

CAPÍTULO 3

Lesiones radioinducidas en el ADN y sus mecanismos de reparación

Alba Güerci

Figura 3.1. *El grito*. Edvard Munch.

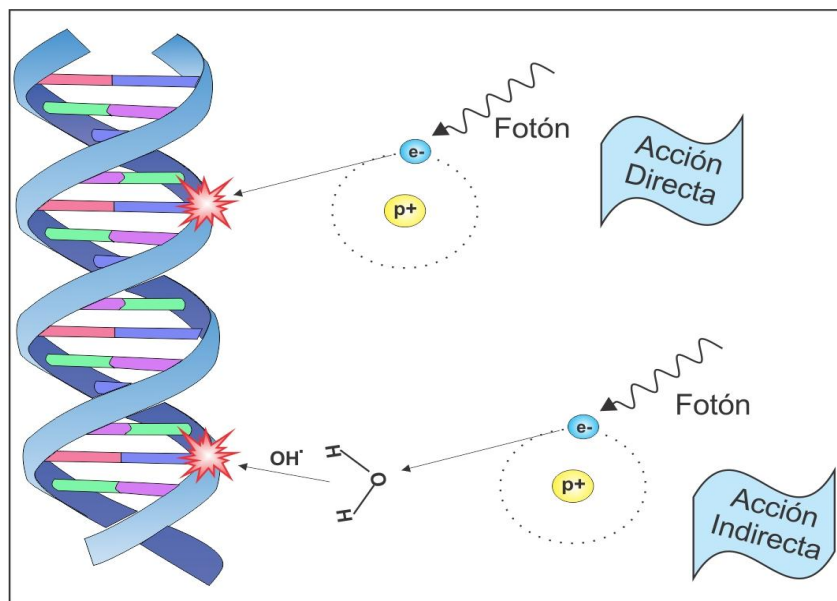


Nota. Fuente: <https://historia-arte.com/obras/el-grito>

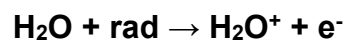
Mecanismos de acción de las radiaciones ionizantes

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes (RI) son el resultado de una serie de eventos que ocurren cuando este agente interactúa con la materia viva. Comienza con la ionización y excitación de átomos y moléculas, que se suceden con diversas reacciones químicas y finalmente llegan a un desenlace biológico determinado. Si bien las excitaciones no son importantes en la inducción de daño biológico, las ionizaciones pueden ocurrir en cualquier biomolécula, expulsando electrones y formando partículas reactivas que continuarán reaccionando y amplificando el impacto inicial. Así, en cualquiera de sus formas (fotones, neutrones o partículas cargadas), la radiación puede interactuar **directamente** con estructuras vitales específicas (ADN, proteínas, lípidos, etc.), causando su ionización o de manera **indirecta** a través de otras moléculas que luego transfieren la energía de ionización a esas moléculas blanco. Este último mecanismo se da por radicales libres, capaces de reaccionar con estructuras críticas y alterarlas (estos radicales son átomos o grupos de átomos con electrones desapareados y por eso muy reactivos). Si se considera el alto porcentaje de agua que compone a la célula (70 - 80%), se entiende que la mayor parte de la energía depositada por las radiaciones es absorbida por esta sustancia y se producen de manera muy rápida y en gran cantidad, radicales intermediarios (Figura 3.2).

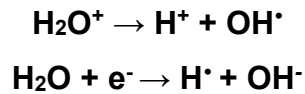
Figura 3.2. Mecanismos de acción directa e indirecta de las RI.



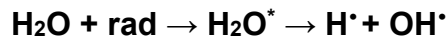
En primer lugar, la radiación que incide sobre las moléculas de agua puede producir un ion H_2O^+ y un electrón libre lento (acuoso), dado que casi toda la energía se ha invertido en arrancarlo de la molécula.



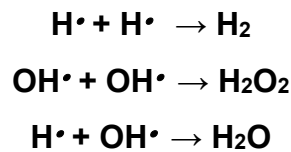
El ion catión H_2O^+ es muy inestable y reactivo. Rápidamente se descompone en un H^+ y en un radical OH^\bullet . El electrón acuoso, puede reaccionar con otras moléculas orgánicas o con una segunda molécula de agua produciendo radicales H^\bullet e iones hidroxilo OH^- .



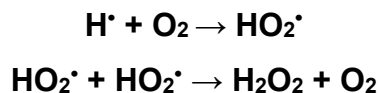
Los iones hidroxilo y protones libres, al tener cargas opuestas tenderán a atraerse y neutralizarse formando nuevamente agua. Los radicales H^\bullet y OH^\bullet neutros pero muy reactivos, tienden a generar enlaces y quitar átomos a otras moléculas, que podrían ser biológicamente funcionales, como las proteínas o los ácidos nucleicos. También hay una posibilidad más directa de formar radicales libres por *excitación* de la molécula de agua, que se disocia en radicales H^\bullet y OH^\bullet .



Los radicales pueden estar diferencialmente concentrados en zonas de alta densidad, a lo largo de la trayectoria de radiación y según su transferencia lineal de energía. En zonas internas, con mayor concentración de estas especies, se favorece la reacción y neutralización entre ellas:

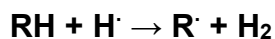
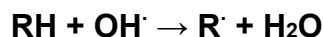


Otros radicales se propagan y si han sido generados en el núcleo pueden acceder al ADN. Recordemos que son inestables, con una vida media inferior a 1 mS, pero durante ese lapso, pueden difundir a través de la célula e interactuar en lugares distantes. Contienen un exceso de energía que puede ser transferida a otras moléculas para alterar enlaces y producir lesiones puntuales a cierta distancia del acontecimiento de ionización inicial. El radical libre H^\bullet también puede interactuar con el oxígeno molecular y formar un radical hidropéroxilo, que, interactuando entre sí, puede formar peróxido de hidrógeno:



En resumen, en el agua irradiada estarán presentes especies radicalarias (H^\bullet ; OH^\bullet y electrones acuosos) que difunden y reaccionan rápido y especies no radicalarias (H_2O_2 ; H_2 ; H^+). A medida que aumenta la LET (transferencia lineal de energía), disminuye el rendimiento de especies radicalarias y aumenta la producción de especies no radicalarias y también aparece una nueva especie reactiva: O_2^\bullet (radical superóxido). Todos estos agentes oxidantes pueden alterar

significativamente sustancias biológicas. Su interacción con moléculas orgánicas puede producir radicales libres orgánicos que implican remoción de hidrógeno según estas reacciones:



Todos los radicales pueden reaccionar con moléculas vecinas y producir radicales lipídicos o radicales sobre el ADN. En el caso de los lípidos, pueden ocurrir reacciones en cadena y alterar las membranas celulares.

Mientras la acción directa es el mecanismo prevalente para las radiaciones de alto LET, la radiolisis del agua constituye el mecanismo de acción principal para baja LET. No obstante, cabe recordar que el microambiente celular no es una simple solución acuosa. Involucra compuestos y enzimas que pueden secuestrar y mitigar el efecto de estas especies reactivas, como se describirá en el capítulo 5.

Como conclusión se destaca que, si bien el proceso de absorción de energía y ruptura de enlaces moleculares es inducido por la RI, también forma parte de muchos procesos biológicos, como reacciones metabólicas o condiciones patológicas, entre las que se encuentra el cáncer.

Lesiones en el ADN inducidas por radiaciones

Si nos centramos en un *blanco celular clave*, podemos decir que la radiación ionizante induce directa o indirectamente, más de un centenar de lesiones en el ADN. Provoca ionización y excitación de los diferentes componentes de esta molécula produciendo zonas químicamente inestables, que tienden a reaccionar rápidamente. La energía puesta en juego suele ser de tal magnitud que se pueden romper enlaces covalentes y producir rupturas de una o ambas cadenas del ADN. En adición, la acción indirecta de una partícula aumenta el estrés oxidativo sobre esta biomolécula. En tal sentido, se ha demostrado que muchas lesiones mutagénicas son producidas por la interacción de la cromatina con radicales OH^\cdot . Las 2/3 partes del daño al ADN se atribuyen a su interacción con esta especie, y por eso es considerada como la más dañina.

Si bien algunas lesiones del ADN son estables y ocasionan serias consecuencias, es posible que luego de exposiciones a dosis bajas de RI se restablezca rápida y eficazmente la estructura molecular. La mayoría de las lesiones pueden ser reparadas mediante un sistema coordinado de mecanismos celulares. Cuando este sistema falla y la **reparación es defectuosa** se instauran **mutaciones**. Asimismo, cuando hay rupturas en ambas cadenas o estén muy próximas, el punto clave es que haya suficiente espacio entre ellas para posibilitar el acceso a la maquinaria de reparación y que no se dificulte el proceso.

Por otra parte, es importante tener en cuenta el entorno celular donde se recibe la irradiación. Dado que el 60 - 70 % de las lesiones radioinducidas por baja LET son por acción indirecta, la presencia de altas concentraciones de secuestradores de radicales libres, reduce marcadamente

la generación de lesiones genotóxicas y por ende de mutaciones y aberraciones cromosómicas. Por tanto, las moléculas donantes de H, como las que contienen grupo sulfhidrilo (-SH), pueden neutralizar las especies reactivas y generar protección celular. Además, el daño radioinducido también dependerá de la presencia de oxígeno, ávido secuestrador de reductores. El oxígeno sensibiliza a la célula por su unión con los radicales generados sobre el ADN. Al combinarse con ellos aumenta su vida media y fija el daño. Es un potente radiosensibilizador (aumenta el efecto de la irradiación). A baja LET, en anoxia, es necesario multiplicar la dosis de 2,5 a 3 veces para obtener el mismo efecto que en presencia de oxígeno. Se llama OER (del inglés *Oxygen Enhancement Ratio*) a la relación entre las dosis necesarias para obtener el mismo efecto, según condiciones de anoxia o de oxigenación normal. De esta manera, la instauración de radicales sobre la desoxirribosa o bases nitrogenadas, son el resultado de la competencia entre el oxígeno y la presencia de radioprotectores celulares (por ejemplo, grupos tioles).

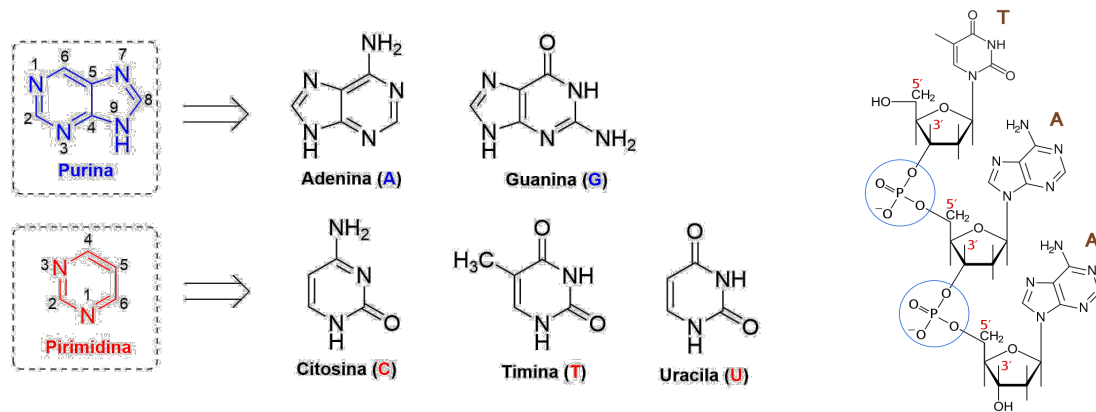
A continuación, se describen las diferentes lesiones inducidas por la RI sobre el ADN.

Tabla 1. 3. Clase y frecuencia de daños endógenos y radioinducidos al ADN.

Clase de Lesión al ADN/célula diploide/día	Endógenas (meta-bólicas)	Inducida por Gy (Radicales Libres)
Ruptura de Simple Cadena	55000	1000
Pérdida de bases púricas	12000	0
Pérdida de bases pirimidínicas	600	0
Daño de Bases (desaminaciones, oxidaciones, etc)	> 4000	2500 - 3000
Destrucción de Azúcares (oxidación)	?	1200
Ruptura de Doble Cadena	8	40
Lesiones Múltiples Localizadas	?	3.65
Entrecruzamientos ADN-ADN	8	30
Entrecruzamientos ADN-Proteína	pocos	140

Daño de Bases

Las radiaciones ionizantes oxidan las bases nitrogenadas mediante el ataque de los radicales OH[•]. El doble enlace del C5-C6 de las purinas y pirimidinas es el sitio de reacción, generando productos e intermediarios de vida corta. En relación a esta saturación de los anillos, puede suceder desestabilización del enlace N-glicosídico y la formación de un residuo de desoxirribosa abásico (sitios apurínicos o apirimidínicos). Además, la pérdida de bases también resulta de la hidrólisis espontánea del enlace N-glicosídico.

Figura 3.3. Izquierda: Bases Nitrogenadas (1). Derecha: secuencia de tres nucleótidos (2)


Las bases pirimidínicas son más radiosensibles que las púricas. El orden decreciente de radiosensibilidad es: timina, citosina, adenina, guanina. Se estima que el daño de bases, considerando el secuestro de radicales libres, puede triplicar a las rupturas de simple cadena. Probablemente el oxidante más dañino es el radical OH^{\bullet} y uno de sus productos característicos es la 8-hidroxiguanina. Por otra parte, la acción directa de la RI puede expulsar un electrón de las posiciones C5 - C6 insaturadas y el catión resultante puede reaccionar posteriormente con un ion hidroxilo. No obstante, el nivel espontáneo de fondo inflige mayor número de sitios dañados en el ADN, que los ocasionados por radicales libres de la RI (ver tabla 1.3).

Rupturas de cadena simple (SSB: *del inglés Single Strand Break*)

Son lesiones muy habituales producidas por la acción indirecta de la radiación. Se generan a nivel de la unión fosfodiéster entre el fosfato y la desoxirribosa, frecuentemente luego del desprendimiento del hidrógeno del azúcar por el ataque del radical OH^{\bullet} . Asimismo, por acción directa de la radiación, el sitio de daño puede ser la desoxirribosa. Se producen aproximadamente 1000 SSBs/célula de mamífero/Gy para radiación de bajo LET. Su número puede triplicarse en células oxigenadas. La frecuencia de formación de estas lesiones es lineal a la dosis y mayor para radiaciones de baja LET. En cuanto a su reparación, el proceso suele ser rápido, inferior a una hora y en general no tienen impacto sobre la letalidad.

Rupturas de cadena doble (DSB: *del inglés Double Strand Break*)

Estas lesiones implican la discontinuidad de las dos cadenas del ADN a pocos nucleótidos de distancia una de otra. A pesar que se producen normalmente en los linfocitos durante la formación de anticuerpos, es el daño de mayor trascendencia biológica inducido por la radiación. Si bien en su formación están involucrados tanto los mecanismos de acción directa como indirecta, los primeros son más distintivos para la radiación de alta LET. Asimismo, pueden formarse por

la acción de un OH^{*} sobre la desoxirribosa, con transferencia del radical sobre la segunda cadena, o por el ataque de varios radicales OH^{*}, formados sobre la trayectoria de la misma partícula o en sitios vecinos a ella. Su formación sigue un arreglo lineal a la dosis, indicando que son generadas por haces simples de radiación.

En cuanto a su significancia genotóxica, estas lesiones son las más notables, en tanto pueden conducir a mutaciones, deleciones (pérdida de material) y cuando interactúan entre ellas, aberraciones cromosómicas severas, pudiendo derivar en transformación celular, carcinogénesis o letalidad. En términos de su reparación, no sólo debe considerarse la brecha originada, sino también el tipo de extremos formados. En relación, la mayoría de las rupturas radioinducidas presentan terminales inusuales o dañados, que evitan su reparación a través de mecanismos simples de ligación.

Destrucción de Azúcares

El radical OH^{*} también sustrae átomos de hidrógeno de la desoxirribosa y puede producir su liberación y la formación de una SSB. También puede modificar el azúcar generando un sitio abásico. No obstante, estos cambios suelen ser poco frecuentes.

Entrecruzamientos

El ataque del OH^{*} provoca la formación de entrecruzamientos intra e intercadenas del ADN y entre ADN y proteínas. Su frecuencia es la quinta parte que la de SSBs.

Daños Múltiples Localizados (DML)

Estos cambios también conocidos como lesiones agrupadas, consisten en conjuntos de rupturas de las cadenas del ADN, asociados a daño oxidativo de las bases nitrogenadas, dispuestos sobre una distancia de 10 a 20 nucleótidos. Por ejemplo, sitios abásicos y SSBs en una o dos vueltas de la hélice que han sido generados por una sola trayectoria de radiación. Estas lesiones pueden producirse con dosis bajas de radiación tanto de alta como baja LET y dependen de la densidad de ionización. Dada su complejidad son difíciles de reparar. En principio son letales, pero algunas pueden ser mutagénicas y ligadas a inestabilidad genómica y cáncer. Mientras que el número de lesiones aisladas para una dosis letal es del orden de 10^5 a 10^6 , el correspondiente a DML es menor a 100, lo cual indica una mayor eficacia biológica.

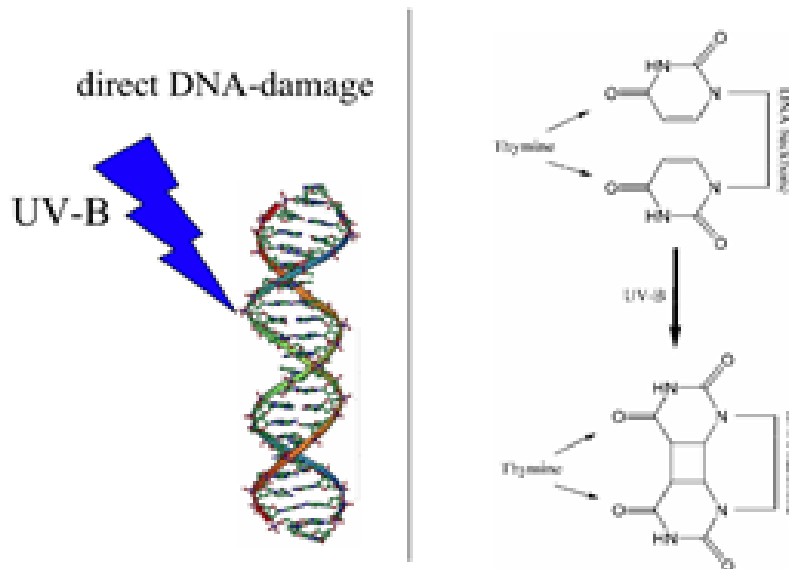
En términos de mayor significancia, las DSBs y DML son las lesiones responsables de los efectos deletéreos de las radiaciones, dado que son los daños más complejos para resolver. No obstante, cabe mencionar que para radiaciones de bajo LET, la presencia de secuestradores de

OH[•] en concentraciones altas, reducen a más de la mitad la producción de DSBs, SSBs, y consecuentemente las mutaciones, aberraciones cromosómicas y muerte celular.

Dímeros de Pirimidina

Las **radiaciones ultravioletas** (UV) producen lesiones particulares en el ADN. Algunas son similares a las de las RI: modificaciones y daños oxidativos de bases, SSBs DSBs y entrecruzamientos. Por otra parte, las UV de baja longitud de onda UVC (220 - 280 nm) y UVB (280 - 320 nm), se absorben específicamente por las bases nitrogenadas y puede provocar la reacción entre dos timinas adyacentes de la misma hebra. Así se forma a partir de sus dobles enlaces anulares, un sistema tricíclico con un anillo de ciclobutano. Esta lesión característica se conoce como **dímero de timina** e impide el apareamiento complementario con las adeninas, originando una estructura incompatible con el giro de la doble hélice y paralizando la replicación, dado que la polimerasa no puede reconocer esta estructura (en estos dímeros de pirimidina, se establecen enlaces covalentes).

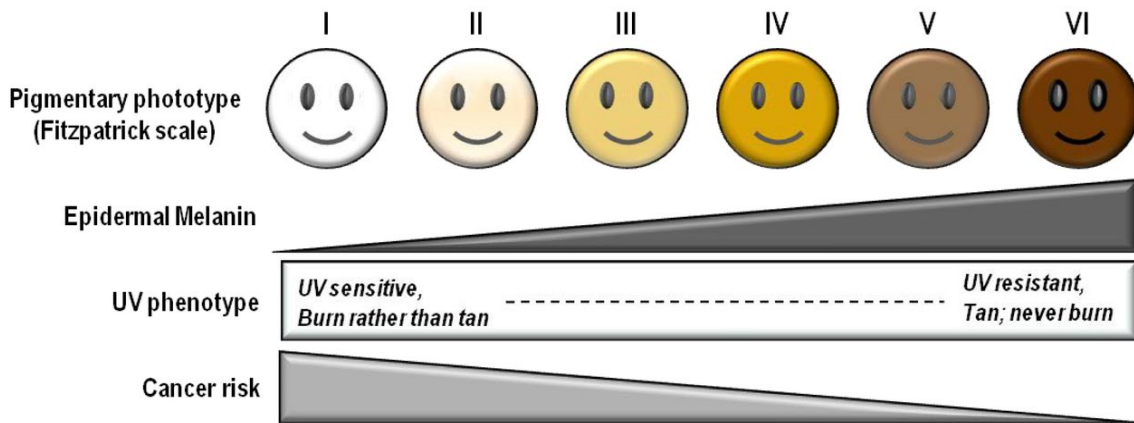
Figura 3.4. Formación de un dímero de pirimidina por acción de la radiación UV.



Nota. (Gerriet41, Public domain, via Wikimedia Commons)

Como este tipo de radiación no tiene tanta penetración, generalmente induce sólo lesiones en la piel, que responden a efectos tempranos por exposición al sol, como eritemas, envejecimiento e inducción de cáncer (de tipo baso y espinocelular). Las personas de piel clara con niveles bajos de melanina en la epidermis muestran un fenotipo sensible a los rayos UV, que tiende a quemarse en lugar de broncearse después de la exposición.

Figura 3.5. Influencia de la pigmentación en el riesgo de cáncer de piel.



Nota. (John D'Orazio, Stuart Jarrett, Alexandra Amaro-Ortiz and Timothy Scott, CC BY 3.0, via Wikimedia Commons)

Según lo expuesto y lo que conocemos de cursos previos, entendemos que el ADN es una molécula preciosa. Codifica información vital sobre el contenido y la función celular. Sólo hay dos copias de cada cromosoma en la célula y una vez que se pierde la secuencia, no es posible reemplazarla. La naturaleza insustituible del ADN lo distingue de otras moléculas celulares y lo convierte en un objetivo crítico para el deterioro relacionado con la edad y la acción de agentes ambientales. Si bien hay que tener presente que muchos de estos daños pueden ser estables o repararse incorrectamente con serias consecuencias biológicas, también hay que considerar que tanto las lesiones espontáneas o inducidas sobre el ADN, son plausibles de reparación. A ello nos abocaremos en el siguiente punto.

Mecanismos de reparación del ADN

Con tres billones de pares de bases, el genoma humano es atacado de manera constante por mutágenos endógenos y ambientales (ej. RI). Dado que el mantenimiento de su integridad es esencial para la vida de la célula, los sistemas biológicos han evolucionado gracias a componentes que permiten detectar y reparar los daños que se producen en él. Existen varios sistemas enzimáticos, desde simples a complejos, que posibilitan la reparación de lesiones del ADN y cobran significancia para la supervivencia celular. De esta manera, hay un control entre el número de errores que suceden y los que se pueden corregir. Mientras que los mecanismos eficientes resultan en una baja tasa de mutación, su ineficacia lleva al aumento de la inestabilidad genética y en situaciones extremas, cuando suceden mutaciones en enzimas de reparación, se presenta hipersensibilidad a agentes genotóxicos y cáncer.

Estos sistemas enzimáticos, se fueron gestando desde las primeras formas de vida por la necesidad de resguardar al genoma y se han conservado a lo largo de las distintas especies. El estudio en bacterias, levaduras, roedores y desórdenes humanos, ha posibilitado comprender que la reparación de distintas lesiones implica especificidad en su reconocimiento y eliminación,

y que también hay mecanismos globales para familias de lesiones. Asimismo, se observó que estos sistemas pueden diferir en la fidelidad de la reparación; es decir el grado en el cual son capaces de restaurar la secuencia salvaje. Si bien la mayoría liberan a la célula de errores (y no implican mutaciones), otros le posibilitan sobrevivir con ellos. Por ejemplo, ciertos daños pueden ser ignorados por las polimerasas, que continúan su proceso aún con el riesgo de desencadenar ciertos cambios. Por otra parte, hay vías reparativas para el daño mitocondrial, otras para daño nuclear y algunas que actúan sobre ambos genomas. También hay sistemas abocados al genoma transcripcionalmente activo, que evitan la interrupción de la actividad celular dependiente de esas zonas.

Figura 3.6. El Premio Nobel de Química 2015 fue otorgado conjuntamente a Aziz Sancar, Paul Modrich y Tomas Lindahl, por sus estudios en los mecanismos de la reparación del ADN.



Nota. Holger Motzkau, CC BY-SA 3.0, via Wikimedia Commons.

En nuestra especie, el proceso integral de reparación comprende aproximadamente 130 genes, entre los que se incluyen los de señalización y regulación. Abarca desde mecanismos multienzimáticos, a los resueltos por una sola enzima. En general, mientras las lesiones endógenas son simples de reconocer y se reparan correctamente, las inducidas suelen ser de mayor complejidad. No obstante, el daño por radiaciones puede ser reparado eficazmente, como se evidencia en la desaparición de las rupturas a las pocas horas de su generación. Sin embargo, como todo tiene un límite, el aumento de la densidad de las lesiones en un volumen reducido, puede impedir la acción coordinada de los distintos sistemas enzimáticos. Por eso, a dosis altas de radiación, se reduce la eficacia de estos mecanismos y se forman reordenamientos incorrectos o letales. Dado que el tiempo de reparación varía según la complejidad de la lesión y el sistema puesto en funcionamiento, observando la cinética de reparación se tiene una noción de la jerarquía del daño.

Antes de referir a algunas de estas vías moleculares, es importante aclarar que si bien la reparación representa al proceso por el cual se restaura la función de la macromolécula del ADN (por ejemplo, la replicación), no necesariamente indica que se recupera la función génica (proteína funcional). También son importantes los mecanismos de eliminación de mutágenos, que

evitan las lesiones antes que se produzcan (Capítulo 5). Así, podemos comprender que la **recuperación** celular, involucra un proceso amplio e integral, orientado al incremento de la sobrevivencia o disminución del daño tisular, cuando el tiempo permite que esto ocurra.

Si bien hay diversas vías de reparación del ADN, a continuación, se aludirá a los mecanismos centrales que participan en la resolución del daño genotóxico descripto oportunamente.

Reversión directa de la lesión

En algunos casos, la forma más inmediata de resolver una alteración, es la reversión directa de la transformación ocurrida. Un ejemplo es la reparación de los dímeros inducidos por la luz UV, que distorsionan la molécula del ADN e impide físicamente su replicación y transcripción. Esta lesión es reconocida y escindida por una enzima fotoliasa, mediante una reacción de transferencia electrónica iniciada por absorción de luz visible y regenerando las bases originales. Esta enzima tiene como coenzimas $FADH_2$ y un cromóforo que absorbe la luz e inicia la transferencia de electrones. En la oscuridad operan otros sistemas. Este mecanismo es primitivo y conservado en la escala zoológica, está presente en mamíferos marsupiales, pero no en los placentarios. Otro ejemplo lo constituye la reversión de bases modificadas por agentes alquilantes (ej. O6-metilguanina, O6-etilguanina). Los grupos alquilo pueden ser eliminados de la base por una alquiltransferasa, que los transfiere a un residuo de cisteína de su propio centro activo. Dado que la catálisis inactiva a la propia enzima y no puede regenerarse, se deben sintetizar nuevas moléculas para mantener el proceso reparador. Por lo tanto, el sistema se satura si hay un exceso de estas lesiones.

Figura 3.7. Proceso de fotorreactivación enzimática.

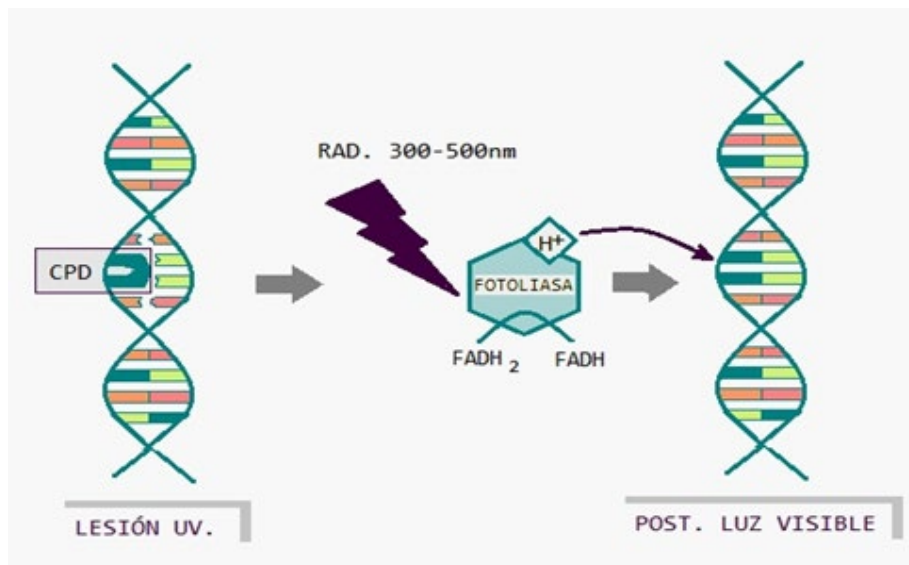
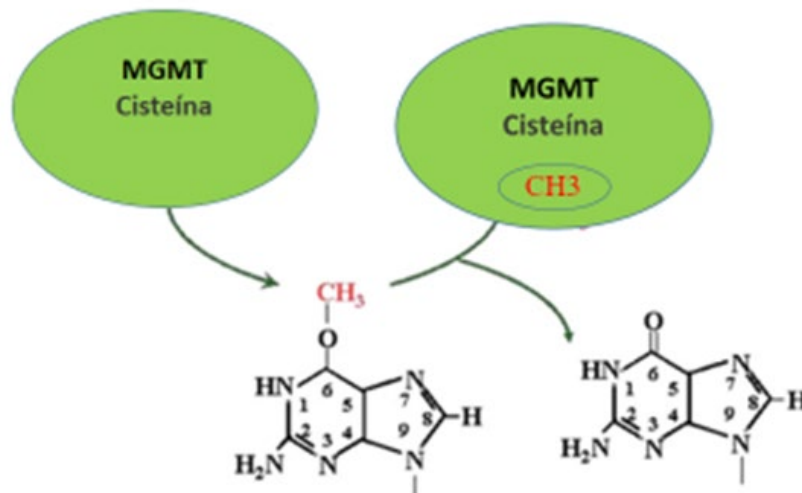


Figura 3.8. Proceso de reversión directa por alquil-transferasas.



Reparación por Escisión

Este sistema alude a la reparación de lesiones que se basan en la eliminación de bases nitrogenadas, nucleótidos o segmentos defectuosos de ADN y su reemplazo con la estructura correcta. Constituye un proceso complejo, con varios pasos y diversas proteínas. Se inicia mediante el reconocimiento de la lesión, que puede ser una base alterada o un cambio tridimensional. El proceso genérico se compone de una etapa previa característica y etapas avanzadas comunes. Siempre implica la síntesis de un fragmento de ADN.

Mecanismo general de reparación por escisión de nucleótidos

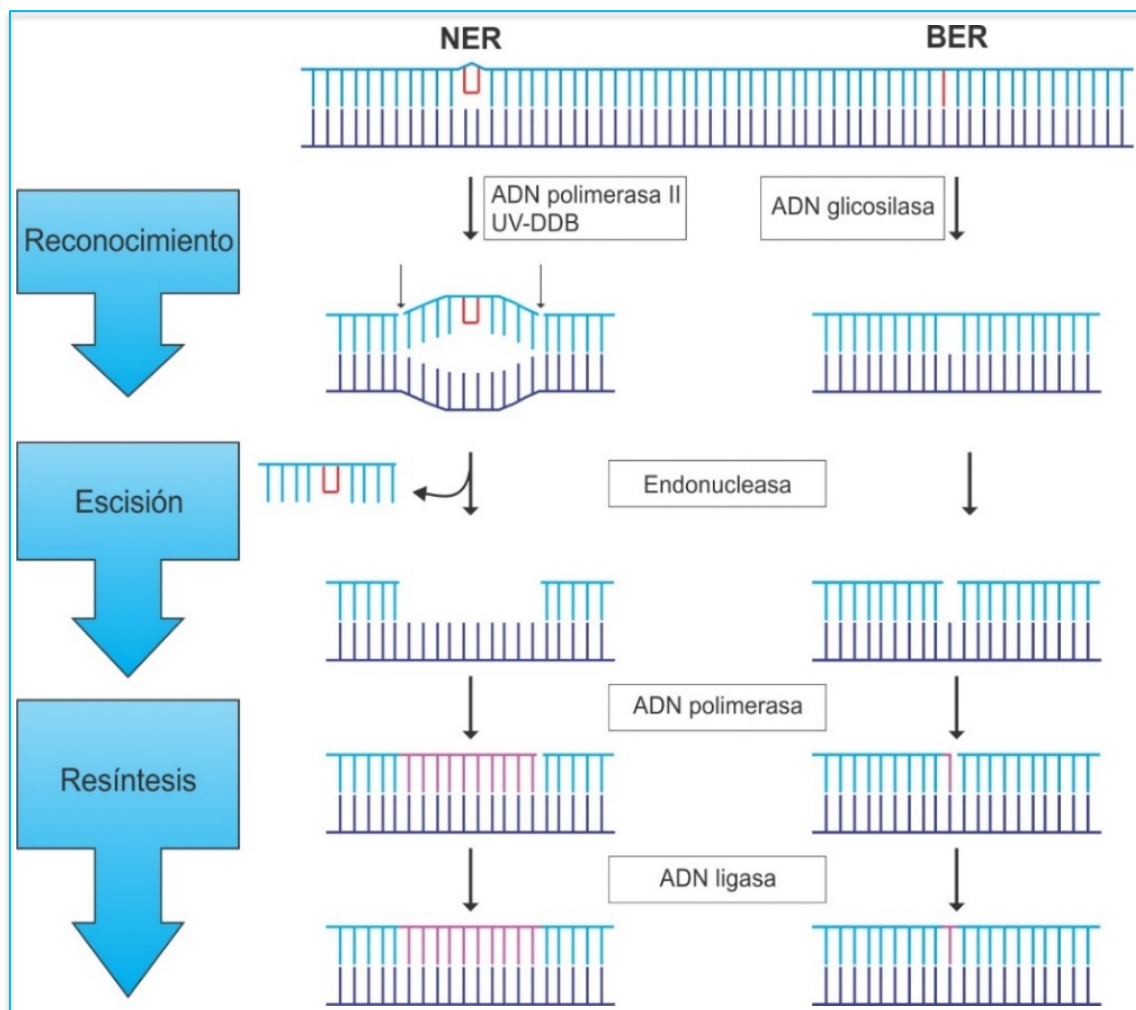
También conocido como “NER” (del inglés *Nucleotide Excision Repair*), es un proceso en el cual intervienen proteínas que reconocen diversas alteraciones, que suelen distorsionar la doble hélice (dímeros de timina, bases con sustituyentes voluminosos). En nuestra especie es una vía canónica para el daño genotóxico inducido por el humo del tabaco. Actúa en la reparación global del genoma y también en una actividad acoplada a la transcripción, que revisa y repara el ADN antes de ser transcrito.

Este mecanismo presenta unos 30 polipéptidos diferentes y comienza con el **reconocimiento** de la lesión por proteínas que componen el complejo de reparación. Posteriormente, durante la fase de **escisión**, un complejo con endonucleasas hidroliza los enlaces fosfodiéster de la hebra lesionada, a ambos lados de la lesión. Luego, una helicasa favorece la separación del oligonucleótido. Sigue la **síntesis restauradora**, donde una ADN polimerasa, por elongación del extremo 3'-OH formado en el corte, rellena el hueco generado. El uso de la otra cadena como molde asegura que se incorpore la secuencia correcta. Finalmente, una ADN ligasa une el extremo 3'-OH recién sintetizado con el extremo 5'P formado en el corte de la hebra original, cerrando la mella (fase de **sellado**). Este mecanismo actúa sobre la hebra molde del ADN, reparando las regiones que se transcriben activamente.

Reparación por escisión de bases

También conocido como “BER” (del inglés *Base Excision Repair*). A través de este mecanismo se aborda la resolución del daño de bases, reparando lesiones sutiles que al no distorsionar al ADN no pueden ser reconocidas por el sistema anterior. Puede corregir daños por hidrólisis (desaminación o pérdida de bases), oxidación por radicales libres y alquilaciones. En este proceso, durante la fase de escisión, no se elimina el nucleótido sino la base dañada o incorrecta. Una N-glicosilasa reconoce la base anómala o mal emparejada, e hidroliza el enlace N-glucosídico establecido con la desoxirribosa, formando un sitio abásico (hay N-glicosilasas específicas para las diferentes bases). Una vez generado el sitio abásico, se produce el corte de la hebra de ADN junto a esa desoxirribosa que no está unida a la base nitrogenada. Las endonucleasas AP (de apurínico - apirimidínico), hidrolizan el enlace fosfodiéster originando una mella. En eucariotas este corte genera un extremo 3'-OH, y a partir de este punto el mecanismo es el conocido, dando lugar a la acción de la ADN polimerasa, que elonga sustituyendo el nucleótido abásico y en ocasiones varios más (introduce la secuencia correcta por complementariedad con la hebra molde). En eucariotas hay dos versiones de este proceso: la reparación de un solo nucleótido y la reparación de un tramo más largo.

Figura 3.9. Esquemas de los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos y de bases



En adición, hay algunos mecanismos que actúan próximos a la ocurrencia de los cambios, evitando su perpetuación en la replicación. Por ejemplo, hay una enzima uracilo ADN glicosilasa, que recorre el ADN para reconocer estas bases extrañas (uracilo) en su estructura evitando su incorporación. Los uracilos pueden formarse por desaminación espontánea de la citosina. También hay otros procesos que corrigen errores ocurridos durante la replicación o errores que la impiden. Por ejemplo, **reparación de emparejamientos incorrectos**, donde se elimina la base errónea o el segmento que la contenga.

Mecanismos de reparación de rupturas de doble hebra

Estas lesiones si bien son menos frecuentes, son más letales, en tanto no reparadas llevan a la pérdida de fragmentos cromosómicos y son una amenaza para la vida celular. También son perjudiciales si están mal reparadas, dado que se desestabiliza el genoma y conducen a reordenamientos que pueden tener serias consecuencias. Este tipo de daño puede repararse mediante dos mecanismos principales: Recombinación Homóloga (RH) y Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ del inglés: *Non-Homologous End Join*).

Recombinación Homóloga (RH)

En la reparación de DSB mediada RH, se utiliza la cromátida hermana como molde, para sintetizar la nueva cadena en el locus lesionado (Figura 3.10). El proceso está mediado por la proteína Rad51 con ayuda de otros miembros (Rad52, BCRA 1, BCRA 2). Dado que las cromátidas hermanas son idénticas entre sí, el daño del ADN se puede reparar fielmente sin consecuencias genéticas. Varios estudios han mostrado que la HR es más activa en las células madre embrionarias y en el desarrollo embrionario temprano, en comparación con las etapas tardías del desarrollo y las células somáticas.

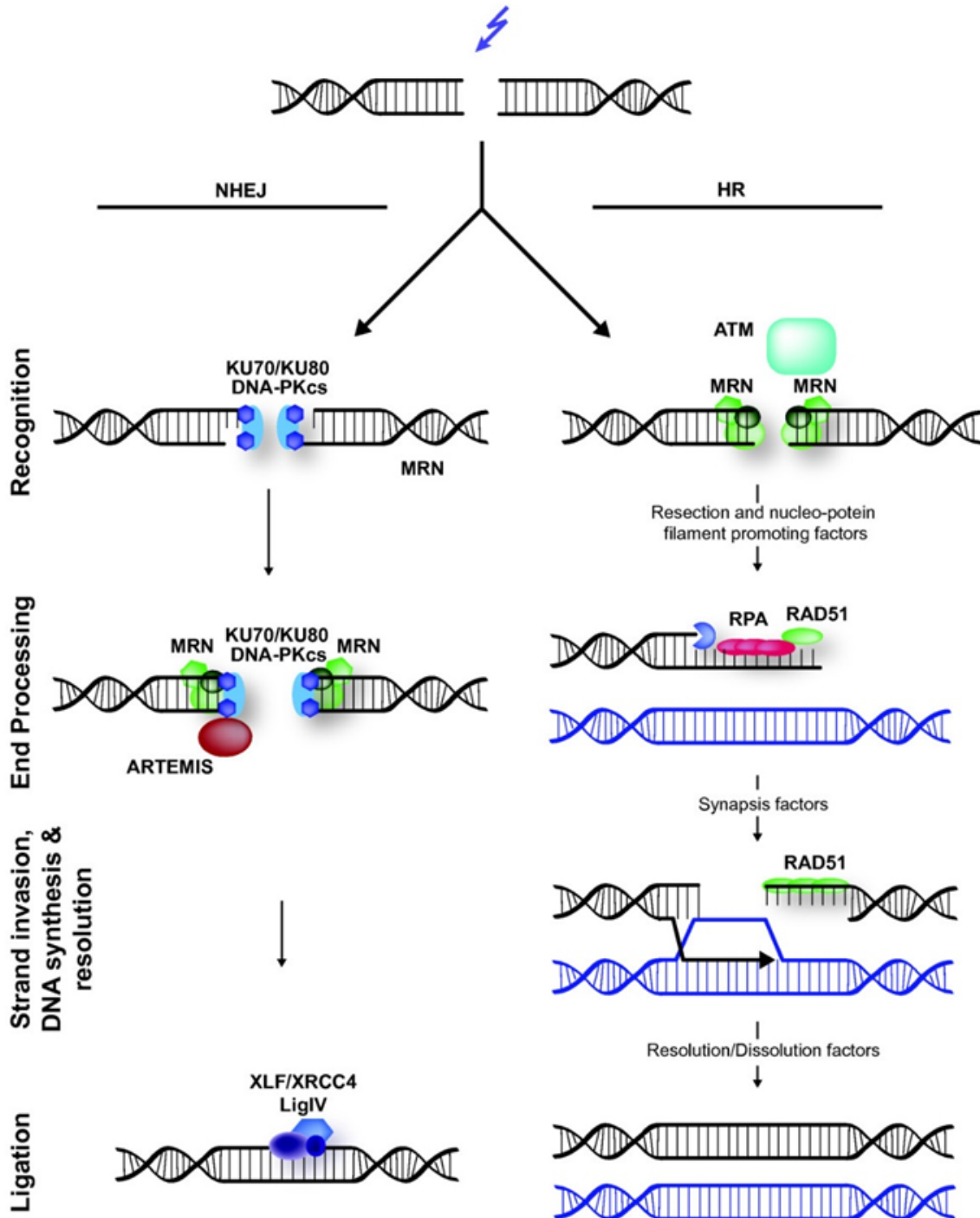
La falta de HR en células detenidas en G₀ no es inesperada, ya que este proceso está restringido a la fase G₂/M del ciclo celular, cuando está disponible una cromátida hermana. Si bien puede usarse un cromosoma homólogo como molde en células que no se dividen, esto es menos frecuente y se explica porque las cromátidas hermanas están muy próximas después de la replicación del ADN, en contraste con los homólogos que no están emparejados en la mitosis y pueden ser más difíciles de reunir. La expresión de la proteína Rad51 está regulada por el ciclo celular; se vuelve indetectable cuando las células entran en senescencia replicativa. Por lo tanto, la vía principal para la reparación de DSB en células G₁/G₀ de mamíferos es NHEJ.

Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ)

En contraste con la vía anterior, esta ruta simplemente fusiona los dos extremos rotos, con poca o ninguna consideración por la homología de secuencia. NHEJ comienza con la unión del heterodímero Ku70 / Ku80 a los extremos rotos del ADN, facilitando el reclutamiento del complejo Artemis-DNA-PKcs, que procesa los extremos para que puedan ligarse. Posteriormente,

los huecos se rellenan por una ADN polimerasa y los extremos se unen covalentemente mediante el complejo XRCC4-ADN ligasa IV. Este mecanismo rara vez está libre de errores y conduce a deleciones o inserciones, aumentando la inestabilidad genómica y eventualmente promoviendo la carcinogénesis.

Figura 3.10. Esquema de los mecanismos de reparación de DSBs.



Nota. (Hannes Lans, Jurgen A Marteiijn and Wim Vermeulen, CC BY 2.0, via Wikimedia Commons).

Significancia de los mecanismos de reparación

Tanto el daño exógeno como endógeno al ADN desafía constantemente la estabilidad de nuestro genoma y aumenta la frecuencia de errores en la replicación del ADN. Por ende, la reparación eficiente del ADN es vital para mantener la permanencia del genoma y es tática la significancia de los problemas que pueden devenir cuando alguno de estos mecanismos no funciona. Hay diversos síndromes humanos que responden a ello y están asociados a cáncer y trastornos degenerativos. Por ejemplo, en Ataxia Telangiectasia se observa una mayor sensibilidad al daño inducido por rayos X y en Xeroderma pigmentosa, la deficiencia en alguno de los genes del sistema de reparación por escisión de nucleótidos, impide remover los dímeros de pirimidina. De esta manera, la acumulación de lesiones concluye con este tipo particular de cáncer de piel.

Asimismo, hay evidencia que las vías de reparación del ADN se vuelven menos eficientes con la edad, lo cual también conduce a la acumulación de mutaciones. Varios estudios han señalado la disminución de la expresión de las enzimas reparadoras o de su actividad, en relación al paso del tiempo. Un trabajo realizado en gemelos, donde se analizan 216 individuos de 40 a 77 años, demuestra que mientras la reparación de SSB se mantiene hasta la vejez, la respuesta a las DSB disminuye con la edad. Dado que la respuesta al daño del ADN es un proceso estrictamente controlado, es tentador especular que se vuelve menos eficiente o desregula con la edad. Sin embargo, como la mayoría de los síndromes de envejecimiento prematuro son causados por mutaciones en los genes de reparación del ADN, es razonable suponer que el envejecimiento normal es causado, en parte, por la disminución de la capacidad de reparación del ADN. La secuencia general de eventos puede ser la siguiente: las mutaciones espontáneas y los reordenamientos deterioran gradualmente la función de los genes involucrados en la respuesta al estrés y la reparación del ADN. La reparación del ADN se vuelve menos eficiente y más propensa a errores, lo que lleva a una acumulación en cascada de daños y mutaciones, que exacerban aún más el deterioro fisiológico relacionado con la edad. Sin duda alguna, por más que nos cueste aceptarlo estamos programados para ser simples mortales.

Por otro lado, el mecanismo de reparación del ADN en sí, no es perfecto. Las mutaciones proporcionan material para la selección natural y adaptación. En la naturaleza, los organismos no viven indefinidamente y a menudo sucumben por la depredación o accidentes, antes de acumular suficientes mutaciones para mostrar envejecimiento. De esta manera, sin la existencia de ninguna presión para invertir en un sistema perfecto de reparación del ADN, este se volvió vulnerable. Las diferencias colosales en la esperanza de vida entre las especies animales, sugieren que existe un amplio espectro de cuán "imperfectos" pueden ser los mecanismos de mantenimiento del ADN.

Figura 3.11. *Anciano en pena (en las puertas de la eternidad).* Van Gogh.



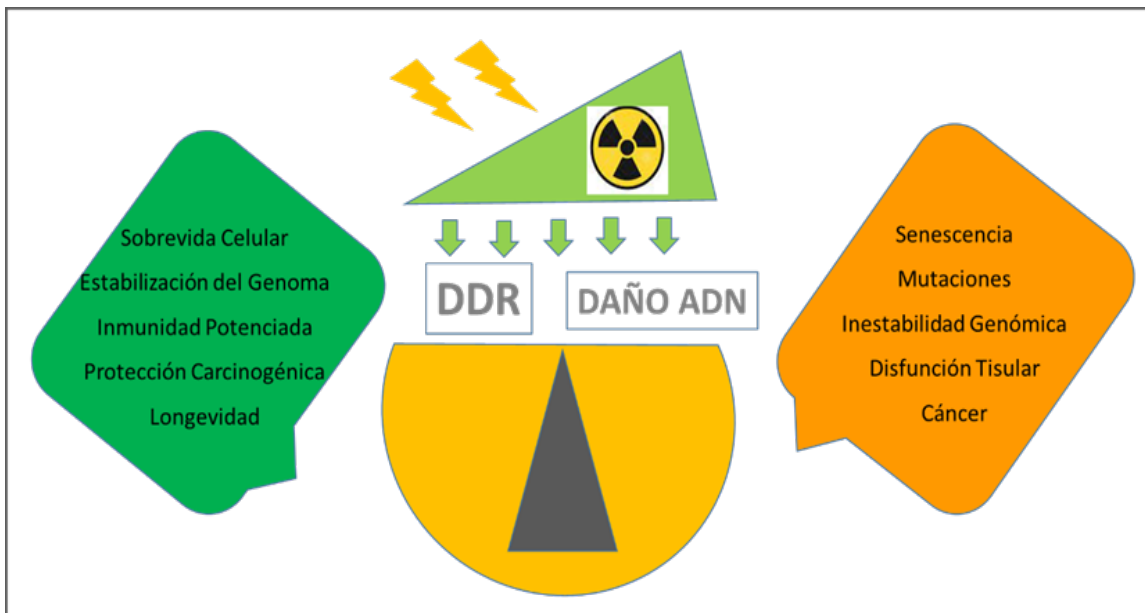
Nota. Fuente: <https://historia-arte.com/obras/anciano-en-pena-en-las-puertas-de-la-eternidad>

Respuesta al daño en el ADN: DDR

Como conclusión de este capítulo podemos pensar que luego de la exposición a RI, se genera una interacción dinámica entre la cantidad de lesiones inducidas en el ADN y la respuesta celular a ese daño, conocida como DDR (del inglés: DNA Damage Response) que determina el resultado biológico según el contexto celular y orgánico. Las lesiones iniciales del ADN causadas por la exposición a RI son proporcionales a la dosis y desencadenan la DDR; una cascada de señalización que detecta el daño y activa varios mecanismos de reparación del ADN, lleva a la detención del ciclo celular y si es necesario, a la activación de la defensa antioxidante y otras vías relevantes. La activación de la DDR y la ramificación hacia vías especializadas (p. ej., supervivencia frente a apoptosis o HR frente a NHEJ), depende de varios factores, como la dosis, la tasa de dosis, tipo de radiación, transferencia de energía lineal, tipo

de célula y microambiente celular. Luego de una exposición a dosis bajas, se supone que la DDR posibilita reparar la reducida cantidad de lesiones inducidas en el ADN y también, genera resistencia a las tensiones genotóxicas posteriores (respuesta radioadaptativa). Tal adaptación puede durar lo suficiente como para suprimir las tasas de mutación, inestabilidad genómica, senescencia/envejecimiento y carcinogénesis causadas por las dosis altas o especies reactivas de oxígeno generadas endógenamente, fenómeno conocido como hormesis. Por otra parte, si el daño radioinducido en el ADN es alto (por lo general, por encima de una cierta dosis umbral que puede variar según el tipo de célula/organismo), la capacidad de la DDR desencadenada es insuficiente para completar la reparación. Esto provoca consecuencias perjudiciales, como mutaciones, inestabilidad genómica, transformación neoplásica o disfunción tisular. La interacción entre el DDR y el daño del ADN es, por lo tanto, dinámica y depende de una multitud de factores determinados contextualmente.

Figura 3.12. Interacción entre el daño al ADN y la respuesta ejecutada para resolverlo.



Referencias

Figura 3.1. Bolaño E. (2017). El Grito (de Edvard Munch). <https://historia-arte.com/obras/el-grito>.

Figura 3.3. Izquierda: tarkin71. (2020). Purinas e pirimidinas e seus derivadas. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bases_nitrogenadas.png?uselang=es. Derecha: G3pro. (2010).

Phosphodiester Bond.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phosphodiester_Bond_Diagram.svg.

Figura 3.4. Gerriet. (2008). Formación de un dímero de pirimidina por acción de la radiación UV.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Direct_DNA_damage.png.

Figura 3.5. (2013). D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A y Scott T. (2013). Influence of pigmentation on skin cancer risk.

https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Influence_of_pigmentation_on_skin_cancer_risk.png.

Figura 3.6. Motzkau. (2015). Los premios Nobel de Química 2015 en rueda de prensa en la Real Academia Sueca de Ciencias. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nobel_laureates_Chemistry_2015_0188.jpg.

Figura 3.7. BQUB17-MBernoy. (2017). Proceso de fotorreactivación enzimática. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fotorreactivaci%C3%B3n_enzim%C3%A1tica.jpg.

Figura 3.10. Lans H, Marteiijn JAy Vermeulen W. (2014). Reparación de rotura de doble hebra (DSB) en mamíferos. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1756-8935-5-4-3-1.jpg>.

3.11. Calvo Santos M. (2018). Anciano en pena (en las puertas de la eternidad). Van Gogh. <https://historia-arte.com/obras/anciano-en-pena-en-las-puertas-de-la-eternidad>

Averbebeck D. (2008). Efecto de las Radiaciones sobre el AND. Tubiana M. Radiobiología. Tercera Edición (pp 79 – 123). Editorial Hermann/Medicina. París.

Creus A. (2006). Genotoxicidad, Mutagénesis y Carcinogénesis. Paz y Miño C, Creus A, Cabré O y Leone P. Genética Toxicológica y Carcinogénesis (pp 22 – 28). FUNDACYT-PUCE. Ecuador.

Gardés-Albert, M. (2008). Química de la Radiación. Tubiana M. Radiobiología. Tercera Edición. (pp 41 – 59). Editorial Hermann/Medicina. París.

Garm C, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Petersen I, Bohr VA, Christensen K, Stevnsner T. (2013). Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. Aging Cell. 12:58-66.

Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C. (2007). Changes in DNA repair during aging. Nucleic Acids Research. Vol 35. 22 (15): 7466–7474.

Hall, EJ and Giaccia AJ. (2012). Molecular Mechanisms of DNA and Chromosome Damage and Repair. Hall, EJ and Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. Seventh Edition (pp 13 – 24). Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.

Herráez A. (2012). Componentes de los Ácidos Nucleicos. Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Segunda Edición (pp11- 19). Barcelona. Editorial Elsevier.

International Atomic Energy Agency. IAEA. (2010). Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students, Training Course Series No. 42, Vienna.

Kabilan U, Graber TE, Alain T, Klovov D. (2020). Ionizing Radiation and Translation Control: A Link to Radiation Hormesis? International Journal of Molecular Sciences. 21(18):6650.

Lehnert, S. (2008). Biomolecular Action of Ionizing Radiation (pp 121-183). New York. Taylor Francis.

Lewin B. (2001). Recombinación y Reparación. Lewin B. Genes VII. Séptima Edición (pp 415 – 452). Madrid. España. Editorial Marbán.

Li Z, Zhang W, Chen Y, Guo W, Zhang J, Tang H, Xu Z, Zhang H, Tao Y, Wang F, Jiang Y, Sun FL, Mao Z. (2016). Impaired DNA double-strand break repair contributes to the age-associated rise of genomic instability in humans. Cell Death Differ. 23: 1765-1777.

- Sinclair J. (1997). ADN, ARN y Proteínas. Cox TM y Sinclair J. *Biología Molecular en Medicina*. (pp 25 – 42). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Torgovnick A y Schumacher B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics* 157 (6): 1-15.
- Xamena N. (1996). DNA: mutación, reparación y recombinación. Tamarín RH. *Principios de Genética* (pp: 459 – 490). Barcelona. Editorial Reverté.