponiéndose que determinados residuos cisteína de tales proteínas juegan un papel importante en su unión al DNA modificado. Este fenómeno se relacionó con los mecanismos de reparación de los daños inducidos por dicho agente terapéutico, así como con la resistencia que ciertas líneas celulares muestran al cisplatino ya que determinados derivados del cisplatino, como el *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂] quinoleína, son tóxicos sobre líneas tumorales resistentes al cisplatino y no inducen en sus aductos con el DNA la unión de proteínas HMG (Marples et al. 1994).

La citada unión preferente de HMG 1 y 2 al DNA cisplatinado parece fundamentarse en la afinidad de los respectivos dominios HMG de dichas proteínas a lugares del DNA con cisplatino unido (Farid et al. 1996) ya que mutaciones en dichos dominios modifican significativamente la afinidad de unión de las correspondientes proteínas.

A partir de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre modificaciones en la afinidad por el DNA cisplatinado mostrado por proteínas de levadura portadoras de dominios HMG y con función reguladora de genes específicos; se ha propuesto que la unión de proteínas con tales dominios a aductos DNA-cisplatino modifican, de manera parcial pero muy significativa, los lugares de unión de dichas proteínas al DNA. Dado que los dominios HMG son típicos de muchas proteínas de regulación génica, el cuadro descrito justifica la alteración

significativa de la expresión génica como resultado de la alteración debida a la interacción del DNA con el cisplatino (McA'Nulty et al. 1996).

En 1994, Treiber et al. añadieron el UBF, factor de transcripción de la RNA polimerasa I, a la lista de proteínas nucleolares con unión preferente al DNA unido a cisplatino. El UBF es uno de los factores de transcripción más necesitados para iniciar la acción de la RNA pol I (Imai et al. 1994), este factor se une específicamente al gen promotor del RNAr para activar la transcripción (Jantzen et al. 1990). La comparación de algunos homólogos del UBF aislados de diferentes especies de vertebrados, como el hUBF de células humanas (Bell et al. 1988, Jantzen et al. 1990, O'Mahony y Rothblum 1991), xUBF de *Xenopus laevis* (Pikaard et al. 1989), rUBF de rata (Pikaard et al. 1988, Smith et al. 1990) y el UBF purificado a partir de células de ratón (O'Mahony y Rothblum 1991, Schnapp y Grummt 1991) nos proporcionó datos importantes sobre la alta conservación de este factor de transcripción (Rodrigo et al. 1992). En los roedores, la primera isoforma del UBF, la UBF₁, es más activa transcripcionalmente que la segunda isoforma la UBF₂ (Kuhn et al. 1994).

Los anticuerpos dirigidos contra el UBF se recogieron de suero autoinmune, el suero anti-NOR, de enfermos con artritis reumatoide (Rendón et al. 1992). Se ha observado bajo condiciones de carencia en suero que la distribución subcelular del UBF cambia, desde una predominantemente nucleolar, a una distribución dispersa entre los compartimentos nucleolar, nuclear y citoplásmico. Después de establecer las condiciones de cultivo, el UBF vuelve a inmunolocalizarse en el nucleolo (Rodrigo et al. 1992).

Una de las características de este factor de transcripción es la presencia de dominios de unión al DNA (cuatro en mamíferos y tres en rana) que son homólogos a las proteínas de la familia HMG 1 y 2; el UBF necesita más de dos cajas HMG para una unión específica. La ausencia de la segunda caja en el UBF₂ parece ser responsable de la reducción del potencial activador de la transcripción manifestado por esta isoforma (Jacob 1995).

La afinidad de la NOR-90 por el DNA se modifica con el cisplatino más que con el transplatino; adicionalmente, la primera isoforma UBF₁ tiene una afinidad al DNA modificado por el cisplatino más alta comparandola con la segunda isoforma UBF₂ (Codony-Servat et al. 1996). La diferencia en la afinidad de unión existente entre estas dos isoformas

por el DNA modificado por el cisplatino se ve correlacionada por su diferente unión al gen promotor ribosomal y con sus actividades transcripcionales. En efecto, se ha demostrado que el UBF₁ tiene una afinidad alta al DNA ribosomal (DNAr) (Kuhn et al. 1994), mientras que la capacidad del UBF₂ a unirse al DNAr es baja. Por lo tanto la habilidad del DNA-cisplatino para simular las características estructurales del DNAr que determina las diferentes afinidades de las dos isoformas de la NOR-90 justifica la importancia de las alteraciones observadas. Esto indica que la NOR-90/UBF₁ es capaz de unirse al DNA cisplatinado con una afinidad superior a la de la NOR-90/UBF₂. En efecto, la localización del UBF en algunos "sitios incorrectos" puede desregular la transcripción de varios genes. Además, la unión fuerte del UBF₁ a los aductos del cisplatino puede reducir la cantidad de esta isoforma disponible para la unión al DNAr, desorganizando la síntesis del RNAr.

En este trabajo hemos realizado un estudio sobre el contenido relativo de UBF en células control y tratadas con RAP. Igualmente hemos estudiado la distribución de fibrilarina por ser una proteína fundamental en el nucleolo, al igual que el UBF, pero de naturaleza bien distinta. La fibrilarina tiene mucho menor peso molecular y, además, carece de dominios HMG.

Por otra parte, colocaliza con el UBF en el componente fibrilar denso pero, por el contrario, es muy escasa en los centros fibrilares y muy abundante en el componente granular (Rodrigo et al. 1994). Este estudio se ha realizado mediante dos aproximaciones metodológicas distintas: "Western blot" e inmunoprecipitación.

Nuestros resultados han mostrado una mayor abundancia del factor de transcripción nucleolar, es decir, del UBF en las células tratadas con RAP. El incremento es muy superior para la isoforma UBF 1 que para la UBF2, si bien, ambas aumentan claramente.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por Codony-Servat et al. (1996) quienes encuentran un incremento más llamativo de la primera isoforma como consecuencia del tratamiento con cisplatino.

Por el contrario, la cantidad de fibrilarina se vió disminuida, aparentemente, como consecuencia de la presencia del complejo de rutenio. En ambos casos hemos encontrado una mayor cantidad de dicho factor de transcripción en las células tratadas. También se registró un incremento de la unión de la primera isoforma del UBF (UBF₁ de 97 kDa) al DNA

modificado por el RAP siendo este superior al observado en la segunda isoforma (UBF₂ de 94 kDa). Estos datos se obtuvieron al comparar, tras la inmunoprecipitación con la anti-NOR/90, las intensidades de las dos bandas correspondientes a las dos isoformas del UBF en los extractos celulares de células TG. Estas modificaciones son similares a las encontradas por Codony-Servat et al. (1996), en este caso como respuesta al tratamiento con cisplatino.

Adicionalmente, hemos realizado la cuantificación de la inmunolocalización al microscopio electrónico tanto de la fibrilarina como del UBF. Para la fibrilarina no hemos encontrado diferencias significativas en el número de partículas de oro entre células controles y tratadas en los compartimentos correspondientes a los componentes fibrilar denso y granular. Por el contrario, observamos una disminución del número de partículas de oro en los centros fibrilares y nucleoplasma de las células tratadas.

Por otro lado, al aplicar antisueros anti-hUBF, apreciamos un aumento significativo de la inmunoreacción sobre el nucleoplasma en células tratadas, no modificándose los valores para los otros compartimentos estudiados como consecuencia del tratamiento con RAP.

Estos resultados sugieren que mientras que la fibrilarina, que no contiene dominios HMG, puede disminuir su presencia en algunos componentes nucleares en condiciones de alteración no letal inducida por el RAP; el UBF, por el contrario, se muestra más abundante en el nucleoplasma, debida, fundamentalmente, a un incremento de la afinidad de hUBF por la cromatina no nucleolar como consecuencia de las modificaciones inducidas en el DNA por su unión con el RAP.

Los datos de dicroísmo circular anteriormente citados en relación con las modificaciones inducidas en el DNA por su unión con el RAP muestran una alteración llamativa de sus propiedades fisicoquímicas. Estos cambios podrían, al menos parcialmente, justificar el incremento en la afinidad, para diversas proteínas, mediante el papel que los aductos DNA-RAP podrían jugar como “trampas moleculares” para proteínas con afinidad por secuencias específicas. Particularmente, el UBF, que en condiciones normales tiene una afinidad natural por secuencias reguladoras de los cistrones nucleolares, manifiesta adicionalmente tendencia a unirse al DNA no nucleolar unido al RAP.

Por tanto, asumiendo el modelo propuesto por McA'Nulty et al. (1996), debería esperarse una modificación en la función del nucleolo, es decir, en la síntesis de ribosomas, como consecuencia de la acción del RAP. Para el caso del cisplatino, Jordan y Carmo-Fonseca (1998) han demostrado, en células HeLa, la existencia de un bloqueo en la síntesis de RNA ribosómico, así como una redistribución del UBF similar a la observada tras la inhibición de la síntesis de RNAr. Esta inhibición de la transcripción nucleolar debida al secuestro del UBF es también causada por complejos de platino distintos del cisplatino, tales como el oxaliplatino (Zhai et al.1998).

En nuestras condiciones experimentales puede encontrarse algo más que una mera redistribución del UBF en el interior del núcleo. Efectivamente, nuestros datos muestran que no existe diferencia significativa entre las condiciones de control y de tratamiento con RAP en relación con la cuantificación de la inmunolocalización del UBF en los diversos compartimentos nucleolares mientras que se puede encontrar un claro aumento de la presencia de dicho factor de transcripción nucleolar sobre la cromatina no nucleolar. Adicionalmente, los datos obtenidos por inmunoprecipitación y por "Western Blot" indican una mayor abundancia del UBF en las células tratadas con RAP.

Estos datos pueden ser, al menos en parte, debidos a las propias condiciones de nuestros experimentos. Hay que tener en cuenta que, como se comentó al principio, la dosis de RAP utilizada no ha implicado efectos letales para las células tratadas. Ello implica que, en estas condiciones y en el caso esperable de que los aductos DNA-RAP puedan cumplir un papel de trampas moleculares para el UBF, la menor disponibilidad de este factor de transcripción pueda ser detectada por los componentes reguladores del gen o de los genes que lo codifican, pudiendo incrementarse su síntesis y, por tanto, su abundancia relativa.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. El RAP es un complejo metálico de nueva síntesis que se incorpora fácilmente en células humanas.
2. La unión del RAP al DNA provoca el inicio de una serie de acontecimientos en los cuales podría estar implicada en gran medida la maquinaria de reparación.
3. La naturaleza de los aductos RAP-DNA, aún por establecerse, ha de carecer de los efectos estabilizadores sobre el DNA propios del cisplatino.
4. El RAP, en condiciones no letales, induce modificaciones en el patrón proteico general de la célula provocando un incremento preferencial en proteínas de alto peso molecular y una disminución correspondiente en las de bajo peso molecular.
5. Los aductos RAP-DNA tienen en común con los aductos cisplatino-DNA en que actúan como trampas moleculares para el factor de transcripción hUBF, provocando una unión ectópica del mismo. Ello debe implicar una menor disponibilidad del UBF a corto plazo, un incremento de la expresión de los genes correspondientes y una mayor abundancia en mismo como consecuencia final en condiciones no letales.

BIBLIOGRAFIJA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D. (1996): *En: Biología molecular de la célula* (3ª ed.), Iomega, S. A. Barcelona. ISBN 84-282-1011-X.
- Alessio E., Attia W. M., Calligaris M., Cauci S., Dolzani L., Mestroni G., Monti-Bragadin C., Nardin G., Quadrifoglio F., Sava G., Tamaro M. y Zorzet S. (1988): "Metal complexes of platinum group: the promising anti-tumor features of *cis*-dichloroterakis (dimethylsulphoxide)Ru(II) *cis*-RuCl₂(MeSO)₄ and related complexes". *En: Nicolini M. (ed.), platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*. Boston, Nijhoff M., pp. 617-633.
- Altmann G. G. y Leblon C. P. (1982): "Changes in the size and structure of the nucleolus of columnar cells during their migration from crypt base to villus top in rat jejunum". *J. Cell Sci.* 56, 83-99.
- Antenuis A., Pouchelet M. y Gansmuller A. (1979): "Organization of nucleolar DNA in resting lymphocytes as revealed by the diaminobenzidine technique". *J. Ultrastr. Res.* 69, 22-27.
- Aris J. P. y Blobel G. (1991): "cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 931-945.
- Bachellerie J. P., Amalric F., Nicoloso M., Zalta J. P. y Simard R. (1977): "Nucleolar chromatin in mammalian cells. I. An *in vitro* dissociation system of isolated nucleoli. A biochemical and ultrastructural study". *Biol. Cell.* 28, 1-8.
- Baliga R., Zhang Z., Baliga M., Ueda N. y Shah S. V. (1998): "*In vitro* and *in vivo* evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity". *Kidney Int.* 53, 394-401.
- Bancroft D. P., Lepre C. A. y Lippard S. J. (1990): "¹⁹⁵PT NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA". *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6860-6871.
- Barry M. A., Behnke C. A. y Eastman A. (1990): "Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, others anticancer drugs, toxins and hyperthermia". *Biochem. Pharmacol.* 40, 2353-2362.
- Barton J. K. y Lolis E. (1985): "Chiral discrimination in the covalent binding of bis (phenantroline) dichlororuthenium (II) to B-DNA". *J. Am. Chem. Soc.* 107, 708-709.

- Bell S. P., Learned R. M., Jantzen H. M. y Tjian R. (1988): "Functional cooperativity between transcription factors UBF₁ and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis". *Science*. 241, 1192-1197.
- Bellon S. F., Coleman J. H. y Lippard S. J. (1991): "DNA unwinding produced by site specific intrastrand cross-links of the antitumor drug *cis*-[Pt(NH₃)₂(N₃-cytosine)Cl]⁺". *Biochemistry*. 30, 8026-8035.
- Belluco U. (1974): "Organometallic and coordination chemistry of Platinum". Academic Press. (London).
- Bergerat J. P., Barbologie B., Gohde W., Johnson D. A. y Drewinko B. (1979): "In vitro cytotoxicity response of colon cancer cells to *cis*-dichloroammineplatinum". *Cancer Res*. 39, 4356-4363.
- Bernhard W. (1966): "Ultrastructural aspect of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells". *National Cancer Institute Monograph*. 23, 913-938.
- Bernhard W. (1971): "Drug-induced changes in the interphase nucleus". In Ceccarelli, *Advances in cytopharmacology*. 1, 49-67, (Raven Press, NY).
- Bertaux O., Moyne G., Lafarge-Frayssinet C. H. y Valencia R. (1978): "The nucleus of Euglena. II. Ultrastructural modifications of the nucleus of B12-deprived *Euglena gracilis* Z". *J. Ultrastruct. Res*. 62, 251-262.
- Biggiorera M., Fakan S., Kaufmann S. H., Black A., Schaper J. H. y Busch H. (1989): "Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus". *Histochem. Cytochem*. 37, 1371-1374.
- Billings P. C., Davis R. J., Engelsberg B. N., Skov K. A. y Hughes E. N. (1992): "Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA". *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 188, 1286-1294.
- Borer R. A., Lehner C. F., Eppenberger H. M. y Nigg E. A. O. (1989): "Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm". *Cell*. 56, 379-390.
- Bouche G., Caizergues-Ferrer M., Bugler B. y Amalric F. (1984): "Interrelations between the maturation of the 100 kDa nucleolar protein and pre-rRNA synthesis in CHO cells". *Nucleic Acids Res*. 12, 3025-3035.

- Bouteille M., Hernandez-Verdun D., Dupuy-Coin A. M. y Bourgeois C. A. (1982), "Nucleoli and nucleolar-related structures in normal, infected and drug-treated cells". *En: Jordan, Cullis, The Nucleolus*. 179-211. (Cambridge University Press, London).
- Brabec V. y Leng M. (1993): "DNA interstrand cross-links of *trans*-diamminedichloroplatinum (II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5345-5349.
- Brabec V., Sip M. y Leng M. (1993): "DNA conformational change produced by the site-specific interstrand cross-link of *trans*-diamminedichloroplatinum (II)". *Biochemistry*. 32, 11676-11681.
- Bruhn S. L., Toney J. H. y Lippard S. J. (1990): *Prog. Inorg. Chem.* 38, 477-516.
- Bugler B., Bourbon H. M., Lapeyre B., Wallace M., Chang J. H., Amalric F. y Olson M. O. J. (1987): "RNA binding fragments from nucleolin contain the ribonucleoprotein consensus sequence". *J. Biol. Chem.* 262, 10922-10925.
- Busch H. y Smetana K. (1970): "The nucleolus". *Academic Press, New York*. pp. 1-626.
- Busch R. K., Chan P. K. y Busch H. (1984): "Actinomycin D inhibition of monoclonal antibody binding to nucleolar phosphoprotein 37/5.2 (B23)". *Life Science*. 35, 1785-1794.
- Butour J. L. y Johnson N. P. (1986): "Chemical reactivity of monofunctional Platinum-DNA adducts". *Biochemistry*. 25, 4534-4539.
- Buttgereit D., Pflugfelder G. y Grummt I. (1985): "Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA)". *Nucleic Acids Res.* 13, 8165-8180.
- Carmo-Fonseca M., Tollervey D., Pepperkok R., Barabino S. M. L., Merder A., Brunner C., Zamore P. D., Green M. R., Hurt E. y Lamond A. I. (1991): "Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery". *EMBO J.* 10, 195-206.
- Causi S., Alessio E., Mestroni G. y Quadrifoglio F. (1987): "Reactions of *cis*-Ru(DMSO)₄Cl₂ with DNA and with some of its bases in aqueous solution". *Inorg. Chem. Acta*. 137, 19-24.

- Chan E. K. L., Imai H., Hamel J. C. y Tan E. M. (1991):** "Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor UBF. Molecular identity of nucleolus organizing region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor". *J. Exp. Med.* 174, 1239-1244.
- Chan P. K. L., Skov K. A., James B. R. y Farrel N. P. (1986):** "Chromosome-damaging activity of a ruthenium radio-sensitized, $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_2(4\text{-nitroimidazole})_2$, in chinese hamster ovary cells *in vitro*". *Chem. Biol. Interact.* 59, 247-254.
- Chrisensen M. E., Beyer A. L., Walker B. y Le Sturgeon W. M. (1977):** "Identification of NG, NG-dimethylarginine in a nuclear protein from the lower eucaryote *Physarum polycephalum* homologous to the major proteins of mammalian 40S ribonucleoprotein particles". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 621-629.
- Chu G. (1994):** "Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair". *J. Biol. Chem.* 269, 787-790.
- Chu G. y Chang E. (1988):** "Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nucleolar factor that binds to damaged DNA". *Science.* 242, 564-567.
- Chu G. y Chang E. (1990):** "Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3324-3327.
- Clarke M. J. (1993):** *En: Metal Complexes in Cancer Chemotherapy.* (Keppler B. K. Ed.), p 129, VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, and VCH Publishers, New York.
- Clarke M. J., Galang R. D., Rodríguez V. M., Kumar R., Pell S. y Bryan D. M. (1988):** "Chemical consideration in the design of ruthenium anticancer agents". *En: Nicolini M. (ed.), platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy.* Boston, Nijhoff M., pp. 582-600.
- Clarke M. J. y Buchbinder M. (1988):** "Binding of pentaammineruthenium (III) to double helical and single-stranded DNA". *Inorg. Chem. Acta* 27, L87-L88.
- Clarke M. J. (1979):** "Oncologic implications of the chemistry of ruthenium". *En: Metal Ions in Biological Systems.* Sigel H. ed., Marcel Dekker., NY, 11, pp. 231-283.
- Clarke M. J. (1983):** *En: Platinum, gold and other metal chemotherapeutic agents,* Lippard S. J. (ed.) Washington: ACS Symp. Ser. pp. 335-352.

- Clugston C. K., McLaughlin K., Kenny M. K. y Brown R. (1992): "Binding of human single-stranded DNA binding protein to DNA damaged by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II)". *Cancer Res.* 52, 6375-6379.
- Codony-Servat J., Gimeno R., Gelpi C., Rodríguez-Sánchez J. L. y Juárez C. (1996): "The two isoforms of the 90 kDa nucleolus organizer region autoantigen (upstream binding factor) bind with different avidity to DNA modified by the antitumor drug cisplatin". *Biochem. Pharmacol.* 51, 1131-1136.
- Cremer T., Kurz A., Zirbel R., Dietzel S., Rinke B., Schroeck E., Spiecher M. R., Mathieu U., Jauch A., Emmerich P., Scherthan H., Ried T., Cremer C. y Lichter P. (1993): "Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 777-792.
- Crick F. (1979): "Split genes and RNA splicing". *Science.* 204, 264-271.
- Davis F. M., Gyorkey F., Busch R. K. y Busch H. (1979): "Nucleolar antigen found in several human tumors but not in the non tumor studies". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 892-896.
- De la Torre M. C. y Giménez-Martín G. (1982): "The nuclear cycle". *The nucleolus* (eds. Jordan E. C. & Cullis C. A.) Cambridge, Cambridge Univ. Press. pp. 153-177.
- Demarcq C., Bastian G. y Remvikos Y. (1992): "BrUrd/DNA flow cytometry analysis demonstrates *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-induced multiple cell-cycle modifications on human lung carcinoma cells". *Cytometry.* 13, 416-422.
- Derenzini M., Hernandez-Verdun D. y Bouteille M. (1983): "Visualization of a repeating subunit organization in rat hepatocytes chromatin fixed *in situ*". *J. Cell Sci.* 61, 137-149.
- Derenzini M. y Treré D. (1991): "Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology". *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* 61, 1-8.
- Derenzini M., Thiry M. y Goessens G. (1990): "Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus". *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1237-1256.
- De Robertis E. D. P. y De Robertis E. M. F. (1981): *En: Biología celular y molecular*, ed. El Ateneo S. A. Barcelona.

- Donahue B. A., Augot M., Bellon S. F., Treiber D. K., Toney J. H., Lippard S. J. y Essigmann J. M. (1990): "Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin". *Biochemistry*. 29, 5872-5880.
- Dreyfuss G., Matunis M. J., Piñol-Roma S. y Burd C. G. (1993): "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA". *Annu. Rev. Biochem.* 62, 289-321.
- Durig J. R., Danneman J., Behnke W. D. y Mercer E. E. (1976): "The induction of filamentous growth in *Escherichia coli* by ruthenium and palladium complexes". *Chem. Biol. Interact.* 13, 287-294.
- Eastman A. (1983): "Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and *cis*-dichloro-(ethylenediamine)-platinum (II)". *Biochemistry*. 22, 3927-3933.
- Eastman A. (1986): "Reevaluation of interaction of *cis*-dichloro(ethylenediamine)platinum (II) with DNA". *Biochemistry*. 25, 3912-3915.
- Eastman A. y Barry M. A. (1987): "Interaction of *trans*-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: Formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione". *Biochemistry*. 26, 3303-3307.
- Eastman A. (1993): *Cancer Cells*. 5, 275-280.
- Erard M., Belenguer P., Caizergues-Ferrer M., Pantaloni A. y Amalric F. (1988): "A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1". *Eur. J. Biochem.* 175, 525-530.
- Escande M. L., Gas N. y Stevens B. J. (1985): "Immunolocalization of the 100 kDa nucleolar protein in CHO cells". *Biol. Cell*. 53, 99-109.
- Estable C. y Sotelo J. R. (1951): "Una nueva estructura celular: el nucleolonema". *Publ. Inv. Cient. Biol.* 1, 105-126.
- Fairbairn D. W., Olive P. L. y O'Neill K. L. (1995): "The comet assay: a comprehensive review". *Mut. Res.* 339, 37-59.
- Fakan S. (1978): "High resolution autoradiography studies on chromatin functions". *En: The Cell Nucleus*. (Eds. Busch H. & Rothblum L.). Academic Press, NY. pp. 3-53.

- Fakan S. (1986): "Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus". *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 12, 105-140.
- Fakan S. y Henandez-Verdun D. (1986): "The nucleolus and the nucleolar organizer regions (collective review) *Biol. Cell* (eds). 56, 189-206.
- Fankhauser C., Izaurralde E., Adachi Y., Wingfield P. y Laemmli U. K. (1991): "Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 Rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element". *Mol. Cell. Biol.* 11, 2567-2575.
- Farid R. S., Bianchi M. E., Falciola L., Engelsberg B. N. y Billing P. C. (1996): "Differential binding of HMG1, HMG2, and a single HMG box to cisplatin.damaged DNA". *Toxicol. Appl- Pharmacol.* 141, 532-539.
- Farrell N., Ha T.T.B., Souchar J. P., Wimmer F. L., Cros S. y Johnson N. P. (1989): "Cytostatic *trans*-Platinum (II) complexes". *J. Med. Chem.* 32, 2240-2241.
- Fernández-Gómez M. E., Risueño M. C., Giménez-Martín G. y Stockert J. C.(1972): "Cytochemical and ultrastructural studies on normal and segregated nucleoli in meristematic cells". *Protoplasma.* 74, 103-112.
- Fernández-Gómez M. E., Risueño M. C., Giménez-Martín G. y Stockert J. C. (1975): "Effect of the cycloheximide on plant cell nucleoli". *Arch. Biol.* 84, 417-424.
- Feuerstein N. y Mond J. (1987): "Numatrin, a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B Lymphocytes". *J. Biol. Chem.* 262, 11389-11397.
- Fichtinger-Schepman A. M. J., Lohman P. H. M. y Reedijk J. (1982), "Detection and quantification of adducts formed upon interaction of diamminedichloroplatinum (II) with DNA, by anion exchange chromatography after enzymatic degradation". *Nucleic Acids Res.* 10, 5345-5357.
- Fichtinger-Schepman A. M. J., Van der Veer J. L., den Hartog J. H. J., Lohman P. H. M. y Reedijk J. (1985): "Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification and quantitation". *Biochemistry.* 24, 707-713.
- Fillastre J. P. y Raguenez-Viotte G. (1989): "Cisplatin nephrotoxicity". *Toxicol. Lett.* 46, 163-175.

- Fisher D. E. (1994): "Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold". *Cell* 78, 539-542.
- Frasca D., Ciampa J., Emerson J., Umans R. S. y Clarke M. J. (1996): "Effects of hypoxia and transferrin on toxicity and DNA binding of ruthenium antitumor agents in HeLa cells". *Metal-Based Drugs*. 4, 197-209.
- Gall J. C., Tsvetkov A., Wu Z. y Murphy C. (1994): "Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component?". *Dev. Genet.* 16, 25-35.
- Gas N., Escande M. L. y Stevens B. J. (1985): "Immunolocalization of the 100 kDa nucleolar protein during the mitotic cycle in CHO cells". *Biol. Cell*. 53, 209-218.
- Godward M. B. E. (1950): "On the nucleolus and nucleolar organizing chromosomes of the *Spyrogyra*". *Annals of Botany*. 14, 39-53.
- Goessens G. (1973): "Les 'centres fibrillaires' des nucléoles de células tumorales d'Ehrlich". *C. R. Acad. Sci. Paris*. 277, 325-327.
- Goessens G. (1976): "High resolution autoradiographic studies of Ehrlich tumor Cell nucleoli". *Exp. Cell Res.* 100, 88-94.
- Goessens G. (1979): "Relations between fibrillar centres and nucleolus-associated chromatin in Ehrlich tumor cells". *Cell Biol. Int. Rep.* 3, 337-343.
- Goessens G. (1984): "Nucleolar structure". *Int. Rev. Cytol.* 87, 107-158.
- Goessens G. y Lepoint A. (1974): "The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumor cells cultivated *in vitro*". *Exp. Cell. Res.* 87, 63-72.
- González-García S. y González-Vilchez F. (1970): "Compuestos de coordinación de elementos del grupo del platino con el ácido propilendiaminotetraacético (APDT). I: Compuestos de Ru³⁺ con APDT". *Anal. Quím.* 66, 845-858.
- González-Vilchez F. y Vilaplana R. (1986): *En: Trends in Cancer Research*. Barbera E. (ed.) Vizcaya: UPV.
- Goodpasture C. y Bloom S. E. (1975): "Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining". *Chromosoma*. 53, 37-50.

- Goodwin G. H., Walker J. M. y Johns E. W. (1978): "The high mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins". *En: The cell Nucleus*. (Eds. Busch H. & Rothblum L.). Academic Press NY. pp. 181-219.
- Granboulan N. y Granboulan P. (1965): "Cytochimie ultrastructurale du nucleole". *Exp. Cell. Res.* 38, 604-619.
- Grummt I., Smith V. A. y Grummt F. (1976): "Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase". *Cell.* 7, 439-445.
- Guerrero F., De la Torre C. y García-Herdugo G. (1989): "Control of nucleolar growth during interphase in higher plant meristem cells". *Protoplasma.* 152, 96-100.
- Guetzow K. y Busch H. (1981): "Localization of phosphoprotein C23 in nucleoli by immunological methods". *Exp. Cell Res.* 135, 259-265.
- Guldner H. H., Szostecki C., Vosberg H. P., Lakomek H. J., Penner E. y Bautz F. A. (1986): "Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I". *Chromosoma.* 94, 132-138.
- Hadjiolov A. A. (1985): "The nucleolus and ribosomal biogenesis". Springer Verlag, Wien, New York. pp. 1-268.
- Henriquez R., Blobel G. y Aris J. P. (1990): "Isolation and sequencing of NOP 1. A yeast gene encoding a nuclear protein homologous to a human autoimmune antigen". *J. Biol. Chem.* 265, 2209-2215.
- Hernandez-Verdun D. (1986): "Structural organization of the nucleolus in mammalian cells". *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 12, 26-62.
- Hernandez-Verdun D., Hubet J., Bourgeois C. A. y Bouteille M. (1980): "Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nuclear structures". *Chromosoma.* 79, 349-362.
- Heitz E. (1931): "Nukleolen und chromosomen in der Gattung Vicia". *Planta (Heidelb.)*. 15, 495-505.
- Herrera A. H. y Olson M. O. J. (1986): "Association of protein C23 with rapidly labeled nucleolar RNA". *Biochemistry.* 25, 6556-6564.

- Hickey D. A., Benkel B. F. y Abukashawa S. M. (1989): "A general model for the evolution of nuclear pre-mRNA introns". *J. Theor. Biol.* 137, 41-53.
- Holland J. F., Bruckner H. W., Cohen C. J., Wallach R. C., Gusberg S. B., Greenspan E. M. y Goldberg J. (1980): "Cisplatin therapy of ovarian cancer". *En: cisplatin: Current Status and New Developments*, Prestayko A. W., Crooke S. T. y Carter S. K. (eds.) Academic Press, NY. pp. 383-402.
- Holmes J., Stanko J., Varchenko M., Ding H., Madden V. J., Bagnell C. R., Wyrick S. D. y Chaney S. G. (1998): "Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin and ormaplatin in a wistar rat model". *Toxicol. Sci.* 46, 342-351.
- Hopkins P. B., Millard J. T., Woo J., Weidner M. F., Kirchner J. J., Sigurdsson S. T. y Raucher S. (1991): "Sequence preferences of DNA interstrand cross-linking agents: importance of minimal DNA structural reorganization in the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatin and mytomicin C". *Tetrahedron.* 47, 2475-2489.
- Howell W. M., Denton T. E. y Diamond J. R. (1975): "Diferencial staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes". *Experientia.* 31, 260-262.
- Howell W. M. (1982): "Selective staining of nucleolar organizer regions (NORs)". *In: The Cell Nucleus.* 11 (eds. Busch H. & Rothblum, L.), pp. 90-142. Academic Press New York.
- Huberman J. A. y Riggs A. D. (1968): "On the mechanisms of DNA replication in mammalian chromosomes". *J. Mol. Biol.* 32, 327-341.
- Hugues E. N., Engelsberg B. N. y Billings P. C. (1992): "Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged RNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2". *J. Biol. Chem.* 267, 13520-13527.
- Imai H., Fritzler M. J., Neri R., Bombardieri S., Tan E. M. y Chan E. K. L. (1994): "Immunocytochemical characterization of human NOR-90 (upstream binding factor) and associated antigens reactive with autoimmune sera: Two MR forms of NOR-90/hUBF autoantigens". *Molecular Biology Reports.* 19, 115-124.
- Jacob S. T. (1995): "Regulating of ribosomal gene transcription". *Biochem. J.* 306, 617-626.
- Jacobs C. (1980): "The role of cisplatin in the treatment of recurrent head and neck cancer". *En: cisplatin: Current Status and New Developments*, Prestayko A. W.,



Crooke S. T. y Carter S. K. (eds.) Academic Press, NY, pp. 423-430.

- Jansen R. P., Hurt E. C., Kern H., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Lapeyre B. y Tollervey D. (1991): "Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast". *J. Cell Biol.* 113, 715-729.
- Jantzen H. M., Admon A., Bell S. P. y Tjian R. (1990): "Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins". *Nature.* 334, 830-836.
- Johnson N. P., Lapetoule P., Razaka H. y Villani G. (1986): "Biological and biochemical effects of DNA damage caused by platinum compounds". *Biochemical Mechanisms of platinum antitumor drugs* (de MacBrien D. C. H. & Slater T. F.) IRL Press (Oxford) pp. 1-28.
- Jordan C. y Carmo-Fonseca M. (1998): "Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA *in vivo*". *Nucleic Acids Res.* 26, 2831-6.
- Jordan E. G. (1984): "Nucleolar nomenclature". *J. Cell. Sci.* 67, 217-220.
- Jordan E. G., Cooper P. J., Martini G., Bennet M. D. y Flavell R. B. (1985) : The effect of temperature and ageing on root apical meristems during seedling growth of *Triticum aestivum*. L: a specific effect on nucleoli". *Plant Cell Environm.* 8, 325-331.
- Jordan E. G. (1991): "Interpreting nucleolar structure: where are the transcribing genes?". *J. Cell. Sci.* 98, 437-442.
- Jordan E. G. y Mc Govern G. H. (1981): "The quantitative relationship of the fibrillar centers and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of Acinomycin D in cultured diploid human fibroblasts (strain MRC-5)". *J. Cell Sci.* 52, 373-389.
- Kasamatsu T., Kohda K. y Kawazoe Y. (1995) : "Cytotoxicity of antitumor agents toward cultured murine leukemia L1210 cells under a serum deprived apoptotic condition". *Anticancer Res.* 15, 2597-2600.
- Kass S., Tyc K., Steitz J. y Sollner-Webb B. (1990): "The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of pre-ribosomal RNA processing". *Cell.* 60, 879-908.

- Kelman A. D. Clarke M. J., Edmonds S. D. y Peresie H. J. (1977): "Biological activity of ruthenium purine complexes". *J. Clin. Hematol. Oncol.* 7, 274-288.
- Keppler B. K., Henn M., Juhal U. M., Berger M. R., Niebel R. y Wagner F. E. (1989), "New ruthenium complexes for the treatment of cancer". In: Clarke M. J. (Ed.), *Progress in clinical Biochemistry and Medicine- Ruthenium and other non-platinum metal complexes in cancer chemotherapy*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 41-69.
- Keppler B. K., Friesen C., Vongerichten H. y Vogel E. (1993): *En: Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*: Keppler B. K. (ed.) Weinheim: VCH. pp. 297-324.
- Knox R., Friedlos F., Lydall D. y Robert J. (1986): "Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA". *Cancer Res.* 46, 1972-1979.
- Kramer J., Zachar Z. y Bingham P. M. (1994): "Nuclear pre-mRNA metabolism: Channels and tracks". *Trends Cell Biol.* 4, 35-37.
- Kuhn A., Voit R., Stefanovsky V., Evers R., Bianchi M. y Grummt I. (1994): "Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of DNA binding and transcriptional activity". *EMBO J.* 13, 416-424.
- Laemmli U. K. (1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage". *Nature.* 227, 3932-3939.
- Lafontaine J. G. y Lord A. (1973): "An ultrastructural and radioautographic investigation of the nucleolonemal component of plant interphase nucleoli". *J. Cell Sci.* 12, 369-383.
- Lamond A. I. y Carmo-Fonseca M. (1993): "The coiled body". *Trends Cell Biol.* 3, 198-204.
- Lapeyre B., Bourbon H. y Amalric F. (1987): "Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1472-1476.
- Lawrence J. B., Carter K. C. y Xing X. (1993): "Probing functional organization within the nucleus: is genome structure integrated with RNA metabolism?". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 807-818.

- Learned R. M., Cordes S. y Tjian R. (1985):** "Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I". *Mol. Cell Biol.* 5, 1358-1369.
- Learned R. M., Cordes S. y Tjian R. (1986):**, "Human rRNA transcription is modulated by the coordinated binding of two proteins to an upstream control element". *Cell.* 45, 847-857.
- Lemaire M. A., Schwartz A., Rahmouni A. R. y Leng M. (1991):** "Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1982-1985.
- Lepoint A. y Goessens G. (1982):** "Quantitative analysis of Ehrlich tumor cell nucleoli during interphase". *Exp. Cell Res.* 137, 456-459.
- Lerner E. A., Lerner M. R., Jameway C. A. y Steitz J. A. (1981):** "Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: Probes for molecular biology and autoimmune disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 2737-2741.
- Leweke P. y Hemleben V. (1982):** "Organization of rDNA in chromatin plants". *En: The Cell Nucleus, 11B*, (eds, Busch H. & Rothblum L.). Academic Press. NY. pp. 225-250.
- Lewin B. (1980):** *En: Gene expression 2.* 2nd ed. Wiley J. & Sons, Inc.- New York..
- Lippard S. (1987):** *Pure & Appl. Chem.* 59, 731-742.
- Lippard J. y Sherman S. E. (1987):** "Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA". *Chem. Rev.* 87, 1153-1181.
- Lischwe M. A., Richards R. L., Busch R. K. y Busch H. (1981):** "Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions". *Exp. Cell Res.* 136, 101-109.
- Long E. O. y Dawid I. B. (1980):**, "Repeated genes in eucaryotes". *Ann. Rev. Biochem.* 49, 727-764.
- Lowe S. W., Ruley H. E., Jacks T. y Housman D. E. (1993):** "p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents". *Cell.* 74, 957-967.

- Luo F. R., Wyrick S. D. y Chaney S. G. (1999): "Biotransformations of oxaliplatin in rat blood *in vitro*". *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13, 159-169.
- Macquet J. P. y Butour J. L. (1983): "Platinum-amine compounds: importance of the labile and inert ligands for their pharmacological activities toward L1210 leukemia cells". *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 899-905.
- Malinge J. M., Pérez J. M. y Leng M. (1994): "Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA". *Nucleic Acids Res.* 22, 3834-3839.
- Mamrack M. D., Olson M. O. J. y Busch H. (1979): "Aminoacid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar non-histone protein C23". *Biochemistry* 18, 3381-3387.
- Marinozzi V. (1964): "Cytochemie ultrastructurale du nucléole, RNA et proteines nucleolaires". *J. Ultrstruct. Res.* 10, 433-456.
- Marples B., Adomat H., Billing P. C., Farrell N. P., Koch C. J. y Skov K. A. (1994): "Recognition of platinum-induced DNA damage by nuclear proteins: screening for mechanisms". *Anticancer Drug Des.* 9, 389-399.
- Matsui S. y Sandberg A. A. (1985): "Intranuclear compartmentalization of DNA-dependent RNA polymerases: association of RNA polymerase I with nucleolar organizing chromosomes". *Chromosoma.* 92, 1-6.
- McA Nulty M. M., Whitehead J. P. y Lippard S. J. (1996): "Binding of Ixrl, a yeast HMG-domain protein, to cisplatin-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*". *Biochemistry.* 35:19, 6089-6099.
- McConkey D. J. y Orrenius S. (1994): "Signal transduction pathways to apoptosis". *Trends in Cell Biology.* 4, 370-375.
- McClintock B. (1934): "The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleolus in *Zea mays*". *Zeitschrift Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 21, 294-328.
- Mehlin H., Danehold B. y Skoglund U. (1992): "Translocation of a specific pre-messenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore: studies with electron microscope tomographie". *Cell.* 69, 605-613.

- Merk O. y Speit G. (1999): "Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity". *Environ. Mol. Mutagenesis*. 33, 167-172.
- Messori L., Kratz F. y Alessio E. (1996): "The interaction of the antitumor complexes Na [*trans*-RuCl₄(DMSO)(Ind)] with apotransferrin: a spectroscopy study". *Metal-Based Drugs*. 3, 1-10.
- Michalik J., Yeoman L. C. y Busch H. (1981): "Nucleolar localization of protein B23 (37/5.1) by immunocytochemical techniques". *Life Sci*. 28, 1371-1379.
- Miller D. A., Dev V. G., Tantravahi R. y Miller O. J. (1976): "Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse human somatic hybrid cells". *Exp. Cell Res*. 101, 235-243.
- Miller O. J., Tantravahi R., Miller D. A., Yu L. C., Szabo P. y Prenskey W. (1979): "Marked increase in ribosomal RNA gene multiplicity in rat hepatoma cell line". *Chromosoma*. 71, 183-195.
- Mishima Y., Matsui T. y Muramatsu M. (1979): "The mechanism of decrease in nucleolar RNA synthesis by protein synthesis inhibition". *J. Biochem*. 85, 807-818.
- Mishima Y., Finansek I., Kominami R. y Muramatsu M. (1982): "Fractionation and reconstitution of factors required for accurate transcription of mammalian ribosomal RNA genes: identification of a species-dependent initiation factor". *Nucleic Acids Res*. 10, 6659-6670.
- Mirre C. y Stahl A. (1978): "Peripheral RNA synthesis of fibrillar centres in nucleoli of Japanese quail oocytes and somatic cells". *J. Ultrastruct. Res*. 64, 377-387.
- Monneron A. y Bernhard W. (1969): "Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells". *J. Ultrastruct. Res*. 27, 266-288.
- Monti-Bragadin C., Tamaro M. y Banfi E. (1975): "Mutagenic activity of platinum and ruthenium complexes". *Chem. Biol. Interact*. 11, 469-472.
- Moore M. J., Query C. C. y Shap P. A. (1993): "Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome". In: *the RNA World*. Gestland R. & Atkins J., editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 303-358.

- Moreno F. J., Rodrigo R. M. y García-Herdugo G. (1989): "An experimental approach to nucleolar organization in plant cells: a morphological, cytochemical and quantitative study". *J. Cell. Sci.* 94, 51-59.
- Moreno F. J., Rodrigo R. M. y García-Herdugo G. (1990): "Ag-NOR proteins and rDNA transcriptional activity in plant cells". *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1879-1887.
- Mymrik J. S., Zaniewski E. y Archer T. K. (1995): "Cisplatin inhibits chromatin remodeling, transcription factor binding, and transcription from the mouse mammary tumor virus promoter *in vivo*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2076-2080.
- Nakayasu H. y Berezney R. (1989): "Mapping replication sites in the eucaryotic cell nucleus". *J. Cell Biol.* 108, 1-11.
- Narayanswami S. y Hamkalo B. A. (1990): "High resolution mapping of *Xenopus laevis* 5S and ribosomal RNA genes by EM *in situ* hybridization". *Cytometry.* 11, 144-152.
- Navarro J. A. R., Salas J. M., Romero M. A., Vilaplana R., González-Vílchez F. y Faurè R. (1998): "*Cis*-[PtCl₂(4,7-H-5-methyl-7-oxo[1,2,4]triazolo[1,5a]pyrimidine)₂]: a sterically restrictive new cisplatin analogue. reaction kinetics with model nucleobases, DNA interaction studies, antitumor activity and structure-activity relationships". *J. Med. Chem.* 41, 332-338.
- Nougarède A. (1969): En: Biologie végétale. I: cytologie (eds.) Masson et C^{ie}.
- Nováková O., Kásparková J., Vrána O., van Vliet P. M., Reedijk J. y Brabec V. (1995): "Correlation between cytotoxicity and DNA binding of polypyridyl ruthenium complexes". *Biochemistry.* 34, 12369-12378.
- Ochs R. L., Lischwe M. A., Shen E., Carroll R. E. y Busch H. (1985), "Nucleologenesi: composition and fate of prenucleolar bodies" *Chromosoma.* 92, 330-336.
- Ochs R. L. y Smetana K. (1991), "Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix". *Exp. Cell Res.* 197, 183-190.
- Olive P. L., Banath J. P. y Durand R. E. (1990), "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay". *Radiat. Res.* 122,86-94.

- Olson M. O. J., Rivers Z. M., Thompson B. A., Kao W. I. y Case S. T. (1983): "Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid". *Biochemistry*. 22, 3345-3351.
- O'Mahony D. J. y Rothblum L. I. (1991), "Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 3180-3184.
- Ormerod M. G., Orr R. M., y Peacock J. H. (1994): The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study". *Br. J. Cancer*. 69, 93-100.
- Orrick L. R., Olson M. O. J. y Busch H. (1973): "Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrilamid gel electrophoresis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70, 1316-1320.
- Oswald C. B., Chaney S. G. y Hall I. H. (1990): "Inhibition of nucleic acids synthesis in P388 lymphocytic leukemia cells in culture by *cis*-platinum derivatives". *Biomed. Biochim. Acta*. 49, 579-87.
- Pacor S., Sava G., Ceschia V., Bregant G., Mestroni G. y Alessio E. (1991): "Antineoplastic effects of *mer*-trichlorobisdimethylsulphoxideaminoruthenium (III) against murine tumors: comparison with cisplatin and with $\text{ImH}[\text{RuIm}_2\text{Cl}_4]$ ". *Chem-Biol. Interact.* 78, 223-234.
- Parker K. A. y Steitz J. A. (1987): "Structural analysis of the human U3 ribonucleoprotein particle reveal a conserved sequence available for base pairing with pre-rRNA". *Mol. Cell. Biol.* 7, 2899-2913.
- Paule M. R. (1993): "Polymerase I transcription, termination and processing". *Gene Expression* 3, 1-9.
- Payet D., Gaucheron F., Sip M. y Leng M. (1993): "Instability of the monofunctional adducts in *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N}_7\text{-N-methyl-2-diazapyrenium})\text{Cl}]^{2+}$ - modified DNA: rates of cross-Linking reactions in *cis*-platinum modified DNA". *Nucleic acids Res.* 21, 5846-5851.
- Pfuhrer S. y Wolf H. U. (1996): "Detection of DNA-crosslinking agents with the comet assay". *Environn. Mol. Mutagenesis*. 27, 196-201.

- Pikaard C. G., McStay B., Schultz M. C., Bell S. P. y Reeder R. H. (1989): "The *Xenopus* ribosomal gene enhancers bind an essential polymerase I transcription factor, xUBF". *Genes Develop.* 3, 1779-1788.
- Pikaard C. G., Smith D., Reeder R. H. y Rothblum L. (1990): "rUBF, an RNA polymerase I transcription factor from rats, produces DNase I footprints identical to those produced by xUBF, its homolog from frog". *Mol. Cell Biol.* 10, 3810-3812.
- Pil P. M. y Lippard S. J. (1992): "Specific binding of chromosomal protein HMG 1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin". *Science.* 256, 234-237.
- Pinto A. L. y Lippard S. J. (1985): "Binding of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA". *Biochim. Biophys. Acta.* 780, 167-180.
- Ploton D., Bobichon H. y Adnet J. J. (1982): "Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissues using a one-step Ag-NOR staining method". *Biol. Cell.* 43, 229-232.
- Pouchelet M., Gansmüller A., Anteunis A y Robineaux R. (1975): "Mise en évidence en microscopie électronique dans les noyaux interphasiques des cellules L 929, de filaments DNA associés aux zones fibrillaires RNA des nucléoles". *C. R. Acad. Sci.* 280, 2461-2463.
- Prestayko A. W., Klomp G. R., Schmoll D. J. y Busch H. (1974): "Comparison of proteins of ribosomal subunits and nucleolar preribosomal particules from Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis". *Biochemistry.* 13, 1945-1952.
- Prestayko A. W., Crooke S. T. y Carter S. K. (1980): (eds.). *En: cisplatin, current status and new developments.* NY, Academic Press.
- Puvion-Dutilleul F., Bachellerie J. P. y Puvion E. (1991): "Nucleolar organization of HeLa cells as studied by *in situ* hybridization". *Chromosoma.* 100, 395-409.
- Puvion-Dutilleul F., Mazan S., Nicoloso M., Pichard E., Bachellerie J. P. y Puvion E. (1992): "Alteration of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by Actinomycin D. implications for U3 snRNP function". *Eur. J. Cell. Biol.* 58, 149-162.

- Puvion E. y Moyne G. (1981): "In situ localization of RNA structures". *En: The Cell Nucleus*. (Eds. Busch H. & Rothblum L.). Academic Press, NY. 8, 59-115.
- Pyle A. M., Rehmann J. P., Meshoyer R., Kumar C. V., Turro N. J. y Barton J. K. (1989): "Mixed ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA". *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3051-3058.
- Raaphorst G. P., Mao J., Yang H., Goel R., Niknafs B., Shirazi F. H. y Yazdi H. M. (1998): "Evaluation of apoptosis in four human tumor cell lines with different sensitivities to cisplatin". *Anticancer Res.* 18, 2945-2951.
- Raska I., Ochs R. L. y Michel S. L. (1990): "Immunocytochemistry of the cell nucleus". *Electron Microsc. Rev.* 3, 301-353.
- Raska I., Dundr M. y Koberna K. (1992): "Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry". *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 771-789.
- Raska I., Andrade L. E. C., Ochs R. L., Chan E. K. L., Chang C., Roos G. y Tan E. M. (1991): "Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies". *Exp. Cell Res.* 195, 27-37.
- Raymond E., Faivre S., Woynarowski J. M. y Chaney S. G. (1998): "Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity". *Seminars in Oncology.* 25, 4-12.
- Recher L., Whitescarver J. y Briggs L. (1969): "The fine structure of a nucleolar constituent". *J. Ultrastruct. Res.* 29, 1-14.
- Recher L., Briggs L. G. y Parry N. T. (1971): "A reevaluation of nuclear and nucleolar changes induced "in vitro" by actinomycin D". *Cancer Res.* 31, 140-150.
- Recher L., Sykes J. A. y Chan H. (1976): "Further studies on the mammalian cell nucleolus". *J. Ultrastruct. Res.* 56, 152-163.
- Reimer G., Pollard K. M., Penning C. A., Ochs R. L., Lischwe M. A., Busch H. y Tan E. M. (1987): "Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black x New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34,000 nucleolar protein of the U3 RNP particle". *Arthritis Rheuma.* 30, 793-800.

- Rendón M. C., Rodrigo R. M., Goenechea L. G., García-Hedugo G., Valdivia M. M. y Moreno F. J. (1992): "Characterization and immunolocalization of a nucleolar antigen with anti-NOR serum in HeLa cells" *Exp. Cell Res.* 200, 393-403.
- Risueño M. C. Medina F. J. y Moreno Díaz de la Espina S. (1982): "Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography". *J. Cell Sci.* 58, 313-329.
- Risueño M. C. y Medina F. J. (1986): "The nucleolar structure in plant cells". *Rev. Biol. Cell.* 7, 1-140.
- Rittosa F. M. y Spiegelman S. (1965): "Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleus organization of *Drosophila melanogaster*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 53, 737-745.
- Roberts J. J. y Fraval H. N. (1980): "Repair of *cis*-platinum diamminedichloride-induced DNA damage and cell sensitivity". *En: Cisplatin: current status and new developments*, Prestayko A. W., Crooke S. T. y Carter S. K. (eds.). Academic Press, NY, pp. 57-77.
- Roberts J. J. y Pera M. (1983): "Action of platinum antitumor drugs". *En: Molecular aspects of anti-cancer drugs action*, Neidle S., Waring M. G. (eds.). Verlag Chemie, Weinheim, pp.183-231.
- Roberts J. J. y Friedlos F. (1987): "Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair of mammalian cells: relationship to toxicity". *Pharmacol. Ther.* 34, 215-246.
- Rodrigo R. M., Rendón M. C., Torreblanca J., García-Herdugo G. y Moreno F. J. (1992): "Characterization and immunolocalization of RNA polymerase transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher plant and vertebrate cells". *J. Cell Sci.* 103, 1053-1063.
- Rodrigo R. M., Torreblanca J., García-Herdugo G. y Moreno F. J. (1994): "An experimental approach to the study of Ag-NOR proteins". *Acta Histochem. Cytochem.* 27, 259-273.
- Rodríguez-Sánchez J. L., Gelpi C., Juárez C. y Hardin J. A. (1987): "Anti-NOR 90. A new autoantibody in scleroderma that recognize a 90-kDa component of the nucleolus organizing region of chromatin". *J. Immunol.* 139, 2579-2584.

- Rosbach M. y Singer R. H. (1993): "RNA travel: tracks from DNA to cytoplasm". *Cell*. 75, 399-401.
- Rosenberg B., VanCamp L. y Krigas T. (1965): "Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrophoresis products from a platinum electrode". *Nature* (London). 205, 698-699.
- Rosenberg B., VanCamp L., Grimley E. B. y Thompson A. J. (1967): "The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes". *J. Biol. Chem.* 242, 1347-1352.
- Roth J. (1983): "Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates of thin sections". *J. Histochem. Cytochem.* 31, 897-899.
- Sava G., Pacor S., Bregant F. y Ceschia V. (1991): "Metal complexes of ruthenium: a potential class of selective anticancer drugs". *Anticancer Res.* 11, 1103-1108.
- Sava G., Pacor S., Zorzet S., Alessio E. y Mestroni G. (1989): "Antitumor properties of dimethylsulfoxideruthenium (II) complexes in the Lewis lung carcinoma system". *Pharmacol. Res.* 21, 617-628.
- Scheer U. y Rose K. (1984): "Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1331-1435.
- Scheer U., Thiry M. y Goessens G. (1993): "Structure, function and assembly of the nucleolus". *Trends Cell Biol.* 3, 236-241.
- Scheer U. y Venavente R. (1990): "Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus". *Bioassays.* 12, 14-21.
- Schimmang T., Tollervey D., Kern H., Frankand R. y Hurt E. C. (1989): "A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with all nucleolar RNA and is essential for viability". *EMBO J.* 8, 4015-4024.
- Schmidt-Zachmann M. S., Hügle-Dörr B. y Franke W. W. (1987): "A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family". *EMBO J.* 6, 1881-1890.

- Schnapp A., Pfeleiderer C., Rosenbauer H. y Grummt I. (1990): "A growth-dependent transcription initiation factor (TIF-IA) interacting with RNA polymerase I regulate mouse ribosomal RNA synthesis". *EMBO J.* 9, 2857-2863.
- Schnapp A. y Grummt I. (1991): "Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factors and RNA polymerase I". *J. Biol. Chem.* 266, 24588-24595.
- Schwarzacher H. G. y Wachtler F. (1991): "The functional significance of nucleolar structures". *Ann. Génét.* 34, 151-160.
- Sen S. y D'Incalci M. (1992): "Apoptosis. Biochemical events and rebvance to cancer therapy". *FEBS Lett.* 307, 122-127.
- Simard R. (1966): "Specific nuclear and nucleolar ultrastructural lesions induced by proflavin and similarely acting antimetabolites in tissue culture". *Cancer Res.* 26, 2316-2328.
- Simard R., Langelier Y., Mandeville R., Maestracci N. y Royal A.(1974): "Inhibitors as tools in elucidating the structure and function of the nucleus". *En: The Cell Nucleus.* (Eds. Busch H. & Rothblum L.). Academic Press, NY. 3, 447-487.
- Singh N. P., MacCoy M. T., Tice R. R. y Schneider E. L. (1988): "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells". *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Sip M. y Leng M. (1993): "DNA, *cis*-platinum and intercalators. Catalytic activity of the DNA double helix". *Nucleic acids & Molecular Biology vol. 7* (ed. Eckstein F. & Lilley D. M. J.), Springer-Verlag (Berlin), pp. 1-15.
- Skladanowski A. y Konopa J. (1993): "Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumor cells". *Biochem. Pharmacol.* 46, 375-382.
- Smetana K., Freireich E. J. y Busch H. (1968): "Chromatin structures in ring-schaped nucleoli of human lymphocytes". *Exp. Cell Res.* 52, 112-128.
- Smetana K. y Busch H. (1974): "The nucleolus and nucleolar DNA". *En: The Cell Nucleus.* (Eds. Busch H. & Rothblum L.). Academic Press, NY. 1, 75-146..

- Smith C. A. y Wood E. J. (1997): *En: Biología celular*. eds. Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. Wilmington, Delaware. E.U.A. ISBN 0-201-65379-6.
- Smith S. D., Oriahi E., Lowe D., Yang-Yen H. F., O'Mahony D., Rose K., Chen K y Rothblum L. I. (1990): "Characterization of factors that direct transcription of rat ribosomal DNA". *Mol. Cell. Biol.* 10(6), 3105-3116.
- Sollner-Webb B. y Mougey E. B. (1991): "News from the nucleolus: rRNA gene expression". *Trends Biochem. Sci.* 16, 58-62.
- Sorenson C. M. y Eastman A. (1988a): "Influence of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient chinese hamster ovary cells". *Cancer Res.* 48, 6703-6707.
- Sorenson C. M. y Eastman A. (1988b): "Mechanism of *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double strand breaks". *Cancer Res.* 48: 4484-4488.
- Sorenson C. M., Barry M. A. y Eastman A. (1990): "Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin". *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 749-755.
- Spector D. L. (1993): "Macromolecular domains within the cell nucleus". *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 265-315.
- Spector D. L. Ochs R. L. y Busch H. (1984): "Silver staining, immunofluorescence and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23". *Chromosoma.* 90, 139-148.
- Spurr A. R. (1969): "A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy". *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-33.
- Takahara P. M., Rosenzweig A. C., Frederic C. A. y Lippard J. (1995): "Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin". *Nature.* 377, 649-652.
- Talley R. W., O'Bryan R. M., Gutterman J. U., Brownlee R. W. y McCredie B. (1973): "Clinical evaluation of toxic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum (NSC-119875)-phase I clinical study". *Cancer Chemother. Rep.* 57: 465-471.

- Tandler C. J. (1954): "An argentaffin component of the nucleolus". *J. Histochem. Cytochem.* 2, 165-166.
- Thiry M. y Goessens G. (1991): "Distinguishing the sites of pre-rRNA synthesis and accumulation in Ehrlich tumor cell nucleoli". *J. Cell Sci.* 99, 759-767.
- Thiry M. y Thiry-Blaise L. (1989): "In situ hybridization at the electron microscope level: an improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA". *Eur. J. Cell. Biol.* 50, 235-243.
- Thiry M. y Thiry-Blaise L. (1991): "Locating transcribed and non-transcribed rDNA spacer sequences within the nucleolus by *in situ* hybridization and immunoelectron microscopy". *Nucleic Acids Res.* 19, 11-15.
- Thiry M., Scheer U. y Goessens G. (1991): "Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and *in situ* hybridization at the electron microscopic level". *Electron Microsc. Rev.* 4, 85-110.
- Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M. y Hurt E. C. (1991): "The small nucleolar RNP protein NOP 1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast". *EMBO. J.* 10, 573-583.
- Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H. y Hurt E. C. (1993): "Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly". *Cell.* 72, 443-457.
- Toney J. H., Donahue B. A., Kellet P. J., Bruhn S. L., Essigmann J. M. y Lippard S. J. (1989): "Isolation of cDNAs encoding a human protein that binds selectively to DNA modified by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II)". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8328-8332.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J. (1979): "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
- Tower J. y Sollner-Webb B. (1987): "Transcription of mouse rDNA is regulated by an activated subform of RNA polymerase I". *Cell.* 50, 873-883.

- Treiber D. K., Zhai X., Jantzen H-M. y Essigmann J. M. (1994): "Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor)". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5672-5676.
- Turchi J. J. y Henkels K. M. (1996): "Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase". *J. Biol. Chem.* 271, 13861-13867.
- Turchi J. J., Li M. y Henkels K. M. (1996): "Cisplatin-DNA binding specificity of calf high-mobility group 1 protein". *Biochemistry.* 35, 2992-3000.
- Turley S. J., Tan E. M. y Pollard K. M. (1993): "Molecular cloning and sequence analysis of U3 snoRNP-associated mouse fibrillarin". *Biochim. Biophys. Acta.* 1216, 119-122.
- Vaisman A. y Chaney S. G. (1995): "Induction of UV-damage recognition protein by cisplatin treatment". *Biochemistry.* 34, 105-114.
- Vaisman A., Keeney S., Nichols A. F., Linn S. y Chaney S. G. (1996): "Cisplatin-induced alterations in the expression of the mRNAs for UV-damage recognition protein". *Oncol. Res.* 8, 7-12.
- Vilaplana R., Romero M. A., Quirós M., Salas J. M. y González-Vilchez F. (1995): "Synthesis, structure and antitumor properties of a new 1,2-propylenediaminetetraacetate-ruthenium (III) compound". *Metal-Based Drugs.* 2, 211-219.
- Vilaplana R., González-Vilchez F., Delmani F. A., Torreblanca J., Moreno F. J. y García-Herdugo G. (En preparación): "The new octahedral antitumor complex *cis*-dichloro-1,2-propylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetato ruthenium (III) induces distortions in double-helical DNA and displays activity against established human cultured cells".
- Wachtler F., Hartung M., Devicor M., Wiengant J., Stahl A. y Schwarzacher H. G. (1989): "Ribosomal RNA is located and transcribed in the dense fibrillar component of human Sertoli cell nuclei". *Exp. Cell. Res.* 184, 61-71.

- Wachtler F., Schofer C., Mosgoller W., Weipoltshammer K., Schwarzacher H. G., Guichaoua M., Hartung M., Stahl A., Bergé-Lefranc J. L., González I. y Sylverster J. (1992): "Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar component of nucleoli: light and electron microscopic *in situ* hybridization in human Sertoli cells". *Exp. Cell. Res.* 198, 135-143.
- Wachtler F. y Stahl A. (1993): "The nucleolus: a structure and functional interpretation". *Micron* 24, 473-505.
- Williams D. D. y Einhorn L. H. (1980): "Cisplatin chemotherapy of testicular cancer." *En: cisplatin: Current Status and New Developments*, Prestayko A. W., Crooke S. T. y Carter S. K. (eds.) Academic Press, NY. pp. 323-328.
- Wu Z., Murphy C., Wu C. H. H., Tsvetkov A. y Gall G. C. (1993): "Snurposomes and coiled bodies". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 747-754.
- Wyllie A. H., Kerr J. F. R. y Currie A. R. (1980): "The significance of apoptosis". *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
- Xing X. y Lawrence J. B. (1993): "Nuclear RNA tracks: structural basis for transcription and splicing?". *Trends Cell Biol.* 3, 346-353.
- Yaneva J., Leubaa S. H., van Holde K. y Zlatanovaa J. (1997): "The major chromatin protein histoneH1 binds preferentially to *cis*-platinum-damaged DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13448-13451.
- Yarbo J. W., Bornstein R. S. y Matrangelo M. J. (1989): "Cisplatin: contemporary treatment approaches". *Semin. Oncol.* 16, 1-128.
- Yasbin R. E., Matthews C. R. y Clarke M. J. (1980): "Mutagenic and toxic effects of ruthenium". *Chem. Biol. Interact.* 31, 355-365.
- Zhai X., Beckmann H., Jantzen H. M. y Essigmann J. M. (1998): "Cisplatin-DNA adducts inhibit ribosomal RNA synthesis by hijacking the transcription factor human upstream binding factor". *Biochemistry.* 37, 16307-16015.
- Zlatanovaa J., Yanevaa J. y Leubaa S. H. (1998): "Proteins that specifically recognize cisplatin-damaged DNA: a clue to anticancer activity of cisplatin". *FASEB. J.* 12, 791-799.

-Zwelling L. A., Anderson T. y Kohn K. W. (1979): "DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by *cis*- and *trans*-platinum diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity". *Cancer Res.* 39, 365-369.

FATIMA-AZZAHRA DECNANI

Modificaciones de la cinética de crecimiento y expresión de proteínas micobacterias en cultivos inducidos por la acción de complejos motorizados de uveña sintéticos

Sobresaliente cum laude
25

99

Octubre

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



* 5 0 1 3 1 2 2 6 3 *

FBI ETD / 488

1312263