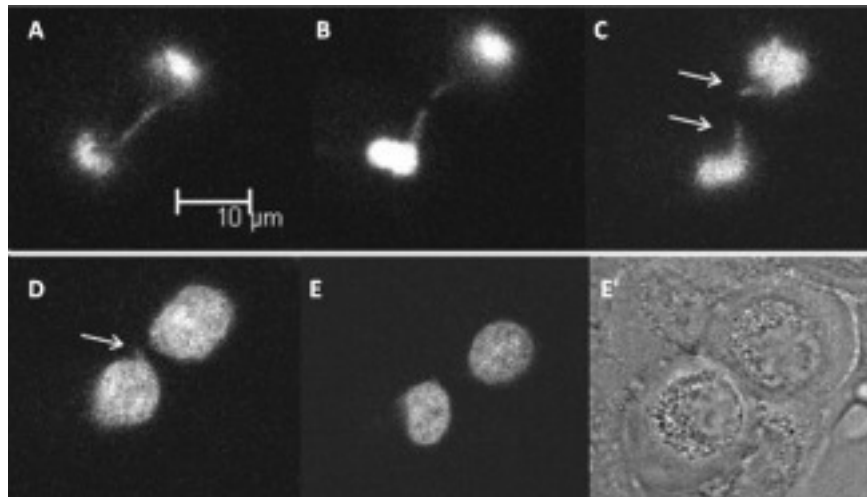


Noves aproximacions als mecanismes tumorals

07/2011 - Biologia. En gairebé tots els estadis del desenvolupament tumoral es dona un continu guany i/o pèrdua de cromosomes sencers o porcions d'aquests. Es postula que qualsevol mecanisme que generi aquesta inestabilitat cromosòmica permet a les cèl·lules adquirir les mutacions necessàries per esdevenir malignes. La inestabilitat cromosòmica es manifesta amb l'aparició d'anomalies en la morfologia del nuclis cel·lulars. Una coneguda font d'inestabilitat cromosòmica és la desprotecció dels extrems cromosòmics o telòmers. L'objectiu d'aquest estudi ha estat caracteritzar la relació entre la inestabilitat resultant de disfunció telomèrica i l'aparició d'anomalies en la morfologia nuclear de les cèl·lules que la presenten.



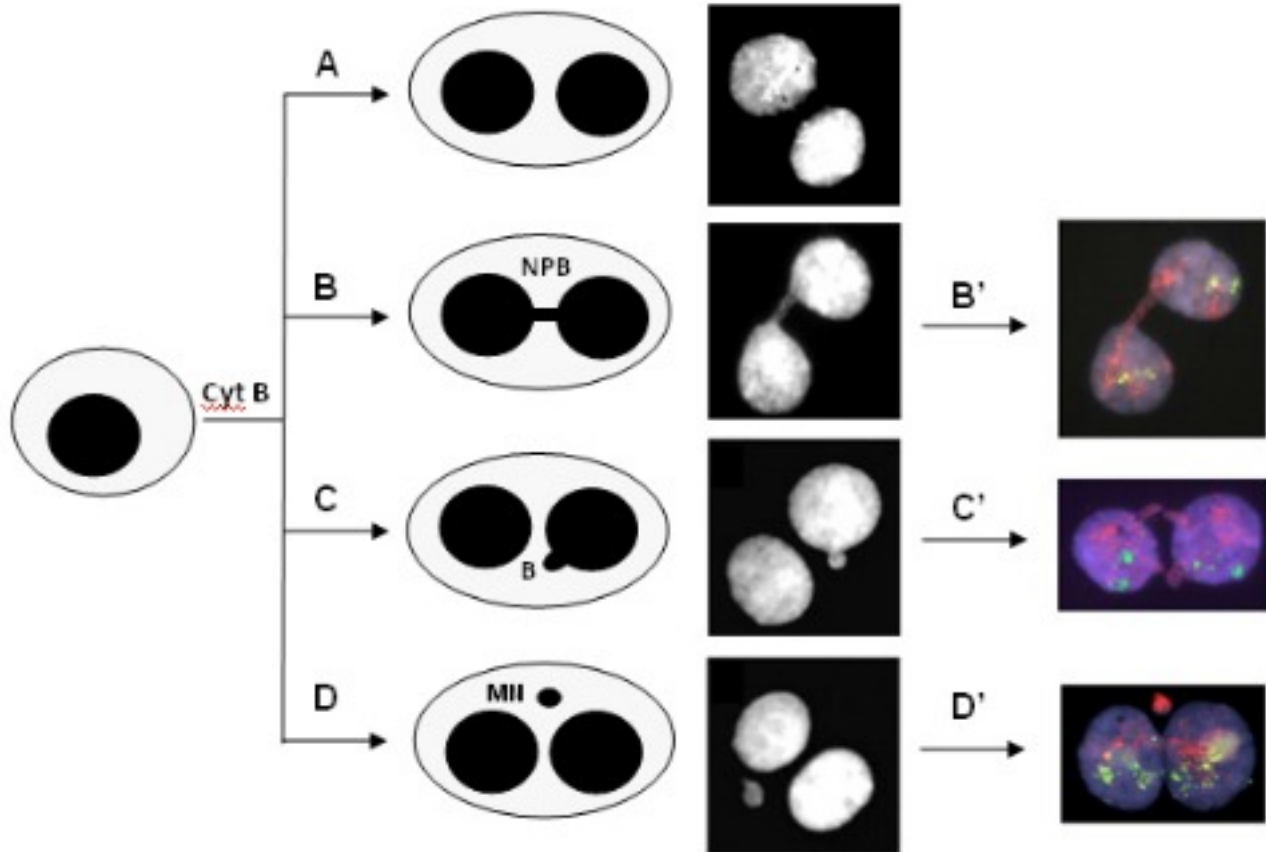
Seguiment a temps real d'una cèl·lula viva amb un pont cromatínic durant l'anafase on el DNA s'observa gràcies a la incorporació d'una proteïna marcada amb fluorescència (GFP-H2B). El pont anafàsic (A) pateix un trencament per un punt (B) i la cromatina trencada origina protuberàncies nuclears (C i D, fletxes). En la propera interfase, les protuberàncies queden embegudes dins els nuclis principals (E). La imatge en llum transmesa (E') ens mostra que s'ha completat la divisió del citoplasma.

Els mecanismes generadors d'inestabilitat cromosòmica juguen un paper clau en el desenvolupament tumoral ja que permeten una contínua remodelació del genoma. La inestabilitat cromosòmica es pot definir com la contínua aparició de guanys i/o pèrdues de fragments cromosòmics i/o cromosomes sencers. Els models actuals de desenvolupament tumoral postulen que la inestabilitat cromosòmica es produiria a l'inici del procés neoplàsic (tumoral) i que el continu remodelatge del genoma permetria l'aparició de mutacions que atorgarien a les cèl·lules les característiques necessàries per esdevenir malignes.

Una manera senzilla i ràpida que permet determinar la presència d'inestabilitat cromosòmica és l'anàlisi d'anomalies en la morfologia dels nuclis de les cèl·lules durant la interfase. Diferents tipus de morfologies nuclears anòmales com ara els micronuclis (MNs), les protuberàncies nuclears (Bs) i els ponts nucleoplasmàtics (NPB) poden manifestar-se durant la interfase cel·lular (imatge de més avall) i, depenent de la seva font d'origen, pot prevaldre més una que una altra.

La pèrdua de protecció dels extrems cromosòmics o telòmers, estat conegut com a disfunció telomèrica, sembla constituir un dels mecanismes pels quals les cèl·lules són capaces de generar la inestabilitat cromosòmica responsable d'iniciar la carcinogènesi en models de ratolí. En humans també s'han observat evidències que la disfunció telomèrica pot tenir un paper rellevant com a instigadora de la carcinogènesi. En aquest sentit, lesions preneoplàsiques i d'estadis neoplàsics incipients sovint presenten cromosomes amb telòmers excessivament curts i possiblement disfuncionals. A més, diversos estudis han associat longituds telomèriques críticament curtes amb un mal pronòstic tumoral. Així doncs, és de rellevància caracteritzar quins són els marcadors biològics que indiquen la presència de disfunció telomèrica.

Amb aquesta finalitat, el treball que es presenta ha identificat i avaluat les morfologies nuclears anòmales en un ambient amb disfunció telomèrica. L'estudi s'ha centrat en cèl·lules epitelials primàries humanes (HMECs) derivades de reduccions estètiques mamàries, les quals presenten nivells creixents de disfunció telomèrica a mesura que es cultiven in vitro. Previ a l'anàlisi i per tal de preservar totes les anomalies morfològiques nuclears, les cèl·lules van ser tractades amb citocalasina-B (Cyt-B), una toxina que bloqueja la divisió citoplasmàtica sense interferir amb la divisió nuclear, estadis 1A-1D de la figura següent:



Bloqueig artificial de la citocinesi amb citocalasina-B (Cyt-B) i formació d'anomalies en la morfologia dels nuclis en cèl·lules binucleades resultants en la següent interfase. **A)** Cèl·lula binucleada sense cap morfologia nuclear anòmla. **B)** Cèl·lula binucleada amb un pont nucleoplasmàtic (NPB). Aquesta anomalia manté els dos nuclis principals units per una tira fina de cromatina. **C)** Les protuberàncies nuclears (B) són protrusions que emergeixen del nucli principal. **D)** Els micronuclis (MN) són fragments de DNA o cromosomes sencers que han quedat físicament exclosos dels nuclis principals. Mitjançant tècniques d'hibridació in situ es van marcar concretament el cromosomes 1 -en vermell- i 22 -en verd- que presentaven un elevat grau de disfunció telomèrica. Les imatges **B'**, **C'** i **D'** són exemples de com el cromosoma 1 forma part de les diferents anomalies morfològiques nuclears.

Les cèl·lules binucleades que en resultaren exhibiren tres tipus diferents d'anomalies en la morfologia dels seus nuclis: Bs, NPBs i MNs, no obstant, només els NPBs i les Bs van incrementar de manera significativa paral·lelament amb la disfunció telomèrica.

Per tal d'establir de forma fefaent una relació entre la presència d'anomalies en la morfologia nuclear i la disfunció telomèrica s'aplicaren tècniques d'hibridació in situ, les quals permeten identificar la posició d'un cromosoma concret en el nucli cel·lular. Les hibridacions demostraren que els cromosomes amb disfunció telomèrica es trobaven més freqüentment implicats en les morfologies del nucli anòmla que els cromosomes amb una longitud telomèrica no disfuncional (Estadis 1B'-1D' de l'anterior figura). Aquests resultats clarament demostraven que la disfunció telomèrica és una font d'anomalies morfològiques nuclears, alhora que indicaven un possible origen comú per a totes elles.

Per tal d'investigar-ho, es va fer el seguiment a temps real de mitosis en HMECs que contenien el seu DNA marcat amb molècules fluorescents (GFP-H2B-HMECs). En aquestes cèl·lules els cromosomes amb telòmers disfuncionals sovint es fusionen entre ells originant cromosomes dicèntrics, els quals originaran un pont de cromatina durant l'anafase si les cromàtides germanes són alhora estirades en direccions oposades cap als pols de la cèl·lula, (figura de capçalera). L'anàlisi del destí d'aquests ponts a partir de seguiments de les cèl·lules a temps real va permetre determinar que la tensió exercida sobre aquest pont és capaç de trencar-lo per un punt originant protuberàncies nuclears i, de forma minoritària, per dos punts originant un micronucli.

En conclusió, els nostres resultats indiquen que la inestabilitat cromosòmica resultant de disfunció telomèrica és troba reflectida principalment en l'aparició de ponts nucleoplasmàtics i protuberàncies nuclears, i minoritàriament en l'aparició de micronuclis.

I no tan sols això, sinó que tot plegat subratlla la importància de l'ús d'aquestes anomalies com a biomarcadors per determinar de manera fefaent la presència de disfunció telomèrica a les cèl·lules.

Judit Pampalona

Unitat de Biologia Cel·lular

"Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies". Pampalona J, Soler D, Genescà A, Tusell L. Mutat Res. 2010 Jan 5;683(1-2):16-22. Epub . PubMed PMID: 19822157.

