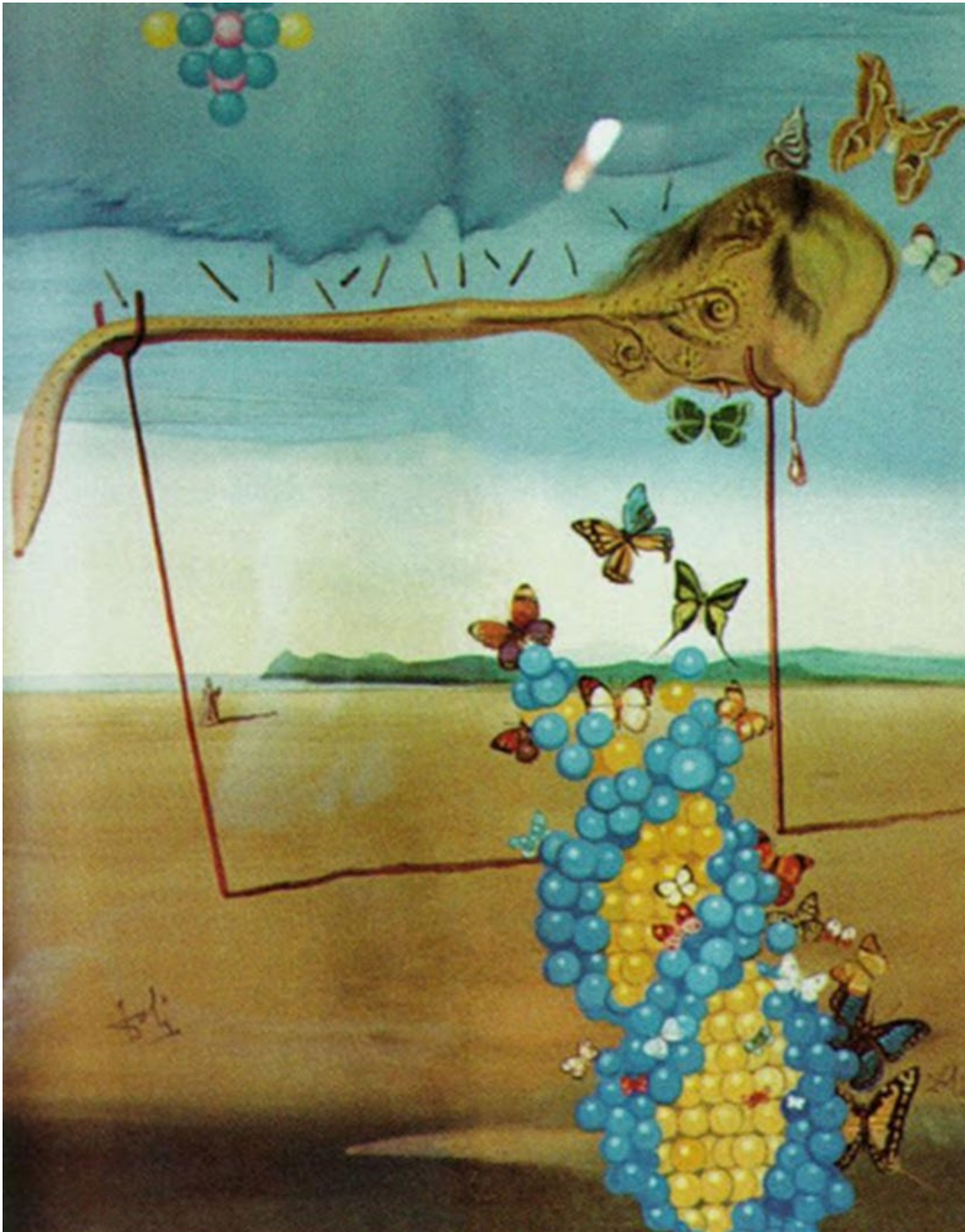


CAPÍTULO 4

Fundamentos genotóxicos y citotóxicos de los efectos biológicos radioinducidos

Alba Güerci

Figura 4.1. Paisaje de mariposas. Salvador Dalí.



Nota. Sierra Valenti X. Un dermatólogo en el museo. Fuente: <http://xsierrav.blogspot.com/2017/02/dali-y-el-adn-i-la-doble-helice-de-la.html>

Mutaciones

Como hemos visto y es bien sabido, el ADN sufre diversos cambios o lesiones en su estructura por la interacción permanente con su entorno. Cuando estas modificaciones no pueden ser resueltas correctamente, se instauran en la molécula de forma permanente. Así se definen a las mutaciones, como un cambio **estable** en el ADN de una célula que se transmite a su descendencia. La estabilidad implica que se perpetúe durante la replicación del ADN en cada copia nueva y que permanezca en cada una de las células hijas.

En la diversidad de los organismos, las mutaciones junto con el proceso de recombinación meiótica, constituyen la principal fuente de variabilidad genética. En tal sentido, cobran un interés especial para procesos vitales tan significativos como la evolución de las especies, la identidad de un individuo, la dinámica u origen del proceso carcinogénico, el diagnóstico prenatal o el tratamiento de determinadas patologías.

Estos cambios, pueden originarse **espontáneamente** por errores durante la replicación del ADN o reacciones que ocurren sobre esta molécula, o también ser **inducidas** por agentes físicos, químicos o biológicos (mutágenos). Si bien en la replicación existe un mecanismo que permite corregir el 99,9 % de los errores que suceden, el número de divisiones celulares desarrolladas a lo largo de la vida de un individuo, hace significativo el número de estas posibles alteraciones. También las bases nitrogenadas pueden sufrir cambios espontáneos (desaminaciones oxidativas que interfieren con al apareamiento) o perderse por inestabilidad del enlace N-glicosídico. El propio metabolismo celular puede generar mutágenos endógenos (radicales libres) que reaccionan con las bases o nucleótidos, modificándolos. De esta manera, las mutaciones más frecuentes se generan debido a situaciones o a la acción de agentes del ambiente intracelular. Por otra parte, se han descrito los daños de las radiaciones ionizantes sobre el ADN, y se ha calificado a este agente como un mutágeno físico.

Las mutaciones pueden darse a lo largo de todo el genoma, tanto en secuencias codificantes como no codificantes y tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial (en este caso se heredan vía materna). Si bien se generan al azar y todas las zonas del genoma tienen la misma susceptibilidad a ellas, cuando ocurren en regiones codificantes desencadenan peores consecuencias. Dado que pueden afectar tanto a la secuencia que codifica la información, como a la secuencia que controla su expresión (reguladora), pueden alterar a la proteína, como así también a su síntesis. Asimismo, los cambios codificantes pueden afectar de diferente manera a la secuencia de aminoácidos, distinguiéndose así entre mutaciones silenciosas y no silenciosas.

Mutaciones Silentes, Silenciosas o neutrales: no se detectan fenotípicamente y por ende no están sujetas a ventajas o desventajas evolutivas, ni influyen en la susceptibilidad frente a enfermedades, pero sí pueden originar diversidad genética a nivel poblacional (variantes polimórficas).

9



Mutaciones NO silenciosas: el cambio en la secuencia de nucleótidos afecta a la secuencia de la proteína, en tanto codifica aminoácidos diferentes. Según como perturbe la función de la proteína pueden ser beneficiosas (menos del 1 %) o deletéreas.

En cuanto al tipo de célula, las mutaciones pueden ocurrir tanto en células germinales, como somáticas. En el primer caso, se producen durante la gametogénesis y pueden transmitirse a todas las células descendientes del cigoto, formado a partir de la unión de ese gameto. Su importancia está dada según la función celular que afecte. Si es esencial, puede derivar en la inviabilidad del organismo y el aborto. Sino, provocar una enfermedad hereditaria. No obstante, algunas mutaciones pueden ser beneficiosas. En general estos cambios son infrecuentes y la mayoría de ellos recesivos. De ser letales no se detectan pues no alcanzan la concepción.

Por el contrario, las mutaciones que suceden en células somáticas, sólo se transmiten a sus células hijas (mitosis), no al organismo completo. Pueden afectar a cualquiera de los 46 cromosomas, de células de cualquier tejido del cuerpo, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. Si bien pueden determinar características normales o patológicas, nunca son heredables. No obstante, son los cambios más frecuentes y en aumento, dada la exposición a mutágenos. También se exacerban con la edad y la alteración de los mecanismos de reparación del ADN. Es importante mencionar que pueden ocasionar graves problemas clínicos, como por ejemplo cáncer, si afectan genes que controlan el ciclo celular.

Figura 4.2. Colores del cáncer.



Nota. Las mutaciones en células somáticas son cambios fundamentales para el proceso carcinogénico. Se irán instaurando según la exposición del tejido a mutágenos y la predisposición genética individual.

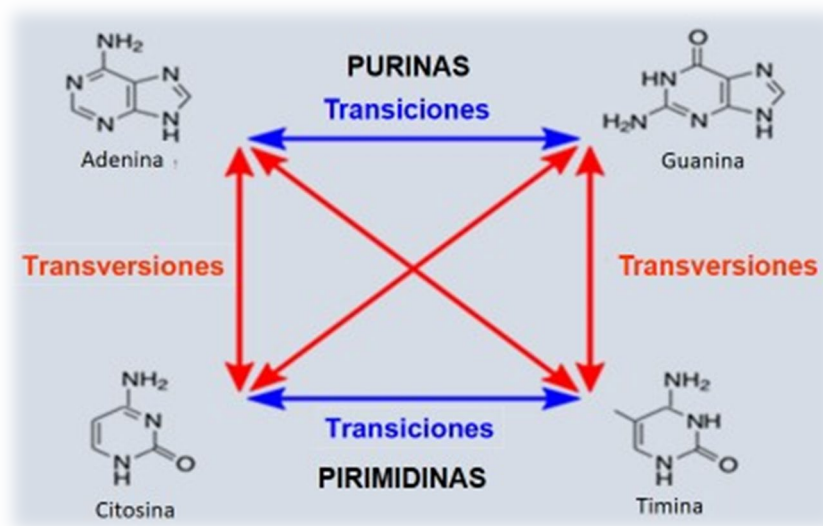
Considerando la magnitud de estos cambios, podemos hablar de **MICROLESIONES** o **mutaciones puntuales**, si involucran uno o pocos nucleótidos. Son los cambios comúnmente conocidos como “Mutación”. Las **MACROLESIONES** o aberraciones cromosómicas involucran grandes rearrreglos. Las lesiones de **orden intermedio** se dan sobre secuencias repetidas del ADN.

Cuando el cambio sucede en una región génica (estructural o reguladora) puede alterar su mensaje y llevar a una enfermedad hereditaria, monogénica o mendeliana, en tanto su forma de transmisión sigue las leyes de Mendel.

Finalmente podemos mencionar que estas modificaciones en la secuencia del ADN responden a tres causas generales: sustituciones, deleciones o inserciones de nucleótidos. En cuanto a las *sustituciones*, implican literalmente un cambio de nucleótido y son comunes tanto en zonas codificantes como no codificantes. Mientras las *transiciones* aluden a cambios de bases del mismo tipo (púricas entre sí o pirimidínicas entre sí), las *transversiones* refieren a cambios de una base púrica por una pirimidínica (o viceversa). Si bien estas últimas tienen el doble de posibilidades de ocurrir, se ha observado que los cambios más frecuentes son las transiciones, especialmente en zonas de ADN no funcional. Por otra parte, mientras que *Deleciones* consisten en la pérdida de uno o más nucleótidos de una secuencia, las *Inserciones* son lo contrario: la aparición de uno o varios nucleótidos adicionales. Ambos cambios suelen ser comunes en el ADN no codificante, pero no en el ADN codificante. Cuando afectan esta zona, pueden ocasionar un cambio en el marco de lectura y presentar un efecto drástico a nivel proteico.

Para visualizar lo expuesto, si la secuencia original fuera: **5'ABCDEFG3'**, una sustitución sería: **5'ABCXEFG3'** (de igual longitud); una deleción: **5'ABCEFG3'** (segmento más corto) y una Inserción: **5'ABCXDEFG3'** (segmento más largo).

Figura 4.3. Cambios moleculares que llevan a la instauración de mutaciones de punto.



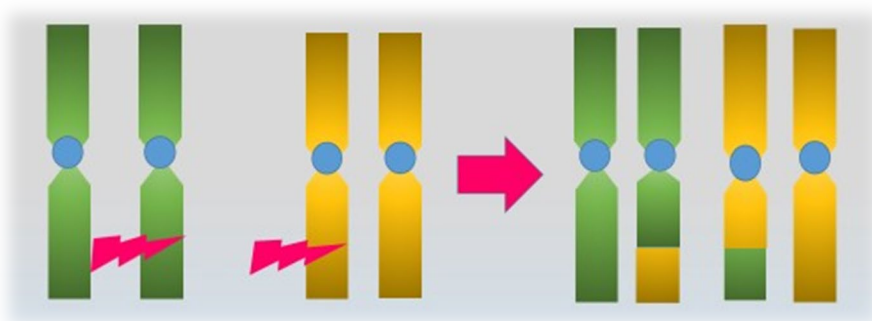
Aberraciones cromosómicas

Desde las primeras décadas del siglo XX, a partir de investigaciones realizadas en *Drosophila* y *Tradescantia*, se pudo comprobar que las radiaciones ionizantes no sólo inducen

modificaciones celulares y genéticas sino también alteraciones estructurales en los cromosomas (ACE, cambios citogenéticos). Las DSBs constituyen las lesiones críticas para instaurar estas alteraciones que dificultan la división celular y fundamentan la letalidad. La irradiación puede inducir rupturas con extremos desapareados y así cohesivos, propensos a reunirse con otros extremos similares estableciendo estas “aberraciones cromosómicas”. Ya en 1938 Sax propone su *Teoría Clásica* que la irradiación induce rupturas en uno o más puntos de los cromosomas (o cromátidas), originando fragmentos que pueden resolverse de distinta manera: 1) las lesiones pueden restituirse correctamente y recomponer la configuración original; 2) pueden fallar en la reunión, dar lugar a la pérdida de fragmentos y originar una deleción; 3) los extremos de las rupturas pueden reunirse con otros extremos de otras rupturas, **redistribuyendo** los fragmentos y originando cromosomas diferentes a los originales. Estas **fusiones ilegítimas** pueden darse en el mismo o diferente cromosomas. En este caso, la proximidad, la densidad de ionización en la trayectoria y distancia recorrida por la radiación, son elementos fundamentales. Considerando que los cromosomas se ubican en dominios nucleares particulares y que esta localización difiere con el tejido, determinados arreglos serán histológicamente más representativos unos que otros. La teoría de Revell, por otra parte, plantea que la irradiación genera una inestabilidad localizada, reactiva con zonas inestables de cromosomas vecinos, dando intercambios y originando ACE (1958). Finalmente, otro modelo propone la unión de fragmentos en sitios no dañados, pero homólogos en secuencia.

En términos moleculares, se propone que la fusión entre las DSBs interactuantes, estaría mediada por el mecanismo de reparación no homóloga (NHEJ). *La aberración cromosómica se generaría cuando dos o más fragmentos doble cadena, del mismo o distinto cromosoma (vecino), se unen ilegítimamente.* Cuando hay muchas rupturas, es posible que los diversos fragmentos del mismo cromosoma se unan a diferentes sitios del genoma, formando aberraciones complejas. Asimismo, los intercambios son más frecuentes que los intracambios, y la diferencia es más acentuada para radiaciones electromagnéticas. No obstante, las radiaciones corpusculares pueden inducir rearrreglos más complejos, dado que en su trayectoria se generan varios puntos de ruptura (fue observado en linfocitos de astronautas).

Figura 4.4. *Formación de translocaciones cromosómicas debido a DSBs en cromosomas no homólogos.*



Teniendo en cuenta la respuesta observada, se puede pensar que la trayectoria de un electrón rápido puede romper un cromosoma en varios lugares y generar intercambios proporcionales a la dosis, independientemente de la tasa, si es baja. A mayores dosis y tasas, es más probable que las DSBs se formen por trayectorias independientes de distintas partículas. De esta manera, para radiaciones de bajo LET, la formación de estos cambios sigue una relación lineal cuadrática. El componente cuadrático respalda la interacción entre diferentes lesiones y desaparece cuando la tasa es baja, debido posiblemente a la reparación. Corresponde a uniones entre fragmentos derivados de rupturas causadas por dos o más trayectorias electrónicas diferentes, sobre el mismo cromosoma o más frecuentemente sobre dos. Para radiaciones de alto LET, la relación es lineal, mostrando que cada partícula actúa independientemente y de manera constante, sea cual sea la tasa y la dosis. También se destaca que la formación de AC disminuye con la disminución de la tasa de dosis y la LET, situaciones que favorecen el proceso de reparación.

Por otra parte, considerando que los cromosomas representan el máximo grado de condensación de la cromatina durante la división celular, las aberraciones que se observan en metafase pueden incluir al cromosoma o a la cromátide. Las primeras resultan de la irradiación de la célula en interfase temprana (G1/G0), antes de la duplicación del ADN. En este caso, si la ruptura radioinducida afecta sólo a una cadena de la cromatina, durante la fase S la cadena se replica idéntica y replica así la ruptura radioinducida (involucrando la cromátida). Si ambas cadenas están rotas, el proceso generará una **aberración tipo cromosoma**. Por otra parte, si la exposición ocurre más tarde, cuando ya pasó la fase S y el material se ha duplicado (G2), las rupturas o intercambios serán observados en una sola cromátida (**aberraciones tipo cromátida o subcromátida**). En este caso, lejos del centrómero, los brazos pueden estar separados y es razonable suponer que la radiación puede alterar una cromátida sin afectar la hermana (al menos no en el mismo lugar). Ambos tipos pueden observarse después de la irradiación en la fase S.

Figura 4.5. Daño en metafase según la lesión y etapa del ciclo celular donde se produjo la irradiación.

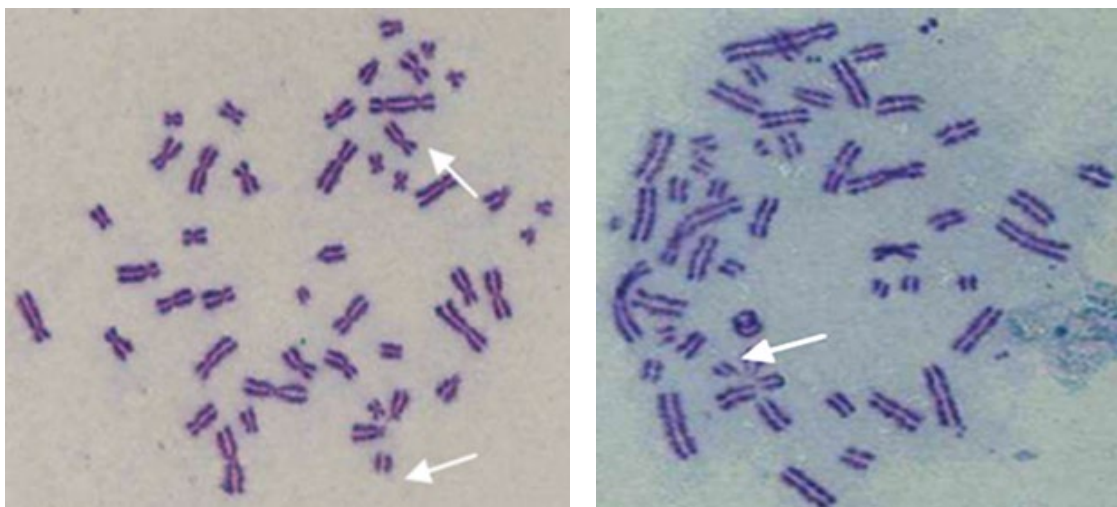


Si se tiene presente que pueden formarse muchas clases de aberraciones cromosómicas, entendemos que puede ser más útil limitarnos a describir aquellos rearrreglos que resultan letales (inestables) para la célula o que sin comprometer la viabilidad están involucrados en la carcinogénesis. Dentro del primer grupo se encuentran distorsiones groseras como dicéntricos, anillos y puentes en anafase. La formación de **dicéntricos** involucra un intercambio entre dos cromosomas separados. Si se produce una ruptura en cada uno de ellos en G1 y los extremos cohesivos están próximos pueden unirse. Este intercambio puede ser replicado luego en fase S, dando como resultado un cromosoma distorsionado con dos centrómeros. También resultan dos fragmentos sin centrómero (**acéntricos**) que pueden perderse en la siguiente metafase. En el caso de los **anillos**, la radiación puede inducir una ruptura en cada uno de los brazos de una cromátide, tempranamente en el ciclo celular. Los extremos pegajosos pueden unirse formando un anillo y un fragmento. Posteriormente, durante la fase S el cromosoma replica. Nuevamente los fragmentos acéntricos pueden perderse durante la división celular. Mientras la frecuencia espontánea de dicéntricos es 1/ 1500 células, la de anillos céntricos es 10 veces menor. En cuanto a la frecuencia de dicéntricos radioinducidos, se ha observado que disminuye con la tasa y el fraccionamiento, pero aumenta con la LET. Finalmente, otra aberración particular corresponde a los **puentes en anafase**. Ocurren por rupturas tardías en la fase G2 luego de la replicación, e involucrando ambas cromátidas del mismo cromosoma. Los extremos pegajosos pueden reunirse incorrectamente en una unión “hermana”. Durante anafase, cuando cada set cromosómico migra a polos opuestos, se formará un puente con la sección de cromatina entre los dos centrómeros. Los fragmentos se pierden porque son acéntricos. Estos cambios groseros son siempre letales en tanto inducen “**muerte reproductiva**” de la célula.

Al mismo tiempo, tenemos dos tipos de rearrreglos que no son letales (estables): las translocaciones recíprocas y las deleciones pequeñas. Una translocación involucra rupturas en dos cromosomas, antes de ser replicados (G1), e implica intercambio entre los cromosomas lesionados. Están asociadas a varias enfermedades, como linfomas y ciertas leucemias (por activación de oncogenes). Recordemos que los cromosomas no están dispuestos al azar. Algunos son más propensos a estos cambios (por ejemplo, el cromosoma 8 y 9). Si se produce una ruptura en un cromosoma puede originarse una **delección terminal**. En el caso de las **deleciones intersticiales** se involucran dos rupturas en el mismo brazo y conduce a la pérdida de la información genética entre ellas. Esto puede impactar en la activación de genes supresores de tumor, si están en esa zona. También, como en el caso de ciertos tumores tiroideos infantiles, se pueden observar **inversiones**, es decir cambios que involucran un giro de 180 grados del segmento que queda entre dos cortes, antes de volver a reunirse en el mismo cromosoma.

Como observación particular, se destaca que los reordenamientos genómicos se vuelven más comunes a medida que los organismos envejecen, en última instancia, conduciendo a la desregulación de la transcripción y a las neoplasias.

Figura 4.6. *Dicéntricos, anillos y fragmentos radioinducidos, observados durante metafase mediante microscopía óptica a 1000 aumentos.*



Nota. Gentileza Lic. María Rosa Taja. Laboratorio de Dosimetría Biológica. Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN)

Dosimetría biológica

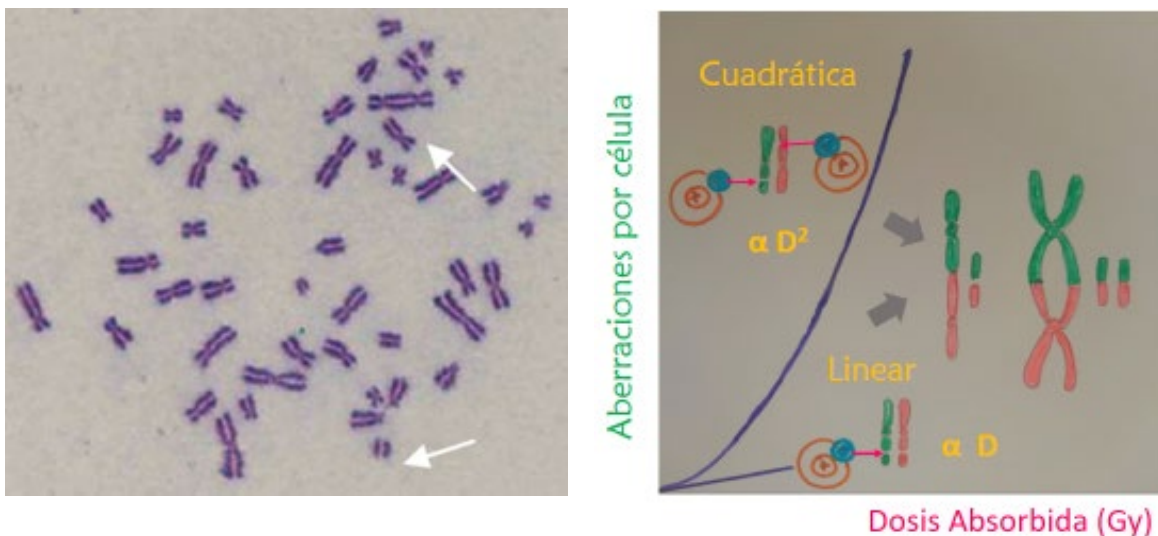
Las aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos, han sido ampliamente utilizadas como biomarcadores de exposición a la radiación. En muestras de sangre obtenidas para evaluación citogenética, luego de pocos días o semanas desde la exposición total del cuerpo a la radiación, la frecuencia de anillos y dicéntricos es indicativa de la dosis recibida. Estas células de la sangre en G_0 , se estimulan para dividirse con fotohemaglutinina y se detienen en metafase para el análisis de aberraciones cromosómicas estructurales. La dosis puede estimarse, a partir de la comparación con cultivos celulares expuestos *in vitro* a dosis conocidas. Como se mencionó oportunamente, estos arreglos siguen una relación lineal cuadrática con la dosis (esperable de la interacción de dos rupturas cromosómicas). El componente lineal es una consecuencia de que las dos rupturas resultan de la interacción de una partícula cargada simple. Si las dos rupturas resultan de distintas partículas, la probabilidad es una función cuadrática de la dosis. Si se contabilizan un número suficiente de metafases (entre 500 a 1000) la evaluación citogenética puede detectar la exposición reciente y total del cuerpo, hasta 0.25 Gy. El estudio puede ser útil para distinguir la exposición real cuando no se conoce el escenario, como ocurre en accidentes.

Es importante mencionar que la vida de los linfocitos ronda los 1500 días y sufren recambio lento del torrente sanguíneo. Esto hace que la circulación con aberraciones inestables (dicéntricos que no pasan la división celular) vaya disminuyendo con el tiempo luego de la exposición. En el caso de las translocaciones (aberraciones estables), si bien son más difíciles de detectar suelen persistir más (se han detectado pasados más de 50 años de las exposiciones de Hiroshima y Nagasaki). Si bien su frecuencia correlaciona bien con la dosis total recibida y se asemeja a la de dicéntricos, cuando transcurre mucho tiempo de

la exposición no se consideran para dosimetría biológica. Con respecto a la cuantificación de anillos, rupturas, inversiones y otros intercambios, podría ser subjetiva y necesita aún de revisiones y validaciones. La vida media de los linfocitos con cambios inestables es de 3 años y mayor tiempo para aberraciones estables.

En cuanto a las dosis, pueden observarse aberraciones cromosómicas estructurales a partir de 0,1 Gy. Entre 0,5–2 Gy en promedio se podría encontrar una aberración/célula. Para radiación gamma a 0,5 Gy se esperan 2 dicéntricos/100 células. A dosis bajas son difíciles de detectar por potencia estadística insuficiente o debido a su eliminación por reparación o muerte celular.

Figura 4.7. Función matemática que explica el daño cromosómico letal.



Nota. Metafase con dicéntricos (izquierda). Gentileza Lic. María Rosa Taja. Arreglo lineal – cuadrático (derecha).

La aplicación de la dosimetría biológica permite resolver diversos escenarios de exposición, como por ejemplo accidentes médicos. También, en el caso de astronautas, mineros del uranio o habitantes de lugares con altos niveles de radiación (Kerala, India), se han observado diferentes aberraciones cromosómicas en sus linfocitos periféricos.

Como corolario se destaca que las aberraciones cromosómicas representan macrolesiones que no han sido bien reparadas y se correlacionan con la letalidad y mutagénesis radioinducida. Así comprendemos porque consideran una de las bases de los efectos tisulares radioinducidos.

La significancia de la muerte para la vida

“La muerte y la vida son transformaciones incesantes. No son el final de un principio. Una vez que consigamos comprender este principio, podremos dar igual valor a la vida y a la muerte”

-Chuang Tzu (369-286 a.C.) citado en S. Critchley, El libro de los filósofos muertos.

Figura 4.8. *La muerte de Pablo Escobar. Fernando Botero.*

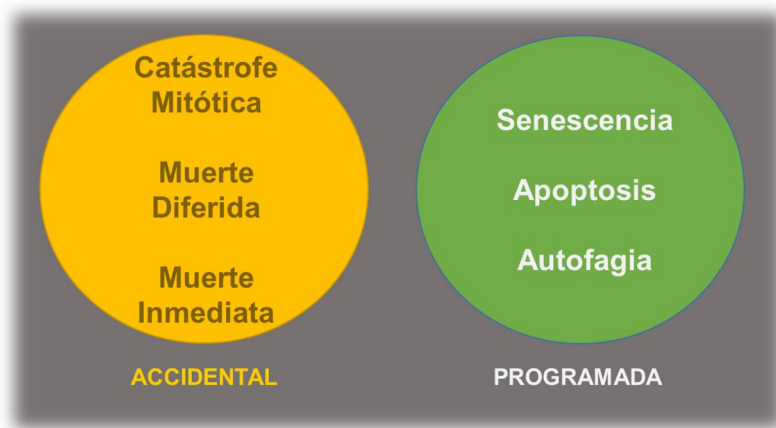


Nota. <https://historia-arte.com/obras/muerte-de-pablo-escobar>

Muerte celular

Como hemos visto, la radiación ionizante induce modificaciones en los cromosomas. Si bien el efecto depende de la estirpe celular, carga genética y momento en el que ocurra la exposición (fase del ciclo celular), estos cambios llevan a la pérdida del potencial replicativo de las células. En términos de muerte celular, los procesos no programados como la *Catástrofe Mitótica*, la *Muerte Diferida* y la *Muerte Inmediata*, junto con las vías programadas de *Senescencia*, *Apoptosis* y *Autofagia* constituyen las rutas canónicas de los sucesos letales. La medida en la que cada uno de estos procesos acontece, no sólo depende de la dosis de radiación, sino también de la integridad de ciertos genes, como por ejemplo p53, con función crucial para la apoptosis y senescencia inducidas por la radiación, entre otros agentes citotóxicos.

Figura 4.9. Consecuencias letales de la irradiación.



Catástrofe o muerte mitótica

Este tipo de muerte celular alude a la incapacidad de ejecutar eficazmente la mitosis. Se correlaciona con la presencia de aberraciones cromosómicas no reparadas, generalmente de gran envergadura. Es la principal vía de letalidad provocada por la radiación ionizante y que prevalece en células epiteliales.

La catástrofe mitótica implica la inducción prematura a mitosis, antes que terminen las fases S y G2. Comienza con la condensación desigual y precoz de la cromatina alrededor del núcleo. El proceso es promovido por la inhibición de proteínas que controlan el ciclo celular en G2 (ATM, ATR, CHK1, CHK2 y p21). En etapas avanzadas, se hincha el citoplasma y aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática; posteriormente hay lisis citoplasmática con destrucción de organelas (mitocondrias) y dispersión del contenido celular en el espacio intercelular. El núcleo se mantiene hasta etapas avanzadas y luego se degrada.

Este tipo de muerte puede ocurrir en la primera división celular o subsiguiente a la exposición a radiaciones ionizantes. Las mitosis aberrantes producen segregación atípica de los cromosomas y la división celular implica formación de células gigantes, con morfología nuclear aberrante, núcleos multipolares (aparecen luego de una multiplicación anárquica de centrómeros) y micronúcleos que se eliminan por exocitosis ocasionando la pérdida de material genético.

Muerte diferida

En el caso que la irradiación induzca aberraciones cromosómicas más leves que dicéntricas o rearrreglos complejos, generalmente se logra la división celular y transmisión de los cambios a las próximas generaciones. Las translocaciones, deleciones o inversiones son compatibles con la sobrevivencia y escapan de su eliminación por muerte celular. No obstante, las células con estos cambios pueden morir más tarde o demostrar inestabilidad cromosómica mediante clones con anomalías cariotípicas, que evolucionan a lo largo de las divisiones celulares y llegan a una muerte diferida. Así, este proceso correlaciona con bajo potencial clonogénico y frecuentemente aparición de microcolonias.

Figura 4.10. *La persistencia de la memoria.* Salvador Dalí..



Nota. Fuente: <https://historia-arte.com/obras/la-persistencia-de-la-memoria>

Muerte inmediata

Ocurre a minutos o pocas horas de producida la exposición a dosis altas de radiación. Puede interpretarse como un suicidio celular, dado por el agotamiento energético debido a la síntesis masiva de polímeros. La hiperactivación de la enzima PARP-1 inducida por las SSBs, promueve la elongación de polímeros de ADP ribosa con gasto de NAD^+ . Esta síntesis intensiva de polímeros es acompañada por un gasto vertiginoso de NAD^+ y disminución concomitante de ATP, lo que lleva a la muerte rápida de la célula. Los cambios morfológicos cursan con pérdida de la integridad de la membrana plasmática, activación de los lisosomas y degradación de las organelas (principalmente mitocondrias).

Senescencia

Alternativamente a la inducción de apoptosis, la activación y sobreexpresión de p53 por radiación ionizante y subsecuente expresión de p21, llevan a detener irreversiblemente el ciclo celular en G1. Este fenómeno se observó en fibroblastos diploides y células tumorales expuestas a una dosis de 40 a 60 Gy (únicas). Este arresto del ciclo celular sin proceso lítico, tiene como función eliminar la capacidad reproductiva. No obstante, la célula continúa metabólicamente activa. Dado que las células irradiadas acumulan daño clastogénico, este proceso podría responder a un mecanismo de protección carcinogénico. Pero también, representar una alternativa de evasión de las células tumorales hacia el daño radioinducido: permanecer arrestadas hasta que las condiciones del microambiente las estimulen y puedan avanzar generando recidivas, mucho tiempo después de la radioterapia.

Apoptosis

Este término griego, alude a la caída otoñal de las hojas de los árboles. Su analogía celular busca describir como a partir de ciertos estímulos, una célula activa el camino que la lleva a su muerte. El proceso programado desde el genoma, tiene como función mantener la homeostasis en distintas poblaciones celulares y sucede tanto en condiciones fisiológicas (desarrollo embrionario, desprendimiento del endometrio, etc.), como así también, en patologías oncológicas, SIDA y otras virosis (hepatitis B o C).

Durante la apoptosis se observan cambios morfológicos de la célula, como la condensación de la cromatina en la periferia nuclear y su posterior fragmentación. También la célula se redondea y reduce el volumen celular, conservando aún la membrana plasmática. Finalmente, se forman “pseudópodos” y se pierde la integridad. Si bien junto con cambios en las organelas

se originan cuerpos apoptóticos característicos, los macrófagos suelen ingerir previamente a las células, antes que formen estas estructuras.

Existen tres cambios moleculares que caracterizan la apoptosis: 1) activación de caspasas (cisteína-proteasas), 2) fragmentación de la cromatina y algunas proteínas y 3) cambios de la membrana plasmática y reconocimientos de macrófagos, que resulta en la fagocitosis celular. La activación de las caspasas (punto central del mecanismo), posibilita el clivaje de proteínas vitales y la desorganización del andamiaje nuclear y del citoesqueleto citoplasmático. También se activan endonucleasas que degradan al ADN nuclear.

La apoptosis se puede ejecutar por tres vías diferentes, según la dosis de radiación y estirpe celular. Generalmente, la radiación ionizante induce la *vía intrínseca*, que implica un aumento de la permeabilidad mitocondrial y liberación de moléculas proapoptóticas hacia el citoplasma, como el citocromo-c, y la formación del apoptosoma. También se puede dar la *vía extrínseca* a través del *receptor de muerte*. Finalmente, la *Vía de estrés de membrana* involucra la liberación de ceramidas y señalización a través de un segundo mensajero. En los dos primeros casos es determinante la activación de p53 en relación a la respuesta al daño en el ADN (DDR) y oportunidad de arresto del ciclo celular. Veamos en que consiste cada vía.

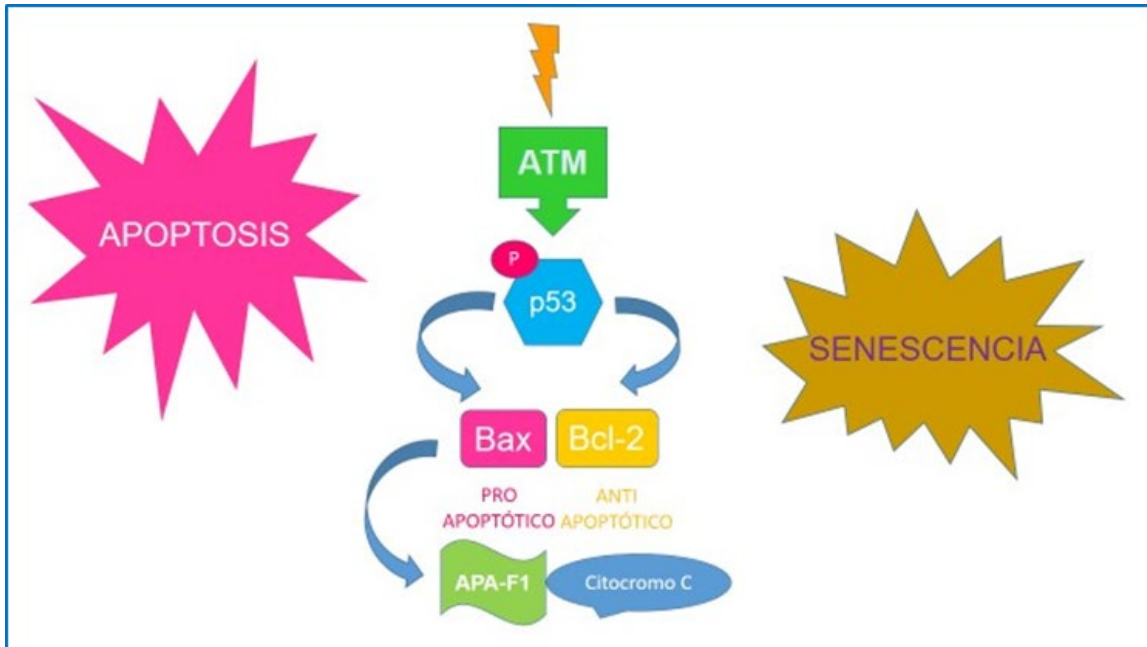
Vía intrínseca (o mitocondrial)

Se inicia con estímulos internos como el daño genético irreparable, la hipoxia o el estrés oxidativo severo, entre otros. En el caso de la irradiación, esta vía se instaura luego de la inducción de SSB y DSB sin posibilidad de reparación. La respuesta a este daño al ADN se constituye por el tipo de activación de p53, dando mayores posibilidades hacia la apoptosis que a la detención del ciclo celular. Este factor de transcripción se acumula en el núcleo y activa la expresión de genes proapoptóticos (BAX, entre otros) y reprime la expresión de genes antiapoptóticos (BCL2, entre otros). Así, el control del evento ocurre por proteínas (proapoptóticas o antiapoptóticas) que gobiernan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, abriendo (BAX) o cerrando sus poros (BCL2). El balance entre proteínas pro y antiapoptóticas determina si se va a iniciar o no el proceso. El mismo, se pone en marcha y avanza mediante caspasas que se van activando por clivaje proteolítico (dado que son sintetizadas de forma inactiva). Esta cascada apoptótica depende de la estabilización de p53, por inhibición de su degradación por el proteosoma y también de eventos en la mitocondria.

Bajo condiciones normales BCL-2 está presente en la membrana y ejerce efecto antioxidante manteniendo el poro cerrado. Cuando predomina BAX, se abre el poro y libera el citocromo c, que se une a una proteína adaptadora (ApoF1: factor de activación de proteasa apoptótica 1) y forma un complejo (Apoptosoma) donde se ensamblan procaspasas iniciadoras para clivarse y activar a otras procaspasas, induciendo una reacción en cascada. Posteriormente, hay proteólisis de proteínas de reparación, de ensamblaje de la cromatina y de polimerasas. En la etapa final se liberan nucleasas y se degradan proteínas de sostén de la membrana plasmática.

Como punto singular, se menciona que algunas proteínas de choque térmico (HSP) que interfieren con la formación del apoptosoma e impiden este proceso en células tumorales, podrían ser blanco de terapias de radiosensibilización.

Figura 4.11. Secuencia de sucesos programados.



Nota. Tanto la apoptosis como la senescencia dependen de la activación de p53

Vía extrínseca (o del receptor de muerte)

La apoptosis radioinducida también puede darse por esta vía canónica, que se activa por p53, cuando los ligandos de muerte se unen a sus receptores. Entre ellos, los más conocidos son el receptor del Factor de Necrosis Tumoral $TNF\alpha$, y una proteína relacionada llamada Fas (CD95). Tienen un dominio intracelular que luego de su unión al ligando específico, recluta proteínas adaptadoras y activa a las caspasas iniciadoras para desencadenar la cascada de reacciones de sus homólogas efectoras. Esta vía también puede promoverse por falta de señales de crecimiento o pérdida de adhesión (anoikis).

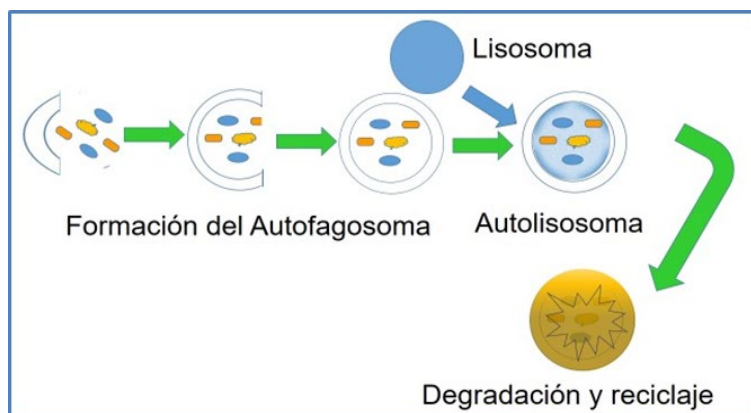
Vía de estrés de membrana

Este proceso es independiente del daño al ADN y de p53. La RI induce la formación de ROS, que inflige daño oxidativo a lípidos de la membrana plasmática e implica la activación de la Esfingomielinasa, que lleva a la hidrólisis de esfingomielina de la membrana y se libera ceramida como segundo mensajero, que conduce a la acción de las caspasas.

Autofagia

Es un proceso regulado por la célula, que posibilita la degradación ordenada y el reciclaje de componentes celulares. Permite eliminar componentes innecesarios o disfuncionales. Se establece por la digestión de organelas dañadas, como Cuerpos de Golgi, retículo endoplásmico y polirribosomas. Contrariamente a la apoptosis, se degradan las mitocondrias pero se preserva el citoesqueleto. Así, los componentes citoplasmáticos se aíslan del resto de la célula dentro de una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma, que se fusiona con un lisosoma, procesando y eliminando desechos; eventualmente el contenido de la vesícula (autolisosoma) se degrada y recicla. Las proteínas específicas que se activan son las Catepsinas.

Figura 4.12. Pasos secuenciales del proceso de autofagia.



La autofagia posibilita la adaptación celular en condiciones de privación de reservas metabólicas. De esta manera, representa un mecanismo de supervivencia y probablemente es cardinal para la homeostasis celular. En el caso extremo de inanición, la descomposición de los componentes celulares promueve la supervivencia celular al mantener los niveles de energía célula.

Por otra parte, este proceso juega un rol importante en la supervivencia de las células tumorales, que lo usan como una forma de combatir el estrés. Se ha observado que su inhibición mejora la eficacia de las terapias contra el cáncer. Se ha sugerido que podría ser un proceso antagónico a la apoptosis radioinducida y constituir un factor de radioresistencia.

La identificación de genes de esta vía en la levadura, posibilitó deducir el mecanismo de este proceso, considerado de tal significancia, que llevó a la concesión del Premio Nobel de Medicina al investigador japonés Yoshinori Ohsumi.

Se dará un cierre a esta sesión, resumiendo en la siguiente tabla, los diferentes procesos letales que puede sufrir una célula de mamífero, luego de ser expuesta a dosis altas de radiación ionizante.

Tabla 1.4. Clases de muerte celular radioinducida en relación al estirpe celular.

Muerte Inmediata	Senescencia	Muerte Mitótica Muerte Diferida	Apoptosis	Autofagia
No Programada	Programada	No Programada	Programada	Programada
Cél. Epiteliales	Fibroblastos	(Deficientes en p53)	Linfocitos	Neuronas
Cél. Endoteliales		Cél. Epiteliales	Timocitos	Cél. Epiteliales
Miocitos		Próstata		
Fibroblastos		Acinos Salivares		
		Criptas Intestinales		

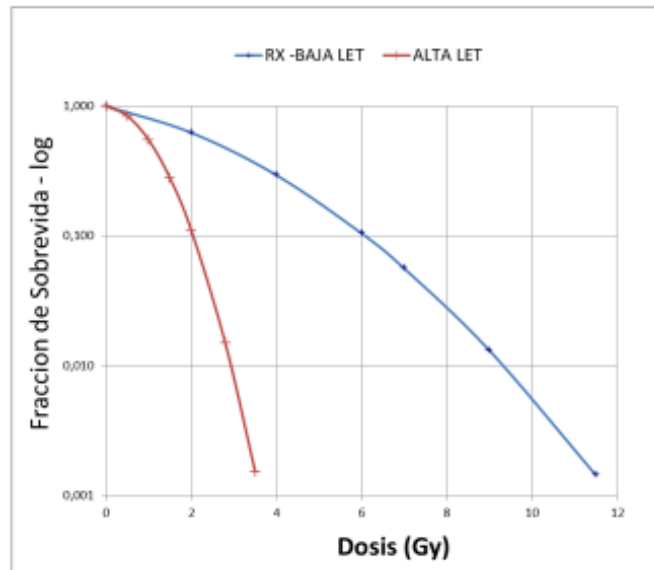
Curvas de sobrevida

Estas curvas describen la relación entre la dosis de radiación absorbida por una población celular y la fracción de células que sobrevive a esa exposición. Fueron inicialmente realizadas por Puck y Marcus en 1956, a partir del trabajo con células cultivadas *in vitro* y posteriormente en 1959 con animales de laboratorio.

Ante todo, se debe tener presente que la muerte celular puede concebirse de diferentes maneras. Por ejemplo para células diferenciadas que no proliferan (nervio, músculo, células secretoras), puede ser entendida como la pérdida de una función específica. En tanto, para células en proliferación, como las *stem cells* del sistema hematopoyético o del epitelio intestinal, es más apropiado considerar la pérdida de la capacidad de proliferación sostenida (muerte reproductiva). Si bien una célula puede estar estructuralmente intacta y realizar sus funciones vitales, puede haber perdido su capacidad de dividirse más allá de algunas pocas veces. Contrariamente, cuando mantiene la capacidad de proliferar indefinidamente (células tumorales), es relevante para el ámbito de la radioterapia, donde se busca abolir ese potencial clonogénico. Mientras que en sistemas no proliferantes la dosis para destrozarse la función celular alcanza a 100 Gy, la dosis letal promedio para lograr pérdida de capacidad proliferativa, usualmente es cercana a 2 Gy.

A través del ensayo clonogénico (mide la capacidad de una célula de formar colonias mediante divisiones sucesivas), se ha logrado construir curvas de sobrevida a diferentes dosis de radiación, para diversas líneas celulares de mamíferos. Por convención, se representan en coordenadas semilogarítmicas. Las dosis se ubican en las abscisas, sobre escala lineal y la fracción de sobrevida en las ordenadas, en escala logarítmica. Con exposición X o γ a una tasa de dosis estándar (1Gy/min), en medio oxigenado, originan frecuentemente una curva de aspecto convexo con un hombro inicial.

Figura 4.13. Efecto de la LET sobre la curva de sobrevivencia.



Su abordaje simple refiere que a dosis bajas, para radiación de baja LET (escasamente ionizante) como los rayos X, la curva comienza como una trama lineal – logarítmica, con una pendiente inicialmente finita. Esto es, la fracción de sobrevivencia es una función exponencial de la dosis. A dosis mayores la curva forma un “hombro”, en una zona de unos pocos Grays (probablemente por reparación de lesiones), y a dosis mayores vuelve a enderezarse y retoma una función exponencial. Este escenario generalmente se presenta en las dosis fraccionadas utilizadas en radioterapia. Por contraste, para radiaciones densamente ionizantes (alta LET), como las partículas alfa o neutrones de baja energía, la curva es recta desde el origen, descifrando que la sobrevivencia se aproxima a una función exponencial de dosis.

Si bien se han esbozado diversas interpretaciones biológicas, este *Modelo Lineal Cuadrático* (MLQ) es el más utilizado en el ámbito de la Radioterapia, por ser una representación adecuada de los datos y presentar dos parámetros fácilmente ajustables (α y β). Asume que hay dos componentes para el efecto letal de la radiación: uno que es proporcional a la dosis, y otro al cuadrado de la dosis. La noción de un componente de inactivación celular que varía con el cuadrado de la dosis, introduce el concepto de acción dual de la radiación. Esta idea remonta a trabajos con cromosomas, donde varias aberraciones cromosómicas eran el resultado de dos rupturas de ADN independientes (dicéntrico, anillo). La expresión para la curva de sobrevivencia es:

$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ en la cual S es la fracción de células que sobreviven a una dosis D , y α y β son constantes.

Cuando el componente del daño letal proporcional a la dosis, es igual al componente del daño letal referido al cuadrado de la dosis: $\alpha D = \beta D^2$ tenemos la relación $D = \alpha/\beta$. Es la dosis en la cual, ambos componentes contribuyen por igual a la letalidad radioinducida y ayuda a caracterizar el hombro. Una característica de la relación lineal cuadrática, es que la curva está continuamente “doblando”, no presenta un final recto.

El ajuste de estas curvas a una función matemática, da la posibilidad de relacionar y comparar resultados obtenidos a partir de distintos tipos de células. También de cuantificar el efecto cuando se modifican determinadas condiciones (tasa de dosis, presencia de radiomoduladores o factores de crecimiento, etc.). No obstante, se debe tener cuidado al adjudicar a estas expresiones matemáticas un significado biológico. Si bien estas curvas presentan buena correlación *in vivo*, resta resolver que ocurre con la interacción de la célula o tejido irradiado con su microambiente normal o tumoral. Por otra parte, no hay modelo matemático que pueda integrar la diversidad de lesiones radioinducidas en las células y la versatilidad de respuesta. Hay diferentes genes que se expresan y la radiosensibilidad varía con las etapas del ciclo celular o la aneuploidía de ciertas líneas. De esta manera, los modelos deben considerarse sólo como una herramienta de análisis matemático.

En términos pragmáticos, el MLQ se utiliza desde hace varias décadas en radioterapia, dado que presenta un buen ajuste entre 0,5 y 10 Gy. La correlación entre el valor de supervivencia a 2Gy y la respuesta radioterapéutica es directa. En su uso cotidiano para dosis mayores a 1 Gy, este modelo permite adaptar y probar alternativas de fraccionamiento a la situación clínica. No obstante, para valores menores a 0,5 Gy la diferencia con el dato experimental, limita su validez.

Factores que influyen en la respuesta celular a la irradiación

Las curvas de supervivencia posibilitaron evidenciar los factores más significativos que afectan la respuesta celular a la radiación. El efecto a una exposición radiante, no sólo dependerá del tipo de célula y de la dosis o de su tasa, sino también como hemos visto, de la presencia de oxígeno (grado de vascularización del tejido) que exacerba la acción indirecta de las radiaciones o de radioprotectores que mitigan este mecanismo. Asimismo será de suma importancia la etapa del ciclo vital que atraviesa la célula cuando recibe la exposición.

Las células de mamífero presentan un máximo de radiosensibilidad en G2 y M y un máximo de radioresistencia en la fase S tardía del ciclo celular. En G1 la sensibilidad a la radiación es intermedia, pero varía con la línea celular. Dado que la frecuencia de lesiones genotóxicas radioinducidas no depende del ciclo celular, se supone que las diferencias de radiosensibilidad se relacionan con la reparación. Así, mientras en mitosis se observa que las rupturas se mantienen, debido posiblemente a la inaccesibilidad de la maquinaria de reparación por el grado de compactación de la cromatina, la eficacia de estos mecanismos en la fase S, sería la base de la alta radioresistencia observada.

En relación al ciclo celular, también es importante mencionar que la radiación altera su progresión (*redistribución radioinducida*). En las células de mamífero (salvo las que presentan mutaciones en ATM), se observa una detención en G2, de aproximadamente 1 hora/Gy. A dosis menores a 0,1 Gy hay una gran dispersión en la distribución y resolución de las lesiones.

Finalizando este punto y como factor de gran significancia se entiende que la calidad de la radiación debe ser considerada ante todo, en tanto radiaciones de distinta LET, pueden variar en

la dosis que produce un respuesta dada, aún en las mismas condiciones. Así, se define como *Eficacia Biológica Relativa (EBR)*, a la relación de dosis que permite comparar que dosis de una radiación particular hay que entregar, para alcanzar el mismo efecto biológico inducido por una radiación conocida. Por ejemplo, la EBR de los protones y neutrones es 10 y la de los rayos X y γ de 1 tomando como referencia la dosis de rayos X de 250 KeV.

Referencias

- Figura 4.1. Sierra Valentí X. (2017). Dalí y el ADN (I): La doble hélice de la vida. <http://xsierrav.blogspot.com/2017/02/dali-y-el-adn-i-la-doble-helice-de-la.html>.
- Figura 4.8. Iborio E. (2018). La muerte de Pablo Escobar. <https://historia-arte.com/obras/muerte-de-pablo-escobar>.
- Figura 4.10. Bolaño E. (2017). La persistencia de la memoria. <https://historia-arte.com/obras/la-persistencia-de-la-memoria>.
- 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.
- Favaudon, V. (2008). Efectos celulares de las radiaciones ionizantes. Radiosensibilidad, ciclo celular y muerte celular. Tubiana M. *Radiobiología*. Tercera Edición (pp 187 - 231). Editorial Hermann/Medicina. París.
- Hall, EJ and Giaccia A. (2012). Cell Survival Curves. Hall, EJ and Giaccia A. *Radiobiology for the Radiologist*. Seventh Edition. pp 35 - 47. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.
- Hall, EJ and Giaccia A. (2012). Molecular Mechanisms of DNA and Chromosome Damage and Repair. Hall, EJ and Giaccia A. *Radiobiology for the Radiologist*. Seventh Edition. pp 23 - 33. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.
- Haustermanns K, Withers HR. (2004). The biological basis of fractionation. *Rays*. 29 (2): 231-236.
- International Atomic Energy Agency. IAEA. (2010). *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students*, Training Course Series No. 42, Vienna.
- Lehnert S. (2008). Radiation induced apoptosis. Lehnert S. *Biomolecular action of ionizing radiation* (pp 279-301). New York. Taylor Francis.
- Maier P, Hartmann L, Wenz F and Herskind C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci*. 14; 17 (1): 102
- Ruiz, A. (1996). *Citogenética*. Tamarín RH. *Principios de Genética*. pp: 175 - 195. Barcelona. Editorial Reverté.
- Xamena N. (1996). DNA: mutación, reparación y recombinación. Tamarín RH. *Principios de Genética* (pp: 459 – 490). Barcelona. Editorial Reverté.