



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Daño al ADN, mecanismos de reparación y variaciones tras la diferenciación
partiendo de células troncales humanas.**

(Trabajo Monográfico de Actualización)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Jonathan Lozano Salgado



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS**

VOCAL: **Profesor: MARÍA ELENA IBARRA RUBIO**

SECRETARIO: **Profesor: MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

2° SUPLENTE: **Profesor: FRANCISCO SANCHES BARTÉZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. NUEVA SEDE. DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Mahara A. Valverde Ramírez

SUSTENTANTE:

Jonathan Lozano Salgado

Abreviaturas

53BP1	Proteína de unión a p53-1
5meC	5-metilcitocina
5-OHU	5-hidroxiuracilo
6-4PP	6-4 Pirimidin pirimidona
8-oxoA	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
AID	Desaminasa de activación inducida
AP	Apurínicos/Apirimidínicos
APE1	AP endonucleasa-1
APOBEC	Polipéptido catalítico de la enzima apolipoproteína B mRNA editora
ATM	Proteína ataxia telangiectasia mutada
ATR	Proteína ataxia telangiectasia relacionada a Rad3
BER	Reparación por escisión de bases
BRCA	Gen de susceptibilidad a cáncer de mama 1
CAK	Complejo de la cinasa activadora de CDKs
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CHK1/CHK2	Cinasa de punto de monitoreo 1/2
CPDs	Dímeros de ciclobutano pirimidina
CSR	Recombinación de cambio de clase
DDR	Respuesta al daño en el ADN

DNA-PK	Proteína cinasa ADN-dependiente
dRP	Desoxirribosa fosfato
DSB	Rupturas de cadena doble
ECC	Células de carcinoma embrionarias
EGC	Células germinales embrionarias
EpiSC	Células troncales de epiblasto
ESC	Células troncales embrionarias
Exo1	Exonucleasa 1
FANCM	Proteína Fanconi anemia, grupo de complementación M
fapyA	4,6-diamino-5-formamidopirimidina
fapyG	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
FEN-1	Endonucleasa flap-1
GG-NER	Reparación global del genoma por escisión de nucleótidos
Gy	Gray
HRR	Reparación por recombinación homóloga
HSC	Células troncales hematopoyéticas
ICL	Entrecruzamientos intracatenarios
InCL	Entrecruzamientos Intercatenarios
IP6	Inositol-6-fosfato
IR	Radiación ionizante
LET	Transferencia lineal de energía
MDC1	Proteína de punto de monitoreo mediadora del daño al ADN

MGMT	O ⁶ -metil guanina metil transferasa
MGMT	O ⁶ -metilguanina-DNA metiltransferasa
MMR	Reparación de errores de apareamiento
MRN	Complejo MRE/RAD50/NBS1
MSC	Células troncales mesenquimales
MuSC	Células troncales multipotentes
NADPH	Dihidronicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NEIL	Proteínas parecidas a la endonucleasa VIII
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	Reparación por unión de terminaciones no homólogas
NSC	Células troncales neurales
NTLH	Endonucleasa parecida a la NTH
O ⁶ -alquilG	O ⁶ -alquilguanina
O ⁷ -alquilG	N ⁷ -alquilguanina
OGG1	8-oxoG ADN glicosilasa 1
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PIKK	Familia de cinasas relacionadas a fosfatidilinositol 3- cinasa
PNKP	Fosfatasa de la polinucleotido cinasa

PSC	Células troncales pluripotentes
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPA	Proteína de replicación A
SB	Rupturas de cadena del ADN
SC	Células troncales
SDSA	Alineamiento de cadena dependiente de síntesis
SHM	Hipermutación somática
ssADN	ADN de cadena sencilla
SSB	Ruptura de cadena simple
TC-NER	Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción
TFIIH	Factor de transcripción básica IIH
Tg	Timinglicol
uDG	Uracilo-ADN-glicosilasa
UV	Luz ultravioleta
UV-DDB	Proteína de unión a ADN dañado por UV
WT	Wild type (secuencia silvestre)
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC 1	X-ray cross complementing protein 1

Todas las abreviaturas de su raíz en inglés

Índice

1. Planteamiento del problema.....	2
2. Objetivo.....	6
3. Respuesta al Daño en el ADN (DDR) y estímulos que la desencadenan.....	7
3.1. Daño de origen endógeno al ADN	11
3.1.1. Daño por oxidación.....	12
3.1.2. Daño por alquilación de bases.....	17
3.1.3. Hidrólisis de bases: Desaminación, despurinación/despirimidación.....	20
3.1.4. Errores en la replicación.....	24
3.2. Daño de origen exógeno al ADN	26
3.2.1. Radiación ionizante.....	27
3.2.2. Radiación ultravioleta.....	29
4. Mecanismos de reparación del ADN y sus vías.....	33
4.1. Reparación de rupturas de cadena simple (SSB) y lesiones intracatenarias...35	
4.1.1. Reparación por Escisión de Bases (BER).....	36
4.1.2. Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER).....	43
4.1.3. Reparación de apareamientos erróneos (MMR, Mismatch Repair).....	49
4.2. Reparación de Rupturas de Doble Cadena (DSBs).....	53
4.2.1. Reparación por unión de terminaciones no homólogas (NHEJ).....	57
4.2.2. Reparación por recombinación homóloga (HRR).....	60
5. DDR en células troncales (Stem Cells: SC).....	63
6. Variaciones en la reparación del ADN tras la diferenciación celular.....	66
7. Conclusiones.....	70
8. Referencias.....	74

1. Planteamiento del problema.

La información genética de todo ser vivo está constantemente bajo la agresión de moléculas reactivas las cuales son producto de factores endógenos como, la respiración mitocondrial, la respuesta inflamatoria, etc., y ambientales/exógenos en forma de agentes físicos, químicos y biológicos, los cuales incluyen luz ultravioleta (UV), radiación ionizante (IR), metales pesados, compuestos volátiles y fármacos, entre otros[1].

Se ha estimado que aproximadamente 10^5 lesiones al ADN por célula son producidas diariamente en el genoma de mamíferos por el decaimiento espontaneo de las bases nucleotídicas, el metabolismo celular y errores durante el proceso de replicación, de las cuales alrededor de 10^4 son oxidación de bases y rupturas de cadena simple (SSBs por sus siglas en inglés) [2]. Las principales lesiones endógenas, también llamadas lesiones espontáneas al ADN, son causadas por la desaminación de citosina formándose uracilo (o metil-citosina formándose timina), pérdida de purinas/pirimidinas que generan sitios abásicos y por especies reactivas de oxígeno (ROS), estas últimas no solo producen rupturas de cadena directamente sino también al menos 20 tipos diferentes de daño a bases del ADN [3]. Una gran cantidad de lesiones por oxidación y sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) pueden ser citotóxicas o mutagénicas de no ser reparadas.

Por otra parte, en el contexto de daño por radiación ionizante (RI), la ausencia de reparación de rupturas de cadena doble (DSBs) puede contribuir a senescencia celular y otras alteraciones celulares [4]. Mientras tanto, la irradiación con UV genera

alteraciones de la estructura tridimensional de la molécula de ADN a partir de dos bases de pirimidina adyacentes [3].

Los efectos aditivos tanto de persistencia del daño al ADN como de una reparación ausente o ineficiente han sido etiológicamente implicados en una gran cantidad de enfermedades, particularmente cáncer y desórdenes neurológicos tanto hereditarios como adquiridos incluyendo Alzheimer, Parkinson y Huntington así como en el envejecimiento [2].

Por lo tanto, para mantener la integridad y función adecuada del genoma, la célula requiere de mecanismos competentes para la respuesta al daño en el ADN (DDR), la cual consiste en escanear, detectar y reparar estos eventos. Los principales mecanismos de reparación por escisión encargados de reparar bases dañadas o incorporación de bases erróneas y distorsiones tridimensionales en el ADN son: Reparación por Escisión de Bases (BER), Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) y Reparación de Errores de Apareamiento (MMR); además de dos mecanismos encargados de las lesiones que involucran las dos hebras del ADN, entrecruzamientos intracatenarios (ICLs) o DSBs, la reparación por unión de terminaciones no homólogas (NHEJ) y reparación por recombinación homóloga (HRR) [5]. Los mecanismos de reparación del ADN, involucran proteínas específicas dependiendo de la lesión, la fase del ciclo celular y el tipo celular.

En particular las células troncales (SC) tienen la habilidad de auto-renovación y el potencial de diferenciarse en diversos tipos celulares; esto último dependiendo de si se trata de células troncales pluripotentes (PSC) las cuales pueden diferenciarse en los

aproximadamente 200 diferentes tipos celulares presentes en el cuerpo humano. Éstas se subdividen en células troncales embrionarias (ESC), células de carcinoma embrionarias (ECC), células germinales embrionarias (EGC), células troncales de epiblasto (EpiSC) y células troncales pluripotentes inducidas (iPSC); a excepción de las iPSC todas las PSCs son de origen embrionario. También están las células troncales multipotentes (MuSC) subdivididas en células troncales hematopoyéticas (HSC), células troncales neurales (NSC) y células troncales mesenquimales (MSC) las cuales tienen restringido el potencial de diferenciación a familias celulares de parentesco cercano.

Generalmente las SC muestran una alta capacidad de reparación de ADN, la cual disminuye con la diferenciación. Además, permanecen preferencialmente en la fase G0 del ciclo celular, lo cual minimiza la probabilidad de errores en la replicación. Así mismo, en este estado se reduce la tasa metabólica y por lo tanto hay una menor cantidad de mitocondrias que conlleva a una producción reducida de ROS [6].

La integridad del material genético recae en gran medida en los mecanismos de reparación del ADN, los cuales operan en coordinación con la maquinaria del ciclo celular. Actualmente el entendimiento de la funcionalidad de los mecanismos de reparación del ADN es un área con muchas incógnitas que se ha ampliado con la reciente investigación en regeneración tisular mediante el uso de células troncales así como su relación entre daño al ADN, enfermedades degenerativas, envejecimiento y cáncer. Por lo anterior, es indispensable disponer de un compendio de la información,

organizado de manera lógica que facilite la comprensión del tema y ayude al diseño de estrategias experimentales innovadoras para profundizar más en esta área.

2. Objetivo.

Realizar una investigación bibliográfica de los últimos 5 años, acotada a las bases de datos PubMed y ScienceDirect, que nos permita describir los principales agresores del ADN y sus efectos, así como establecer un panorama actualizado de los sistemas encargados de mantener la estabilidad genómica y discutir cómo estos se modifican tras la diferenciación partiendo de células troncales humanas.

3. Respuesta al daño en el ADN (DDR) y estímulos que la desencadenan.

En respuesta a daño en el ADN se activan vías de transducción de señales cuya finalidad es ayudar a la célula a enfrentarse al daño por medio de la coordinación de la progresión del ciclo celular, la replicación del ADN y los mecanismos de reparación [7].

La cascada de señalización de la DDR está compuesta por sensores, mediadores, transductores y efectores. Una vez que se reconoce el daño en el ADN por los sensores de la DDR, principalmente por la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM), la proteína ataxia telangiectasia relacionada a Rad3 (ATR) y la proteína cinasa ADN-dependiente (DNA-PK) (miembros de la familia de cinasas relacionadas a fosfatidilinositol 3-cinasa; PIKKs), se lleva a cabo la fosforilación de diversos mediadores y proteínas adaptadoras las cuales actúan amplificando la respuesta y reclutando a los efectores [8]. ATM y ATR son considerados componentes clave de la señalización de la DDR cuyos blancos más estudiados son las proteínas cinasas CHK1 y CHK2, las cuales, junto con ATM/ATR, actúan para reducir la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) por medio de diversos mecanismos, algunos de los cuales son mediados por la activación del factor de transcripción p53. La inhibición de CDKs disminuye la velocidad del progreso del ciclo celular, o bien, lo detiene en etapas clave (puntos de monitoreo), G₁-S, intra-S o G₂-M, lo cual ayuda a la reparación de la lesión incrementando el tiempo disponible. Paralelamente, la señalización mediada por ATM/ATR favorece la reparación induciendo proteínas de reparación de ADN transcripcional y postranscripcionalmente; reclutando factores de reparación al sitio de

daño; y activando a proteínas de reparación mediante la modulación de mecanismos de fosforilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación [9] (Figura 1).

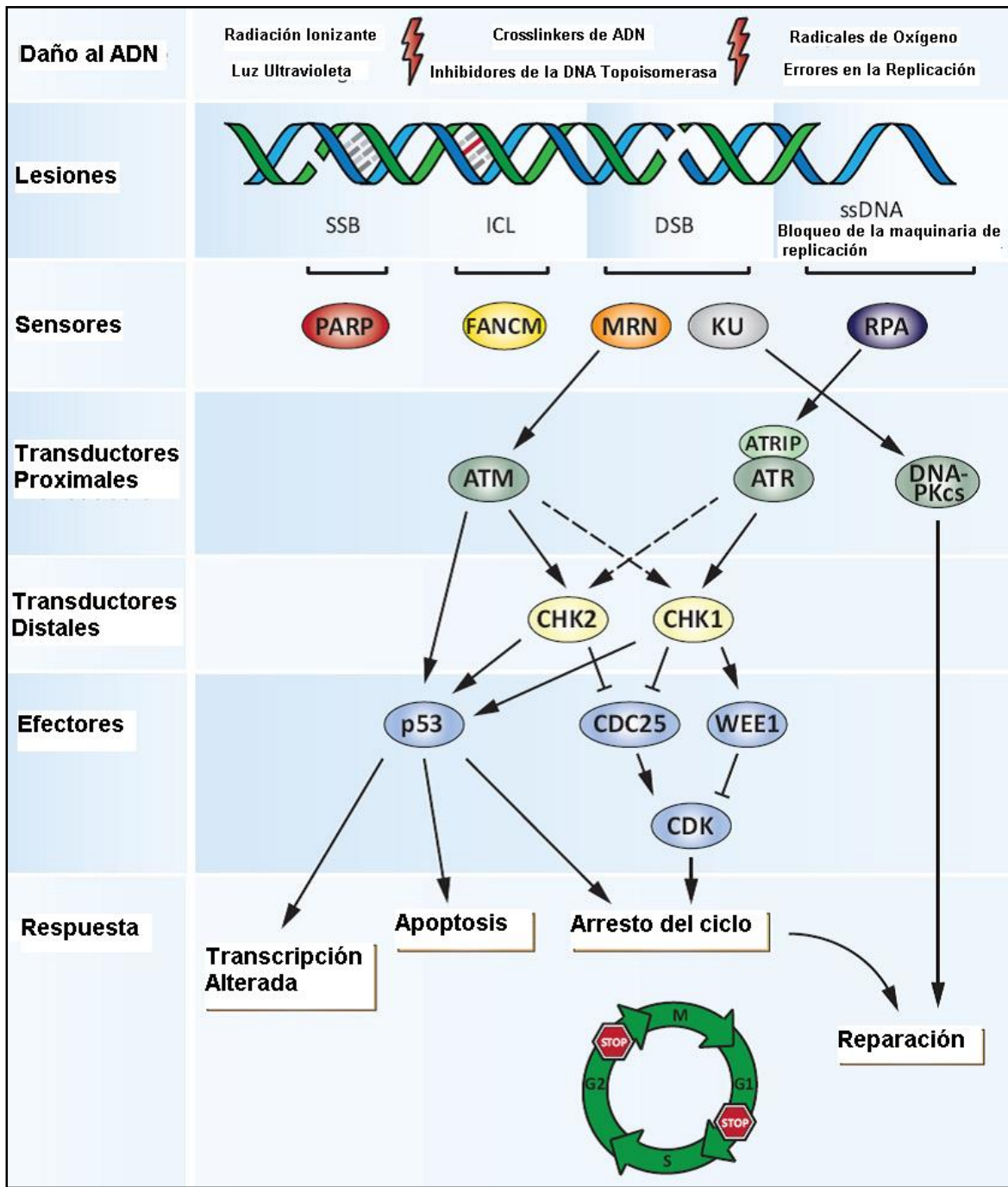


Figura 1. Respuesta al daño al ADN. Agentes tanto de origen exógeno como endógeno generan diversos tipos de lesiones incluyendo SSBs y DSBs. El complejo multifuncional MRN detecta DSB, mientras que FANCM es requerida para la inducción de respuesta de punto de monitoreo mediada por ICLs. PARP actúa predominantemente como una proteína sensora de SSB. RPA se une a regiones de ADN de cadena sencilla (ssADN) que están expuestas en sitios de atascamiento de la horquilla de replicación o bien después del procesamiento de DSBs. MRN y RPA median el reclutamiento de ATM y ATR-ATRIP, respectivamente, así como la subsecuente activación de las vías reparativas correspondientes, coordinando los puntos de monitoreo del ciclo celular, la reparación del ADN y las respuestas apoptóticas ante el daño. El hetero dímero Ku70/80 compite con MRN para su interacción con las DSBs. Ku70/80 recluta a DNA-PKcs para formar la holoenzima catalíticamente activa DNA-PK la cual es el principal componente del mecanismo canónico NHEJ. MRN, por otra parte, inicia HRR. Una vez activados estos sensores una serie de eventos de fosfotransferencia ocurren mediados principalmente por las cinasas de puntos de monitoreo del ciclo celular CHK1 y CHK2. Ésta señalización converge en efectores como la proteína supresora de tumores p53 o la proteína fosfatasa CDC25 y la tirosin cinasa WEE1. Como resultado, la actividad de las CDK es inhibida, retardando la progresión del ciclo celular de G1 a S (el punto de monitoreo G1/S) o de G2 a M (punto de monitoreo G2/M). Por lo tanto, la DDR orquesta una variedad de respuestas celulares: la actividad transcripcional de la célula dañada es alterada y ocurre un arresto del ciclo celular, luego entonces, facilitando la reparación de las lesiones del ADN. En situaciones donde el daño al ADN es muy severo y no puede ser reparado, la DDR activa apoptosis o senescencia.

ATRIP= proteína que interactúa con ATR; CDK= cinasa dependiente de ciclina; FANCM= Fanconi anemia grupo de complementación M; MRN= complejo MRE11/RAD50/NBS1; PARP= poli(ADP-ribosa) polimerasa; RPA= proteína de replicación A. Adaptada de [10].

Se sabe que la estructura de la cromatina tiene un impacto importante en la DDR y que ésta, a su vez, es modulada por el daño al ADN. El ejemplo más claro es la fosforilación en la serina-139 de la variante de la histona H2A, H2AX, durante la señalización de la DDR desencadenada por DSBs. Notablemente, la activación de ATM resulta en la relajación de la cromatina en la periferia de una DSB. Así mismo, los estudios sugieren la activación y modificación de la cromatina mediante cualquiera de los mecanismos de reparación del ADN [7].

Por otra parte, el daño ocasionado al ADN determinará si la célula sobrevive o si iniciará señales para conducir a apoptosis; esto depende de la circunstancia o la severidad de la agresión. Hay una inmensa cantidad de sustancias o agentes que pueden generar lesiones al ADN, cabe destacar que varias de ellas pueden afectar en

más de una manera, por mencionar un ejemplo, la RI no solo causa DSBs sino también genera ROS [11].

Las fuentes de daño al ADN puede dividirse en 3 clases: la primera clase es debida a causas espontaneas, las cuales incluyen mecanismos como la desaminación de citosina formando uracilo o de 5-metilcitosina (5meC) produciendo timina. Otro ejemplo trascendente es la inserción/delección y en apareamientos erróneos de bases. La segunda clase es debida a especies reactivas generadas endógenamente por procesos que pueden ser tanto fisiológicos como patológicos (tales como respiración mitocondrial, inflamación o enfermedades infecciosas). Estos últimos pueden alterar la estructura primaria del ADN por medio de la oxidación del mismo o bien por la formación de sitios abásicos. Por último, la tercera clase de lesiones son las debidas a agentes externos (fármacos) capaces de generar rupturas de cadena (SBs), ya sean SSBs o DSBs, abultamientos del ADN (aductos) o entrecruzamientos de cadena. Cabe destacar que con base a estos mecanismos de acción es que algunos agentes son administrados terapéuticamente a pacientes con diversas patologías (i.e. cáncer), a manera de radioterapia o agentes alquilantes como parte de quimioterapia [11].

3.1. Daño de origen endógeno al ADN.

Los factores endógenos de daño al ADN son los más frecuentes y se podría decir que son debidos a errores en procesos fisiológicos metabólicos o regulatorios del organismo. Este tipo de daño se puede separar en dos grupos; el primero corresponde a lesiones de origen químico, representado por los procesos oxidantes y la alquilación de bases. El segundo corresponde a las lesiones espontáneas, las cuales se deben a procesos fisiológicos relacionados con la conservación de la información genética, a este último pertenecen la hidrólisis de bases (desaminación y despurinación/despirimidización) y los errores de replicación.

3.1.1. Daño por oxidación.

El daño por oxidación al ADN principalmente involucra modificación de bases nucleicas, generando lesiones que no distorsionan la estructura helicoidal del mismo (sin abultamientos) [12], sin embargo, existe la formación de lesiones oxidativas atípicas, es decir, que forman abultamientos en la molécula de ADN. Las ROS y las especies reactivas de Nitrógeno (RNS), son moléculas altamente reactivas, de las cuales las más estudiadas son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y el hidrógeno en su forma iónica (H^{\bullet}). El anión superóxido es generado por la reducción de un electrón de uno de los oxígenos de la molécula de oxígeno (O_2), mediada por diversas oxidasas incluidas la dihidronicotinamida adenina dinucleotido fostato (NADPH) oxidasa, la xantin-oxidasa, la ciclooxigenasa, así como por la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el transcurso normal de la fosforilación oxidativa [13]. Por otra parte, el radical hidroxilo reacciona con una gran cantidad de biomoléculas como el ADN causando daño a las bases heterocíclicas y a la fracción de azúcar de los nucleótidos mediante diversos mecanismos [14,15]. Una de sus interacciones con el ADN resulta en el secuestro de hidrógeno de la 2-desoxiribosa generando radicales libres de compuestos de carbono (Radicales Peroxilo: ROO^{\bullet}), los cuales a su vez, tienen la capacidad de secuestrar átomos de hidrógeno conduciendo a inestabilidad estructural y por ende a rupturas que pueden ser tanto de cadena simple como de ambas cadenas [16]. Adicionalmente, el H^{\bullet} interactúa con los enlaces dobles de los anillos de las bases nitrogenadas, causando modificaciones químicas

importantes como aperturas de los anillos, conduciendo a inestabilidad de los enlaces N-Glucosídicos.

Las cuatro nucleobases son susceptibles a reaccionar con ROS debido a sus sitios susceptibles a ataques nucleofílicos, siendo la guanina la base más vulnerable a la oxidación se forman principalmente como productos la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxoG, **figura 2, inciso u**) y la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (fapyG, **figura 2, incisos s, v**), ambos originados por la adición de $\bullet\text{OH}$ a la posición C8 del anillo de guanina y son las más abundantes en este tipo de lesiones.

Daño al ADN, mecanismos de reparación y variaciones tras la diferenciación partiendo de células troncales humanas.

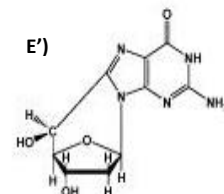
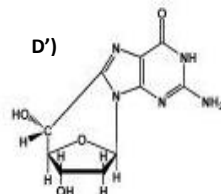
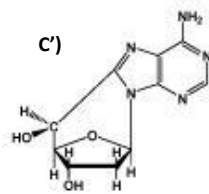
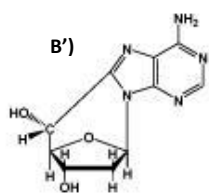
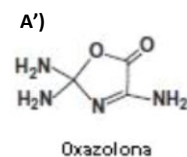
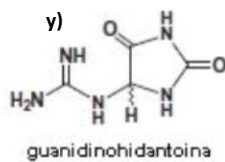
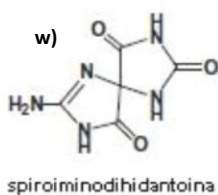
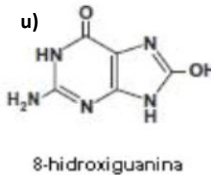
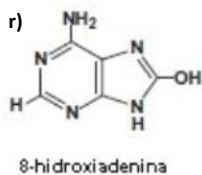
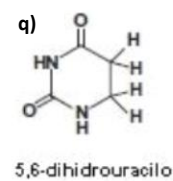
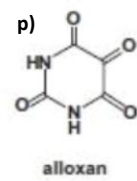
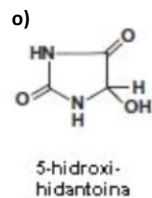
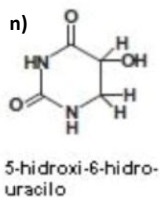
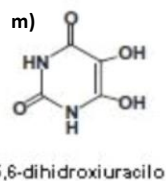
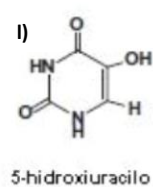
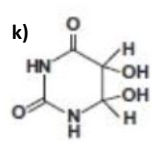
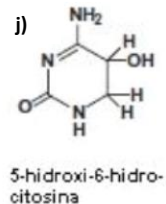
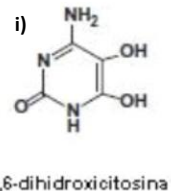
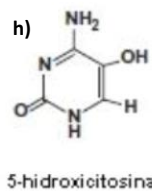
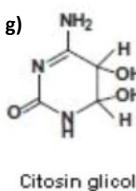
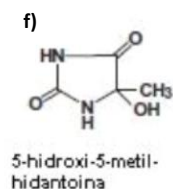
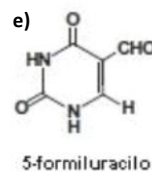
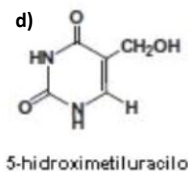
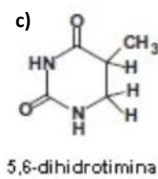
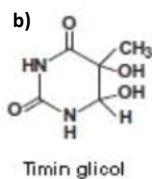
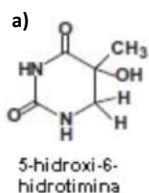


Figura 2. Estructura de los principales productos generados con las bases del ADN debido a daño por oxidación. Modificada de [15].

La reacción análoga del OH^{\bullet} con la adenina produce lesiones similares: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina (8-oxoA, **figura 2, inciso r**) y 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (fapyA, **figura 2, incisos s, v**). Por otra parte, el ataque por radicales libres a citosina produce citosinglicol (**figura 2, inciso g**), el cual se descompone (pierde un grupo amino) para formar uracilglicol (**figura 2, inciso k**) o bien se deshidrata para formar 5-hidroxicitosina (**figura 2, inciso h**) la cual si se desamina conduce a la formación de 5-hidroxiuracilo (5-OHU, **figura 2, inciso l**). Finalmente la oxidación de timina genera timinglicol (Tg, **figura 2, inciso b**), 5,6-dihidroxitimina, 5-hidroximetiluracilo y 5-formiluracilo [12].

Las modificaciones a nucleobases que conducen a alteraciones en la estructura helicoidal del ADN (abultamientos), pueden ocurrir debido a la reacción de las bases nitrogenadas con el radical $^{\bullet}\text{OH}$ o debido a rompimientos por peróxidos de lípidos. Por ejemplo, la formación de modificaciones a bases en tándem debidas al ataque de estos radicales a los átomos C5 y C6 de las pirimidinas generando radicales de pirimidina los cuales reaccionan con purinas vecinas, formando de esta manera, entrecruzamientos nucleobase-nucleobase intracatenarios. Otra forma de lesiones atípicas causadas por reacciones del radical hidroxilo son los 8,5'-ciclopurina-2'-desoxinucleósidos (**figura 2, incisos B', C', D', E'**). El grupo OH^{\bullet} reacciona con el C5' de la 2-desoxiguanosina (carbono 5 de la pentosa) o con la 2-desoxiadenosina, seguido por el ataque del ahora reactivo C5' en la posición C8 de la base, resultando en una ciclación y formación de 8,5'-ciclo-2-desoxiguanosina (cicloG) u 8,5'-ciclo-2-desoxiadenosina (cicloA),

respectivamente (**Figura 3, incisos A, B**). El enlace covalente entre C5'-C8 ocasiona un plegamiento de la desoxirribosa, lo cual altera los ángulos de torsión del enlace fosfodiéster, debilitando los puentes de hidrógeno tipo Watson-Crick generando una disrupción de la hélice del ADN cerca de la lesión [12].

Es importante resaltar que el daño por oxidación también puede ser generado por agentes exógenos como la IR y el FeCl₃, dada la capacidad de diversos agentes para proporcionar o bien generar (i.e. IR) radicales libres y especies reactivas.

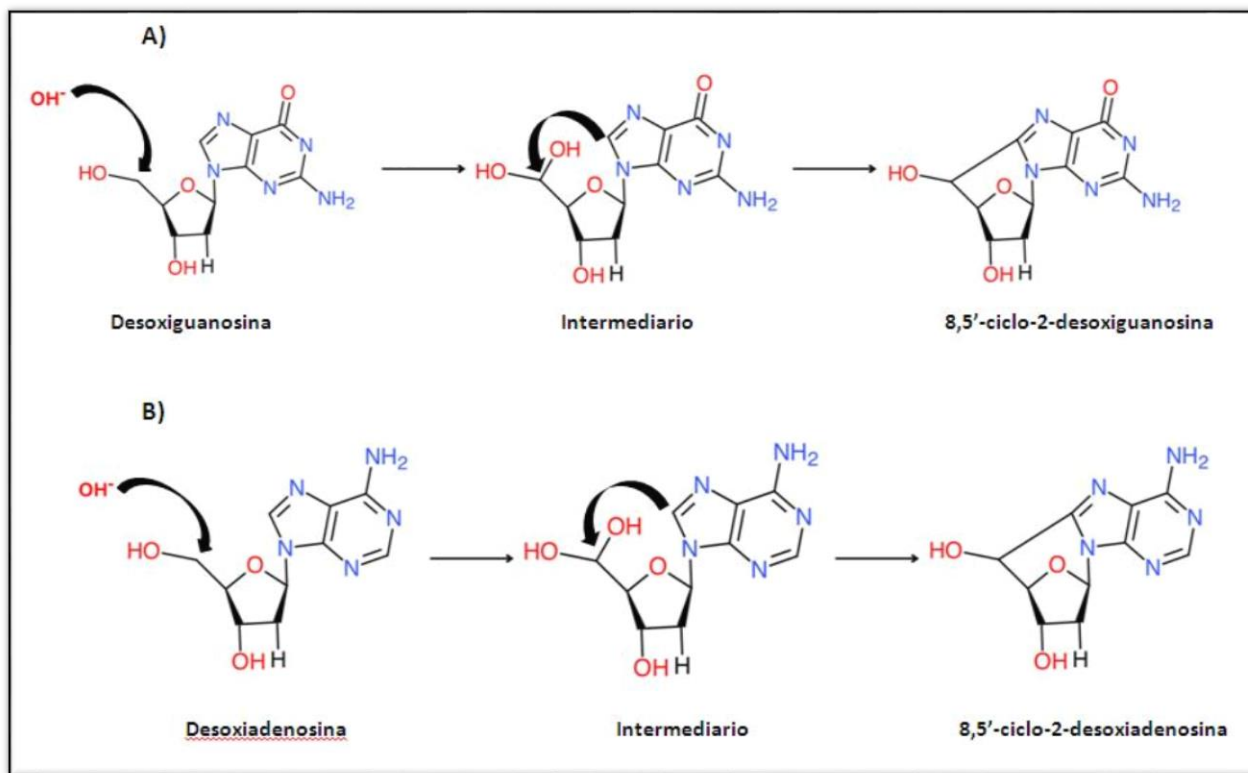


Figura 3. Síntesis de 8,5'-ciclopurina-2'-desoxinucleósidos (para descripción revisar texto).

3.1.2. Daño por alquilación de bases.

Los agentes alquilantes son compuestos electrofílicos [17] los cuales actúan transfiriendo un grupo alquilo, cloroetilo o, en el caso de compuestos de platino, un grupo platino al ADN por medio de una reacción química llamada sustitución nucleofílica. El nitrógeno, el oxígeno y los fosfatos son blancos comunes para alquilación, aunque la reacción específica dependerá de la naturaleza del agente. El átomo N⁷ de la guanina es particularmente susceptible a sustitución nucleofílica, y de forma análoga pero menos susceptible, los átomos N¹ y N³ de adenina, el N³ de citosina y el O⁶ de guanina.

Los agentes alquilantes pueden ser clasificados en monofuncionales o bifuncionales. Los agentes monofuncionales se caracterizan por transferir un grupo alquilo al ADN y sus aductos principales son N⁷-alquilguanina (O⁷-alquilG) y O⁶-alquilguanina (O⁶-alquilG). Los agentes bifuncionales, por su parte, pueden reaccionar en dos sitios diferentes en el ADN causando un entrecruzamiento (“cross-link”). Si éste se da en dos puntos de la misma cadena se denomina entrecruzamiento intracatenario del ADN, y si se presenta entre las dos cadenas complementarias se nombra entrecruzamiento intercatenario del ADN (**Figura 4 incisos a, b**) [18,19].

El daño al ADN por alquilación puede ser causado por agentes endógenos como las proteínas metiltransferasas (i.e. S-adenosilmetionina), así como por agentes exógenos los cuales pueden ser ambientales, industriales o bien por fármacos quimioterapéuticos que generan un amplio espectro de bases alquiladas [19, 20, 21].

La O⁶-metilguanina (O⁶-meG) es un ejemplo de alquilación de bases del ADN con capacidades citotóxicas y mutagénicas importantes, que es producida por diversos agentes alquilantes tanto endógenos como exógenos. Por lo tanto, para prevenir resultados deletéreos ocasionados por dicha lesión, las células están equipadas con una proteína de reparación llamada O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT). Esta enzima remueve directamente los aductos de la O⁶-alquilación en una reacción de un sólo paso, en donde se transfiere el grupo alquilo de la posición O⁶ de la guanina a un residuo de cisteína de su sitio activo, restaurando así a la guanosina a su estado basal; a su vez, la MGMT entra en estado de inactivación “suicida”, es decir, pierde reactividad, es ubiquitinada y finalmente degradada por el proteosoma [1].

Se ha demostrado que varios mecanismos reparan este tipo de daño, incluyendo la reparación por escisión de bases (BER) iniciado por glicosilasas específicas, metil transferasas suicidas (i.e. MGMT) y desmetilación oxidativa directa por las familias de proteínas ABH/ ALKBH, estas últimas siendo enzimas análogas de la proteína AlkB de *E. coli* la cual es una ADN α -cetoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe (II), cuya actividad es remover un grupo alquilo de las bases 1-alkiladenina y 3-alkilcitosina. En el caso de los análogos humanos su actividad esta ampliada a la reparación de todas las lesiones generadas por la metilación en las posiciones N¹ de las purinas y la N³ de las pirimidinas [20], que son los sitios más susceptibles a alquilación.

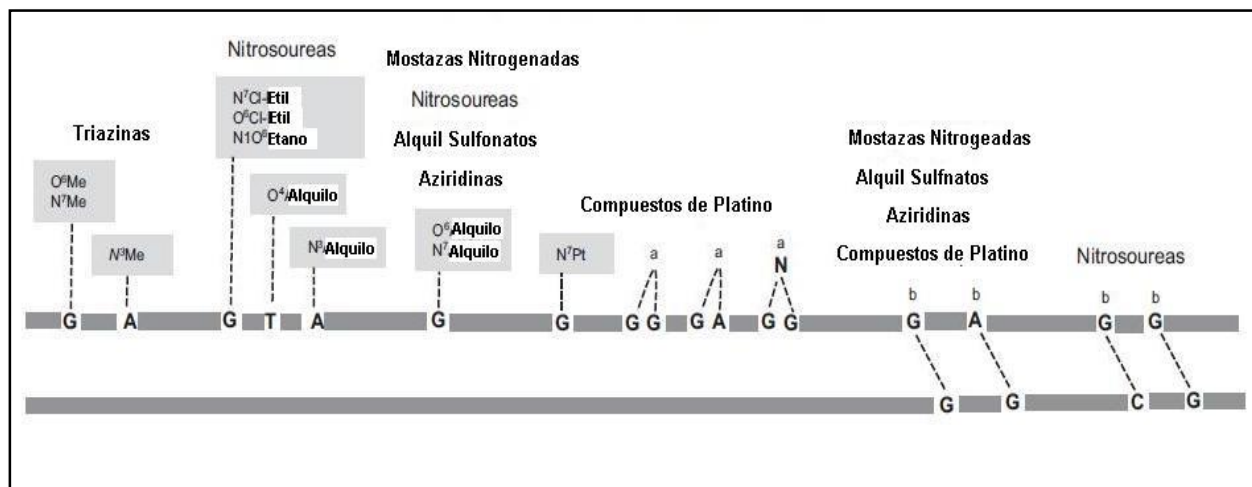


Figura 4. Principales lesiones generadas en el ADN por diferentes agentes alquilantes. Las barras horizontales y paralelas representan la doble cadena de ADN, mientras que las bases como **G**: Guanina, **A**: Adenina, **T**: Timina y **C**: Citosina, **a**: Entrecruzamientos intracatenarios. **b**: Entrecruzamientos intercatenarios. Adaptada de [18].

3.1.3. Hidrólisis de bases: Desaminación y depuración/depurimidinación.

La desaminación de bases del ADN es una lesión común causada por agentes tanto endógenos como ambientales. Ya sea de tipo hidrolítica o nitrosativa, las bases citidina (C), adenosina (A) y guanosina (G) son convertidas a uridina (U), inosina (I, cuya base correspondiente es hipoxantina), xantosina (X) y oxanosina (O), respectivamente (**Figura 5**). La conversión de amino a ceto altera las propiedades de los puentes de hidrógeno de las bases dañadas, de un enlace donador a uno aceptor, lo cual puede resultar en una mutación durante el proceso de síntesis de ADN debida a la inserción errónea de bases[22-26].

Cuando el grupo amino exocíclico de la citosina es removido por desaminación hidrolítica (**Figura 5**), catalizado por la familia de enzimas AID/APOBEC (desaminasa de activación inducida/ polipéptido catalítico de la enzima apolipoproteína B editora de mRNA), una citosina es modificada a uracilo. Esta y muchas modificaciones a la citosina mediadas por enzimas especializadas juegan roles fisiológicos de suma importancia induciendo variabilidad genómica. Y aunque la desaminación parezca ser un proceso antagónico frente a la idea clásica de la fidelidad de la información contenida en el ADN, puede conducir a mutaciones benéficas desde una perspectiva evolutiva [22-26].

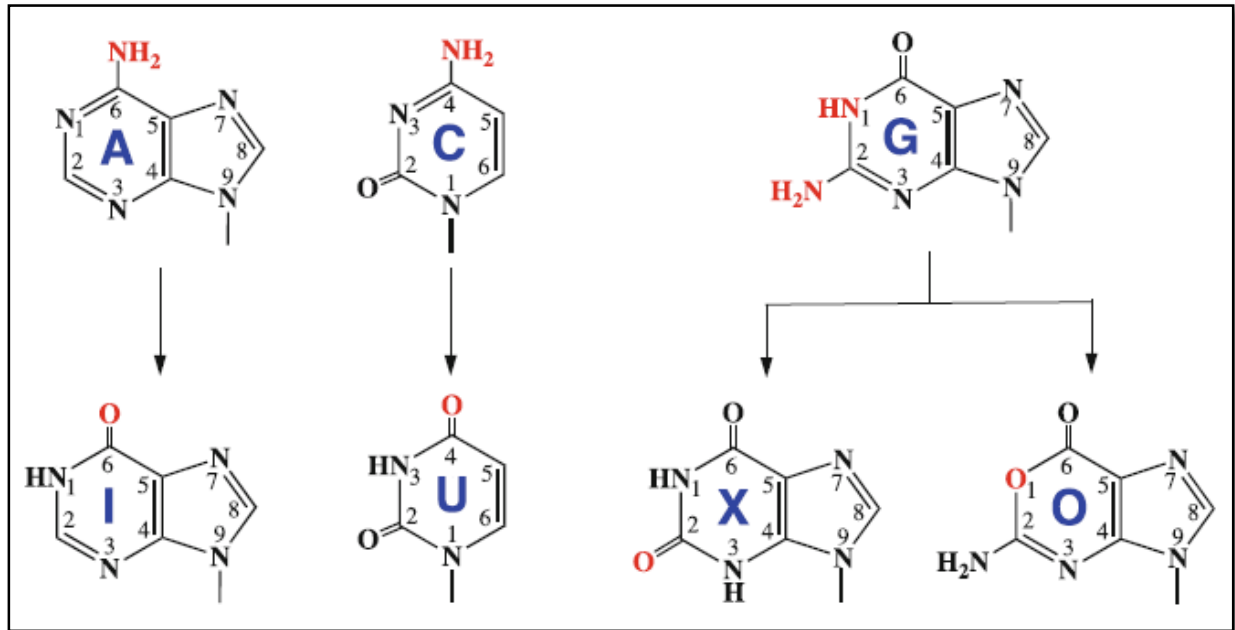


Figura 5. Estructura química de las bases nitrogenadas, sus sitios de desaminación y los productos formados. A: adenina, C: citosina, G: guanina, I: inosina, U: uracilo, X: Xantosa, O: oxantina. Adaptada de [22]

Un ejemplo de desaminación, como medio para la diversidad, es demostrado por el sistema inmunológico adaptativo. El repertorio de anticuerpos maduros es una colección de moléculas de unión a antígenos altamente heterogénea producida por múltiples mecanismos de generación de variabilidad. La generación programada de segmentos de genes (VDJ recombination) proporciona el repertorio inicial de linfocitos B, cada uno con la capacidad para expresar una molécula de IgM-específica unida a la superficie celular. Desafortunadamente este repertorio inicial no es suficiente para cubrir la gran variedad antigénica a la que se expone el organismo, por lo que hay mecanismos alternativos para incrementar la variabilidad de reconocimiento antigénico. En un proceso clave, una vez dada la exposición al antígeno, los linfocitos B son madurados en los centros germinales por medio de dos mecanismos: hipermutación

somática (SHM) y recombinación de cambio de clase (CSR). En la SHM, los anticuerpos evolucionan de baja afinidad a alta afinidad mediante la introducción de mutaciones en sus secuencias de afinidad antigénica a un índice 10^6 veces mayor al valor correspondiente de mutaciones espontáneas. Por otra parte, en la CSR, el dominio efector de la cadena pesada es cambiado de IgM a los diferentes isotipos de inmunoglobulinas: IgA, IgE o IgG. Cabe señalar que la SHM y la CSR catalizadas por la enzima AID no son los únicos ejemplos de desaminación de citosina benéfica [22-26].

La familia de enzimas AID/APOBEC, especialmente sus integrantes AID, APOBEC1, APOBEC2 y algunas proteínas de la rama APOBEC3, juegan un rol importante en la desmetilación del ADN. Estas son proteínas desmetilantes de citidina zinc-dependientes actuando en una sola de las cadenas de polinucleótidos y desaminando citosinas en diversos contextos. El ion de zinc forma enlaces de coordinación con 3 aminoácidos: una histidina y dos cisteínas o tres cisteínas. Estos motivos son altamente conservados ([H/C] \times E y PC \times_{2-4} C), y están relacionados con proteínas encargadas de regular el movimiento de la cromatina incluyendo metilación del ADN y de histonas. Este sitio catalítico de zinc es activado mediante un cuarto ligando, una molécula de agua, la cual es coordinada por el ion carboxilato del glutamato en [H/C] \times E. El grupo carboxilato facilita el transporte de protones convirtiendo a la molécula de agua, una vez que es atrapada por la esfera de coordinación del zinc, a un ion hidróxido (\bullet OH). La desaminación de citosinas ocurre por medio de un ataque nucleofílico del hidróxido de zinc en la posición C4 de la pirimidina extrayendo al grupo amino [22-26].

Es importante destacar que las desaminasas de citidina, actúan preferentemente sobre citosinas sin metilar, con respecto a las citosinas metiladas, y que ambas reacciones son consideradas mutagénicas. Si la desaminasa actúa sobre citosina, el uracilo resultante es reconocido y reparado por las Uracil-ADN-glicosilasas (uDG). La timina (T) resultante de la desaminación de 5meC, es una base habitual en el ADN genómico por lo que las proteínas del sistema MMR deben distinguir timinas apareadas erróneamente con guanosinas de las timinas dispuestas de manera apropiada en el ADN. Las timina-ADN-glicosilasas en asociación con la proteína con dominio de unión a CpGs metilados 4 (TDG/MBD4) son capaces de reconocer este tipo de apareamientos erróneos actuando no solo en la timina sino también en la base con la que se encuentra apareada **[22-26]**.

Debido a que la actividad de AID podría resultar mutagénica, dado al cambio de bases, las células mantienen un riguroso mecanismo de control para su localización. AID es alejada del ADN a través de una fuerte señal de retención citoplasmática, así como una fuerte señal de exportación nuclear. Adicionalmente AID es introducida al núcleo mediante transporte activo, y se cree que su concentración es regulada por el proteasoma **[22-26]**.

3.1.4. Errores en la replicación.

Las células en general replican su ADN con una fidelidad extraordinaria ($\sim 10^{-10}$ mutaciones por base por división celular). Esto se logra gracias a las acciones combinadas de la selectividad de bases de las polimerasas, la acción de edición de exonucleasa 3'-->5' y la reparación de daño al ADN. Las ADN polimerasas deben seleccionar el nucleósido trifosfato adecuado de una reserva con moléculas muy similares para preservar la integridad genómica. Las evidencias estructurales y bioquímicas sugieren que las ADN polimerasas discriminan entre los sustratos por medio de un mecanismo de "acoplamiento inducido", donde la unión con el nucleótido correcto conlleva a un ajuste conformacional sustrato/proteína, lo cual alinea a los grupos catalíticos de la base a incorporar para optimizar la química de la reacción [27-28].

Los errores causados por estos fenómenos espontáneos son del tipo de "cambios de base", y pueden ser el resultado de errores en el apareamiento de bases durante la replicación, la recombinación, la reparación o cada vez que la ADN polimerasa se disponga a generar una cadena complementaria de ADN. Los errores en apareamientos pueden ocurrir debido a que las bases se encuentran en conformaciones químicas diferentes (tautómeros) lo que genera interacciones inapropiadas [27-28].

El tipo de alteración que ocurra dependerá del tipo de bases que se aparean erróneamente. Un mal apareamiento entre una purina y una pirimidina genera una transición, mientras que uno entre dos purinas o dos pirimidinas genera una

transversión. Esto se debe a que una pirimidina en su forma enólica o tautomérica se sigue apareando con una purina y una purina en su forma enólica se sigue apareando con una pirimidina [27-28].

Si estos errores no son corregidos entonces, posterior a la replicación se obtendría una molécula de ADN con una secuencia silvestre (WT-wild type) y una con secuencia mutante, esta última cargaría la alteración y la heredaría a su progenie. El impacto de este evento dependerá de la zona del genoma en la cual se llevó a cabo la alteración, lo cual puede ser desde una mutación silenciosa hasta efectos de alteración proteica en la traducción de los genes afectados así como su función celular [27-29].

3.2. Daño al ADN de origen exógeno.

Las lesiones al ADN producidas por factores ajenos al organismo (xenobióticos), a pesar de tener una incidencia menor a las lesiones producidas por factores endógenos, tienen los efectos más deletéreos y son más persistentes, lo cual está en función del tiempo de exposición y de la dosis recibida del xenobiótico que las ocasiona.

Los agentes exógenos con capacidad de generar lesiones sobre el ADN son muchos, sin embargo pueden agruparse respecto a su naturaleza en físicos y químicos. Las lesiones ocasionadas por agentes físicos como radiación UV o rayos α , β , γ ó x son principalmente SSBs, DSBs, daño por oxidación y lesiones en *clúster*, esta última, específica de lesiones causadas por IR y se define como dos o más lesiones dentro de máximo dos vueltas de la molécula de ADN causadas por la exposición a un haz de radiación [15,31].

El daño generado al ADN por agentes exógenos químicos, puede manifestarse como rompimientos, alquilaciones, oxidación, desaminaciones, entrecruzamientos ADN-ADN, entrecruzamientos ADN-proteína, aductos, etc. y esto depende de la estructura química del agente, concentración, tiempo de exposición y su capacidad de interaccionar directa o indirectamente con el ADN. Las lesiones al ADN por agentes químicos que más se han documentado son las ocasionadas por agentes quimioterapéuticos los cuales son diseñados para tener una actividad específica y un mecanismo de acción, su aplicación terapéutica requiere que estos agentes sean estudiados ampliamente para conocer efectos secundarios y sus reacciones adversas.

3.2.1. Radiación Ionizante (IR).

Uno de los blancos celulares de la IR identificado desde hace mucho tiempo es el ADN. Este agente físico induce un amplio espectro de lesiones que pueden causar daño estructural a ésta molécula y puede alterar o modificar la habilidad de la célula a transcribir los genes codificados en la zona del ADN afectada. Uno de los daños generados son las SSBs, las cuales a pesar de ser altamente controladas por los diversos mecanismos de reparación y tener una tasa relativamente alta de restauración debido a la posibilidad de utilizar la cadena complementaria como templado, pueden resultar en mutaciones como se ha señalado en secciones anteriores. Otra lesión causada por la IR que tiene gran importancia son los DSBs, estos rompimientos son considerados la lesión al ADN más deletérea, ya que puede ocurrir generando extremos romos, o bien estando separadas por unas cuantas bases de distancia entre ellas. Adicionalmente, la radiación ionizante induce otras lesiones, como entrecruzamientos, modificación por oxidación de bases mediada por la producción de especies reactivas como OH^{\bullet} , H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$ además de hidrógeno atómico (H^{\bullet} , poderoso agente reductor) y daño a bases en clúster [15,31].

El número de lesiones por célula detectado inmediatamente después de la irradiación con una dosis de 1 Gy se ha estimado superior a las 1000 bases dañadas, 1000 SSBs, 40 DSBs, 20 entrecruzamientos ADN-ADN, 150 entrecruzamientos ADN-proteína y de 130 a 320 eventos de daño al ADN en clúster sin DSB [15,31].

Las DSBs causadas por IR, en su mayoría, son derivadas del daño oxidante en clúster generado por la exposición, los cuales a su vez se incrementan con IR densa de alta

Transferencia Lineal de Energía (LET), por ejemplo radiación alfa (α). Los DSBs causados por la energía depositada, así como los generados enzimáticamente, son sustratos de la reparación por recombinación homóloga (HRR) y la reparación por unión de terminaciones no homólogas (NHEJ), los cuales son procesos dependientes de la fase del ciclo celular. De manera interesante hay evidencia que indica la formación de DSBs a partir de SSBs por medio del colapso de horquillas de replicación (“replication forks”) o bien, si en la zona del sistema de replicación que se encuentra detenido, el segmento de ADN expuesto es procesado por una endonucleasa, y esto puede llevar a rearrreglos cromosómicos [32,33].

3.2.2. Radiación ultravioleta (UV).

La radiación ultravioleta absorbida por el cuerpo humano puede causar daño del tipo aductos al ADN. La radiación UV representa el 45% del espectro total de la luz solar y está dividida en tres regiones del espectro dependiendo de su longitud de onda: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm). Las lesiones típicas al ADN inducidas por UV incluyen modificaciones de bases como dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) y (6-4) fotoproductos o bien 6-4 pirimidin-pirimidona (6-4PP) (**Figura 6) [34]**.

Se estima que alrededor del 25% de la incidencia del carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas es debida a la exposición a radiación UVA, mientras que el 75% restante se debe a radiación UVB. Si bien se sabe que la radiación UVC es un factor de alto riesgo para desarrollar cáncer, se puede despreciar debido al bloqueo de ésta por la capa de ozono, hablando de UV como factor ambiental y no ocupacional, por lo que la contribución de este tipo de UV no altera los porcentajes de incidencia reportados **[34]**. Este efecto biológico, disparado por la energía de un fotón UV depositado en cierta región de la doble hélice, resulta de una serie de eventos fisicoquímicos los cuales pueden conducir a alteraciones químicas en el material genético **[35]**.

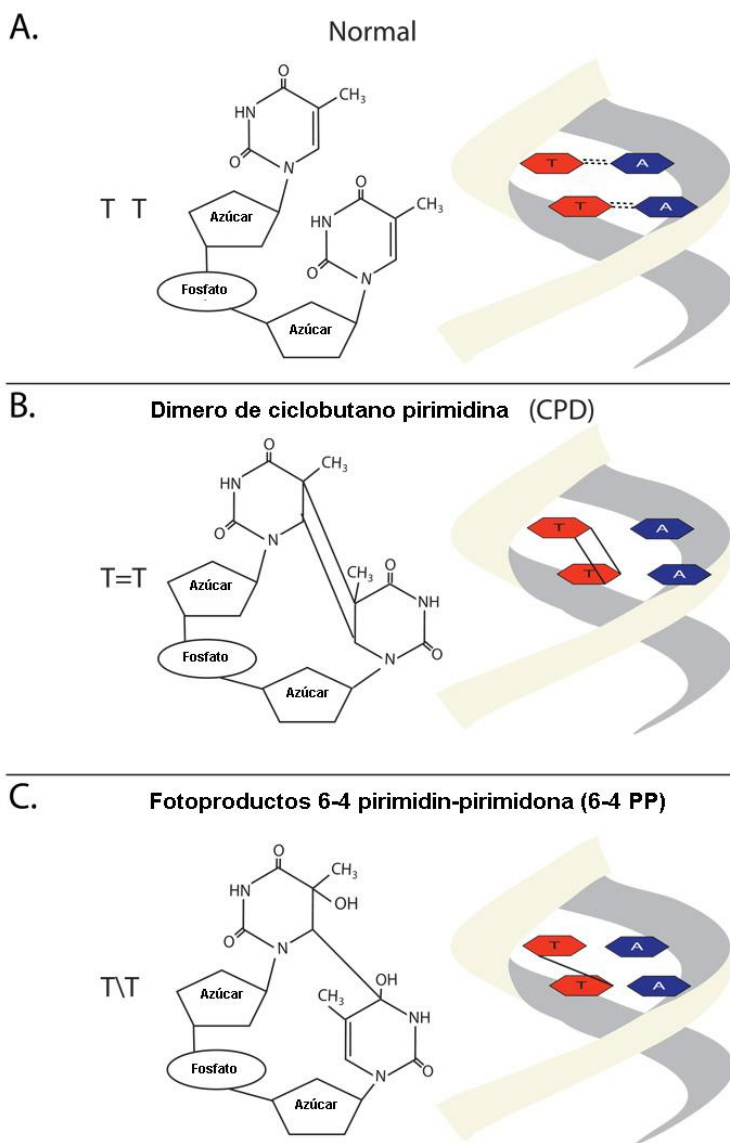


Figura 6. Estructura química de los CPD y 6-4 PP. A) Dos residuos normales de timidina contiguos. B & C) El ADN absorbe la energía de la radiación UV ocasionando modificaciones químicas de los enlaces insaturados entre dos timidinas contiguas. Adaptada de [36].

Mientras los CPDs son el resultado de la formación de un enlace covalente entre bases pirimídicas por medio de la formación de un anillo de 4 integrantes debida a la saturación de los dobles enlaces 5 y 6 de las pirimidinas, los 6-4PPs se forman a partir

de la reacción del C6 de la pirimidina orientada 5' de un par adyacente, con el C4 de la pirimidina orientada 3' (**Figura 6**) [37-41].

Determinaciones certeras de la distribución de los fotoproductos de bupirimidina han demostrado que las secuencias TT y TC son mucho más reactivas que CT y CC. Así mismo se ha demostrado que la formación de TT CPDs por UVA es más alta que las causadas por UVB [37-41].

La presencia de estas lesiones en la cadena de ADN altera drásticamente los procesos en los que está involucrado, debido a que representan un bloqueo físico para los sistemas de replicación y de transcripción. Es muy aceptado que este bloqueo estérico tiene como consecuencia la activación de un punto de monitoreo (checkpoint) de fase S por medio del cual se evitan errores de replicación, que podrían generar mutaciones, rupturas cromosómicas y recombinación del ADN. Aún más importante es el hecho que los fotoproductos de UV en la molécula de ADN son la causa principal de muerte celular por apoptosis posterior a la irradiación con este agente (**Figura 7**) [37-42].

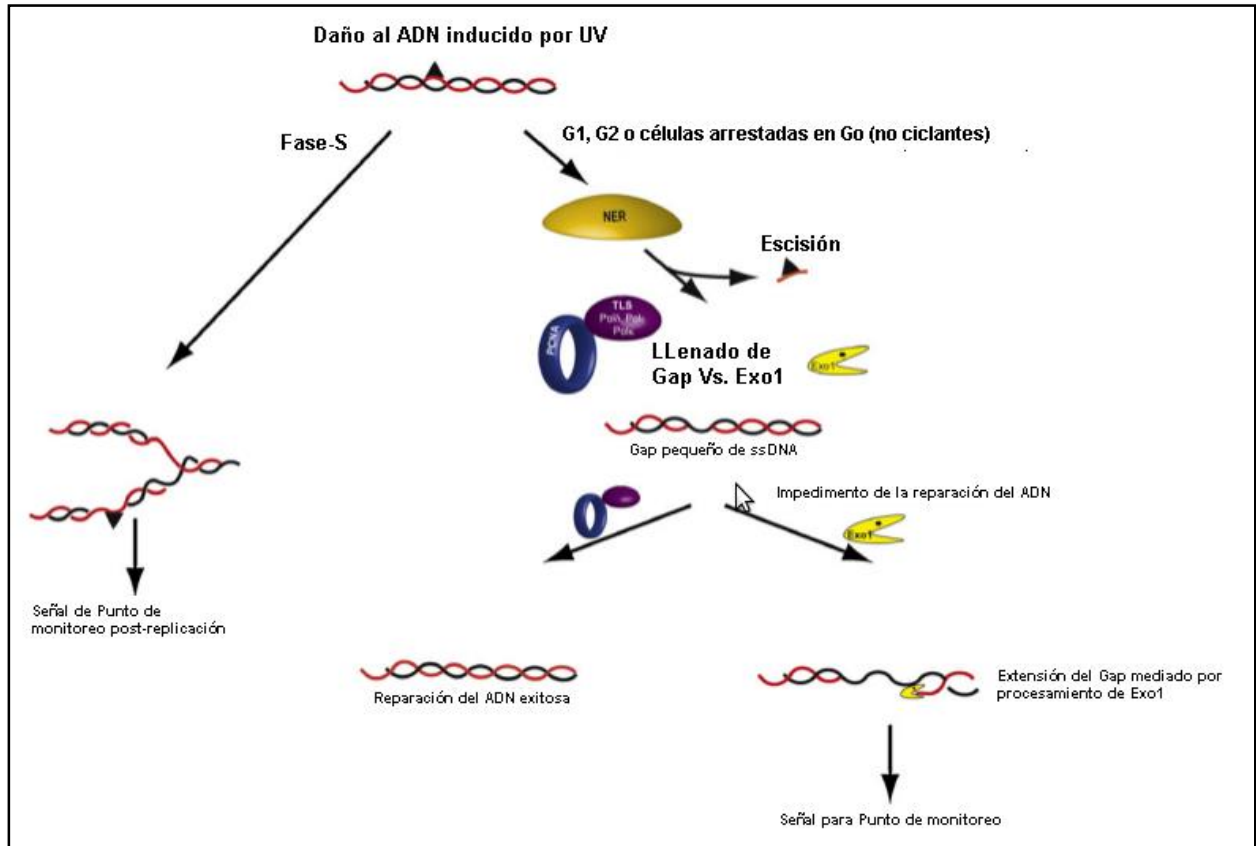


Figura 7. Activación de puntos de monitoreo mediada por daño al ADN causado por radiación UV. En células que no se encuentran replicando su genoma (i.e., G1, G2 y células arrestadas en G0), NER remueve las lesiones de manera eficiente y las polimerasas (i.e., Pol δ , Pol ϵ y Polimerasas TLS) llenan el "gap" introduciendo los nucleótidos correspondientes. Si el proceso de reparación es impedido después del paso de escisión, se presenta una competencia entre la actividad de Exo1 y las polimerasas. El impedimento del relleno (e.g., lesiones opuestas cercanas) favorece el procesamiento de Exo1 generando un "gap" de ssADN más largo, reclutando factores de punto de monitoreo. A bajas dosis de UV las células no acumulan ssADN largos gracias a la reparación eficiente. Si el daño sigue presente cuando la célula entra a fase S, la polimerasa replicativa será bloqueada por el abultamiento y reiniciará ríodo debajo de la lesión dejando un "gap" de ssADN detrás de la horquilla. Estos "gap" pueden ser solucionados mediante reparación post-replicativa o bien activar puntos de monitoreo post-replicativos. Adaptada de [42]

4. Mecanismos de reparación del ADN y sus vías

La reparación del ADN es el proceso celular dirigido a la corrección del daño antes de resultar en una mutación, aberración cromosómica (en células germinales o somáticas), conducir a muerte celular y tumorigénesis. Si bien la supervivencia de una especie al paso del tiempo puede ser optimizada por la variabilidad genética, la supervivencia del individuo exige mantener la estabilidad genética en todo momento [43].

Como se ha mencionado, hay múltiples tipos de daño al ADN (abultamiento por aductos, rompimientos de hebras, mal apareamiento de bases, entrecruzamientos, sitios AP, modificaciones de bases, etc.), cada uno atendido por una respuesta celular específica denominada mecanismos de reparación del ADN (**Figura 8**). En el genoma humano se han encontrado más de 130 genes relacionados con estos procesos [44].

En años recientes varios reportes han sugerido cómo el daño al ADN puede inducir cambios de “splicing” que pueden dar lugar a variantes de mRNA que codifican para diferentes isoformas de proteínas con el potencial de afectar la respuesta y el destino celular [45].

Daño al ADN, mecanismos de reparación y variaciones tras la diferenciación partiendo de células troncales humanas.

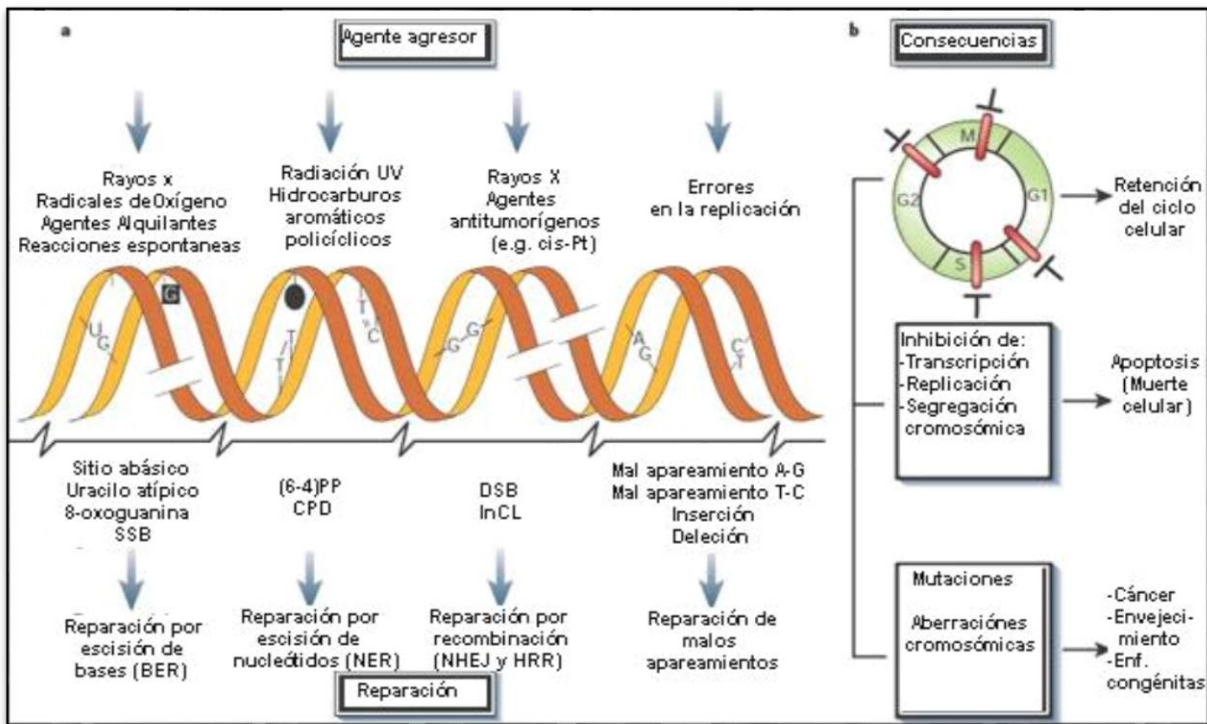


Figura 8. Daño al ADN, mecanismos de reparación y consecuencias. **a.** Agentes dañinos al ADN comunes (arriba); ejemplos de lesiones inducidas por estos agentes (en medio); mecanismo de reparación del ADN encargado de remover la lesión (abajo). **b.** Efectos del daño al ADN sobre el progreso habitual del ciclo celular, conduciendo a la retención en las fases G1, S, G2 y M (arriba), y en el metabolismo del ADN (en medio). Consecuencias a largo plazo de daño al ADN (abajo), que incluyen cambios permanentes a la secuencia del ADN (mutaciones puntuales que pueden afectar un solo gen o aberraciones cromosómicas que pueden incluir múltiples genes) y sus efectos biológicos. Adaptada de [46]

Cis-Pt y MMC: cisplatino y mitomicina C, respectivamente (ambos agentes generadores de entrecruzamientos); (6-4)PP y CPD: 6-4 fotoproductos y dimeros de ciclobutano pirimidina, respectivamente (ambos generados por radiación UV).

4.1. Reparación de rupturas de cadena simple (SSB) y lesiones intracatenarias.

La generación de SSBs y alteraciones estructurales de las hebras del ADN, como se mencionó en secciones anteriores, son causadas por diversos tipos de agentes, así mismo, los mecanismos de reparación de ADN involucrados en su restauración son muy eficientes para asegurar la remoción del daño con la finalidad de conservar la fidelidad de la información genética.

Los mecanismos involucrados en la reparación de rupturas de cadena simple y lesiones intracatenarias son: la reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación de apareamientos erróneos (MMR).

4.1.1. Reparación por Escisión de Bases (BER)

La BER corrige lesiones a bases nucleotídicas que no distorsionan la estructura helicoidal de la molécula de ADN, sitios AP y SSBs. Dichas lesiones normalmente provienen de desaminación, oxidación o alquilación. Por tanto, la mayoría del daño proviene del decaimiento espontáneo del ADN, aunque también es causado por productos químicos, radiación o agentes citostáticos. La BER se realiza tanto en el núcleo como en la mitocondria. La identificación de la uracilo-ADN-glicosilasa (uDG) de *Escherichia coli* en 1974 por Thomas Lindahl marcó el descubrimiento de BER. Lindahl buscaba una actividad enzimática que actuara en el uracilo obtenido tras la desaminación de la citosina. La enzima descrita en el artículo original [47] se refiere a una enzima capaz de cortar el enlace entre el uracilo y la desoxirribosa. En su momento fue sugerido que el sitio abásico (o AP) se procesaba por una AP-endonucleasa, una exonucleasa, una ADN-polimerasa y una ligasa, describiendo entonces los pasos fundamentales de la BER. Las enzimas que cortan el enlace entre la desoxirribosa y una base en el ADN, ya sea modificada o mal apareada, se conocen como ADN-glicosilasas. Colectivamente estas enzimas inician la reparación por escisión de bases de una gran diversidad de lesiones (**Figura 9**), cada una de las cuales es reconocida por una o algunas ADN-glicosilasas (**Tabla 1**) [48].

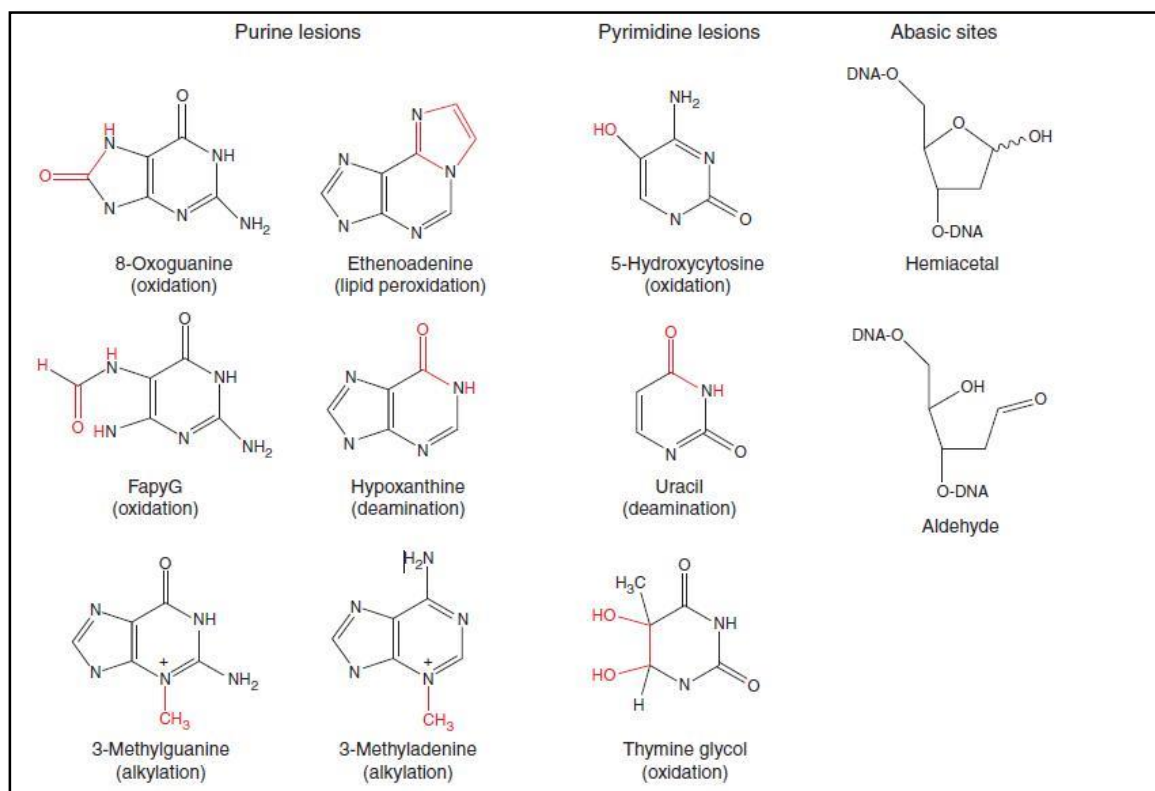


Figura 9. Estructura química de las lesiones a bases y sitios abásicos más comunes. Adaptada de [48].

Ante el daño al ADN, la BER es iniciada y el proceso puede ser simplificado en 5 pasos fundamentales: (a) Reconocimiento y remoción de la base del ADN dañada, (b) incisión del sitio AP resultante, (c) “limpieza” de las terminaciones del ADN, (d) inserción del nucleótido apropiado al sitio de reparación (“gap”), y por último (e) la ligación de la incisión en el esqueleto de fosfatos. Cada paso es ejecutado por enzimas específicas, altamente coordinadas tanto por interacciones proteína-proteína como por la formación de complejos. En el reconocimiento (paso 1) y remoción de la base dañada (paso 2) participan las glicosilasas, estas son clasificadas en mono- y bi-funcionales con base en su mecanismo de reacción (**Figura 10**), en el caso de una glicosilasa monofuncional como la uracil-ADN-glicosilasa se extrae solamente la base generando un sitio AP. En

la incisión del sitio AP, participa la AP endonucleasa-1 (APE1), este paso consiste en la generación de un corte en el lado 5' del sitio abásico provocando un SSB y por ende generando una terminación 3'-hidroxilo y una 5'- desoxirribosa fosfato (dRP). En contraste las ADN-glicosilasas bifuncionales tienen asociada una actividad de liasa, no obstante es una actividad débil, como es el caso de la 8-oxoguanina ADN-glicosilasa (OGG1), que realiza este segundo paso generando un SSB inducido y formando terminaciones diferentes. Por ejemplo, OGG1 y el homólogo de la endonucleasa III (NTH1) tienen una actividad β -liasa creando un "gap" con distancia de un nucleótido con terminaciones 3'-aldehído- α,β -insaturado y 5'-hidroxilo, mientras que las proteínas parecidas a endonucleasa VIII (NEIL1-3) generan terminaciones 3'- y 5'-fosfato [49-53].

Tabla 1. Clasificación de glicosilasas mono- y bifuncionales. Adaptada de [49].

Simbolo del Gen	Gen	Tipo de glicosilasa	Sustratos
OGG1	8-oxoguanina ADN glicosilasa	Bifuncional	8-oxoG:C/G/T; FapyG
MUTYH	Homólogo de Muty (E.coli)	Monofuncional	8-oxoG:A
TDG	Timina-ADN glicosilasa	Monofuncional	T:G; etenoC:G
MBD4	Proteína de unión a dominios Metil-CpG 4	Monofuncional	T:G; 5-meCpG: TpG: O ⁶ -meG:T
UNG	Uracil-ADN glicosilasa	Monofuncional	Uracilo.
SMUG1	Glicosilasa monofuncional selectiva de cadena sencilla uracil-ADN 1	Monofuncional	U:G; 5-hidroximetiluracilo; 5-formiluracilo
NTHL1 (NTH1)	Endonucleasa parecida a NTH III 1 (E. coli)	Bifuncional	Pirimidinas oxidadas, formamidopirimidinas, 5-formiluracilo; realiza incisión de los sitios AP
NEIL1	Endonucleasa parecida a NEI VIII 1 (E. coli)	Bifuncional	Pirimidinas oxidadas, formamidopirimidinas, timinglicol, hidantoina, guanidin-hidantoina, spiroiminohidantoina
NEIL2	Endonucleasa parecida a NEI VIII 2 (E. coli)	Bifuncional	Pirimidinas oxidadas
NEIL3	Endonucleasa parecida a NEI	Bifuncional	hidantoina, guanidin-

Daño al ADN, mecanismos de reparación y variaciones tras la diferenciación partiendo de células troncales humanas.

	VIII 3 (E. coli)		hidantoina, spiroiminohidantoina
AAG (MPG)	N-metilpurina-ADN glicosilasa	Monofuncional	1-N ² -etenoG; Uracilo

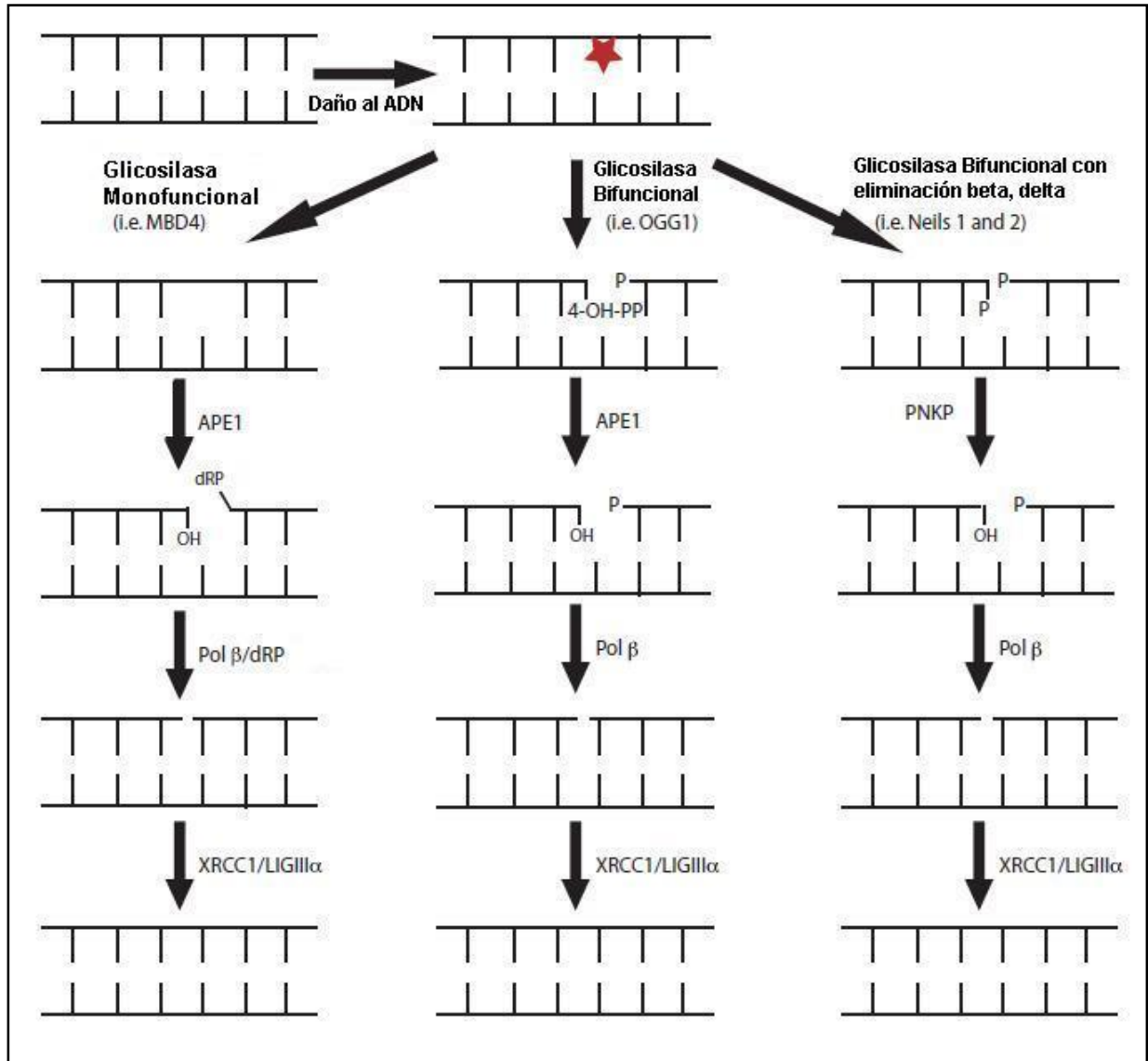


Figura 10. Reparación por escisión de bases (BER). Hay cinco pasos principales en el mecanismo de BER: (1) Escisión de la base dañada; (2) Incisión del sitio AP; (3) Modificación de las terminaciones del ADN en el sitio de corte; (4) Llenado del "gap"; (5) Cierre de la incisión por las ligasas. En el caso de glicosilasas monofuncionales (i.e. MBD4), la base dañada es removida dando como resultado un sitio AP. APE1 realiza los cortes en los enlaces fosfodiéster del sitio AP dejando un extremo 3'OH y 5'dRP. Polβ remueve el dRP mediante su actividad de liasa y coloca en nucleótido apropiado. En el caso de las glicosilasas bifuncionales (i.e. OGG1) la base dañada es removida y la glicosilasa hace la incisión en el sitio abásico dejando un extremo 3' 4-OH pental fosfato (4-OH-PP) y 5' fosfato. APE1 modifica el extremo a 3'OH y Polβ rellena el "gap". En la vía independiente de APE1, las glicosilasas bifuncionales

(i.e. NEIL 1 y 2) remueven la base dañada y escinden el sitio abásico vía eliminación β, δ , generando extremos 3' y 5' fosfato. PNKP modifica el extremo a 3'OH y Pol β rellena el "gap". En el último paso, el ADN es ligado por el complejo XRCC1/LigIII α . Adaptada de [49].

El tercer paso de la BER involucra la "limpieza" o tratamiento de estas terminaciones para que sean las apropiadas para la incorporación del nucleótido y la ligación, proceso que es realizado por enzimas específicas a la naturaleza de las terminaciones. Cortes que contienen fracciones 5'-dRP generadas por glicosilasas monofuncionales, o vía BER clásica, son tratadas por la ADN-polimerasa β (Pol β) y las terminaciones 3'-aldehído- α, β -insaturado o 3'-fosfato creadas por glicosilasas bifuncionales son procesadas por APE1 y la fosfatasa de la polinucleótido cinasa (PNKP) respectivamente [49-53].

El cuarto paso en la BER es realizado por la Pol β la cual adiciona el nucleótido correspondiente al sitio AP y finalmente, la XRCC1 (X-ray cross complementing protein -1) y la ligasa III α sellan la hendidura en el esqueleto de fosfatos de la molécula del ADN. De esta forma se completa la vía "short-patch" del mecanismo de BER, mediante el cual la mayoría de las lesiones a bases del ADN son reparadas [49-53].

En caso de que las terminaciones 5' del SSB en el paso 3 sean resistentes al procesamiento, después de la inserción del nucleótido apropiado, se efectúa un cambio de polimerasa, de la Pol β a la polimerasa δ/ϵ (Pol δ/ϵ), la cual inserta ~2-10 nucleótidos adicionales al "gap" de reparación. Esto genera una terminación 5' con estructura de tapa ("5'-flap") la cual es reconocida y escindida por la flap endonucleasa-1 (FEN-1) en asociación con el factor de procesamiento antígeno nuclear de proliferación celular

(PCNA). Por último la ADN-ligasa I (Lig I) sella la apertura remanente en el esqueleto de fosfatos con lo cual se completa la vía “long-patch” de BER (**Figura 11**) [49-53].

El balance entre las vías “long-patch” y “short-patch” de la BER radica en la concentración de las enzimas y proteínas de andamiaje y la presencia de lesiones bloqueadoras de la terminación 5’ en el sitio de reparación (**Figura 11**) [54].

Interesantemente se ha observado que PARP-1 es uno de los primeros factores en unirse al intermediario SSB, una vez unido PARP-1 se activa y pasa por auto-poli(ADP)ribosilación. Esta activación parece facilitar la BER dado que el tratamiento de células con un inhibidor de PARP-1 bloquea la BER y se observa un incremento en lesiones tipo intermediarios SSB, especialmente cuando hay una deficiencia de la enzima/cofactor clave de la BER, XRCC1 o ADN polimerasa β (Pol β) [56].

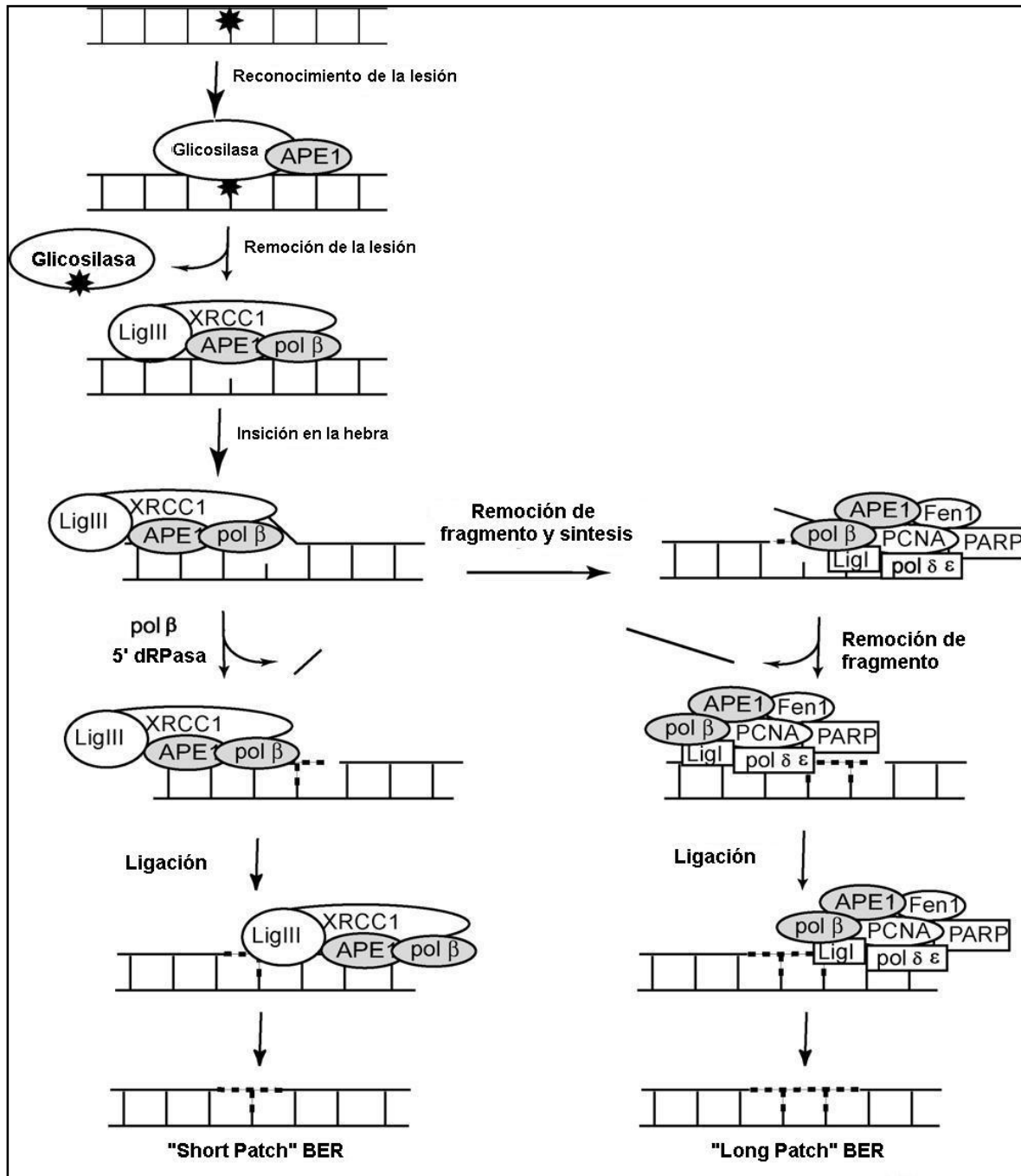


Figura 11. Mecanismo clásico de BER. La vía "Short Patch" (izquierda) donde la actividad de la glicosilasa es la iniciadora, seguida por la escisión de la cadena por APE1. Formación del "gap" (5'dRP liasa) y finalmente la incorporación de nucleótidos mediada por Polβ. El corte remanente es sellado por el complejo XRCC1/ LigIIIα. La vía "Long Patch" (derecha) es la responsable de reparar lesiones donde los extremos son refractarios al corte de Pol β. En esta vía la incorporación de nucleótidos es realizada por Polδ y Polε. La terminación refractaria es removida como parte de un segmento mayor escindido por FEN-1 y la ligación es realizada por Lig I. Adaptada de [57].

4.1.2. Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

Este mecanismo de reparación es uno de los más importantes, capaz de corregir una amplia gama de lesiones a bases que inducen la modificación de la estructura helicoidal apropiada del ADN. Los sustratos para la NER incluyen foto-lesiones inducidas por UV como son los CPDs, 6-4PP, así como otros abultamientos generados por diversos compuestos químicos. En humanos, los defectos hereditarios en el sistema NER están asociados con varios desordenes autosomales recesivos, incluyendo xeroderma pigmentosum (XP), el cual es caracterizado por fotosensibilidad y predisposición a cáncer de piel por exposición a luz solar. Dentro de los 8 grupos genéticos complementarios de XP, las mutaciones de siete (XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F, XP-G) confieren defectos en la funcionalidad de la NER, debido a esto, los genes responsables han sido clonados y los roles de sus productos proteicos en el mecanismo molecular de NER han sido estudiadas extensamente [58-63].

El paso crucial en todos los mecanismos de reparación del ADN es el reconocimiento inicial del sitio de daño. En el caso de la NER, en mamíferos, este paso es logrado mediante la acción secuencial de diversos factores proteicos, los cuales parecen ser regulados en una modalidad coordinada de interacciones proteína-proteína, modificaciones postraduccionales y estructura de la cromatina que rodea el sitio de la lesión [58-63].

La NER consiste en dos diferentes vías para el reconocimiento del daño al ADN: Una denominada reparación global del genoma (GG-NER), la cual repara lesiones a lo largo de todo el genoma en cualquier momento, y la reparación acoplada a la transcripción

(TC-NER), la cual remueve lesiones específicamente de la cadena de ADN transcrita en la secuencia de los genes activos y ésta inicia cuando la ADN polimerasa (δ/ϵ) es bloqueada por los sitios dañados [58-63].

Se sabe que TC-NER contribuye a la pronta restauración de la actividad transcripcional bloqueada por el daño al ADN, lesiones que son removidas de manera pobre por GG-NER, previniendo entonces que se desencadene el proceso de apoptosis en las células afectadas. Por otra parte, la remoción de las lesiones generadas en la secuencia de ADN no transcrita y en las regiones genómicas transcripcionalmente apagadas depende totalmente de GG-NER. Esta última es particularmente importante ya que disminuye la incidencia del bloqueo de los complejos de replicación debido al daño a la secuencia a transcribir, y en consecuencia reduce la probabilidad de adquirir mutaciones y aberraciones cromosómicas [58-63].

A pesar de las diferencias en las vías de NER para reconocer el daño, las reacciones sucesivas para la reparación de las lesiones correspondientes a este mecanismo parecen ser semejantes (**Tabla 2**). Un componente clave involucrado en la etapa temprana de este mecanismo de NER general es el factor de transcripción básica IIH (TFIIH), el cual está compuesto por diez subunidades: XPB, XPD, p62, pP52, p44, p34, p8, el complejo de la cinasa activadora de CDKs (CAK: compuesto por MAT1, CDK7 y ciclina H), XPB y XPD, estas últimas dos poseen actividad de ADN helicasas dependientes de ATP y ayudan en la apertura catenaria. En GG-NER, TFIIH es reclutado a los sitios que contienen la lesión, probablemente mediante interacción directa con el complejo XPC/hHR23B (junto con centrina2) en conjunto con la proteína

de unión a ADN dañado por UV (UV-DDB), mientras que en TC-NER la ARN-polimerasa II y/o CSB, esta última una proteína involucrada en el síndrome Cockayne, otro desorden genético del que es responsable la deficiencia de NER, son los que reclutan a TFIIH. Una vez realizado el reconocimiento por los factores descritos ambas vías de NER proceden igual [58-63].

Tabla 2. Pasos principales y proteínas participantes en GG-NER y TC-NER. Solo el paso de reconocimiento de la lesión difiere entre las 2 vías. *De los múltiples componentes de TFIIH solo se muestran XPB y XPD. RPA (no enlistado) participa en NER uniéndose y protegiendo al ADN de degradación tras la apertura del dúplex. Adaptada de [12].

Paso de NER	Proteína	Actividad bioquímica	Sustrato
Reconocimiento <ul style="list-style-type: none"> • GG-NER • TC-NER 	XPC/RAD23B DDB1/DDB2 (XPC) XPA CSA CSB	Unión a ADN/Reclutamiento de TFIIH. Unión a ADN. Unión a ADN. Desconocido/Componente del complejo ubiquitin ligasa. ATPasa dependiente de ADN.	Distorsión en la hélice del ADN. ADN dañado por UV. XPC-TFIIH unido al ADN. ARN Polimerasa atascada. ARN Polimerasa atascada.
Desenrollamiento del ADN (Complejo multisubunidad TFIIH*)	XPB (ERCC3) XPD (ERCC2)	3'-5' ADN helicasa/ATPasa 5'-3' ADN helicasa/ATPasa	
Incisión	XPG (ERCC5) ERCC1/XPF (ERCC4)	Incisión 3' Complejo de incisión 5' (catalizada por XPF)	5' Flap, burbuja. 3' Flap, burbuja.
Polimerización	Pol δ (Pol ϵ)	Polimerasas replicativas asociadas a PCNA	"gap" del ADN (~25-30 nt).
Ligación	Lig I XRCC1/LigIII α	Ligasa Complejo ligasa	Incisión del ADN. Incisión del ADN.

Así como sucede en los sitios promotores de iniciación de transcripción, TFIIH promueve la apertura local del dúplex de ADN en los sitios del daño. Las actividades de ATPasa de XPB y XPD facilitan la apertura del dúplex de ADN, permitiendo al complejo de pre-incisión introducirse al sitio de la lesión. El complejo de pre-incisión está conformado por las proteínas XPG y XPA, así como la proteína de replicación A (factor heterotrimérico de unión a ADN de cadena simple; RPA). Aunque se sabe que XPG es una endonucleasa estructura-específica que hace un corte 3' a la lesión, también interactúa con el complejo TFIIH estabilizándolo, y por tanto contribuye a la apertura de la doble hélice independientemente de su actividad de nucleasa. Posteriormente, RPA estabiliza la conformación del ADN abierto por medio de una interacción con la cadena del ADN no dañado. XPA se une con moderada especificidad al ADN dañado, reacción que es potenciada por la interacción con RPA. Este complejo XPA-RPA funciona más como un mecanismo de verificación de daño que como un mecanismo de reconocimiento inicial de daño, y que también participa como orquestador organizacional, facilitando el posicionamiento del complejo de replicación alrededor de la lesión. La llegada de XPA-RPA también cataliza la liberación del complejo CAK de TFIIH, paso que es esencial para la iniciación del proceso de incisión/escisión de la secuencia dañada [58-63].

RPA consiste en 3 subunidades que con gran afinidad se unen a la secuencia de ADN sin daño. Esta proteína cubre apenas 30 nucleótidos (que corresponde en tamaño a la secuencia escindida en NER) y se cree que desempeña un papel como protector de cadenas sencillas de ADN para evitar que sean atacadas por nucleasas.

Adicionalmente interactúa con otras proteínas de NER, como las endonucleasas XPG y ERCC1-XPF, las cuales son necesarias para la doble incisión de la secuencia dañada [58-63].

Cuando el complejo de preincisión está instalado adecuadamente, se efectúan los SSB por XPG y ERCC1-XPF cuyas acciones combinadas resultan en la escisión de un fragmento de ADN de cadena sencilla de 24-32 nucleótidos, el cual incluye el sitio dañado. Mientras que XPG realiza el corte 3', el dímero ERCC1-XPF lo realiza en 5'. Staresinic *et al.* [58] proponen un mecanismo de "corte-parche-corte-parche" que implica que la incisión 5' preceda a la 3' [58-63].

La escisión del fragmento dañado es restaurada a su estado original (sin daño) por medio de la síntesis y ligación del ADN, ya sea por el mecanismo de "corte-parche-corte-parche" o por el de escisión completa seguida de síntesis y ligación. En este paso la importancia de XPG y RPA resurge ya que ambas son necesarias para el proceso de post-incisión. Se cree que XPG es la encargada de reclutar a PCNA. La síntesis de la cadena procesada requiere de PCNA debido a su afinidad por las ADN polimerasas. Estudios recientes muestran que al menos tres polimerasas están involucradas en la síntesis de la secuencia escindida: Pol δ , Pol κ y Pol ϵ . Posterior a la síntesis los extremos 5'-P y 3'-OH deben ser ligados, operación que realiza mayoritariamente el complejo XRCC1/LigIII α , el cual se acumula en células tanto quiescentes como en proliferación, después de ser irradiadas con UV, y la Lig I que parece estar involucrada exclusivamente en el proceso de ligación en células en proliferación. A la fecha se

conoce que son 30 las proteínas que conforman el mecanismo de NER para contrarrestar los daños en el ADN descritos previamente (Figura 12) [58-63].

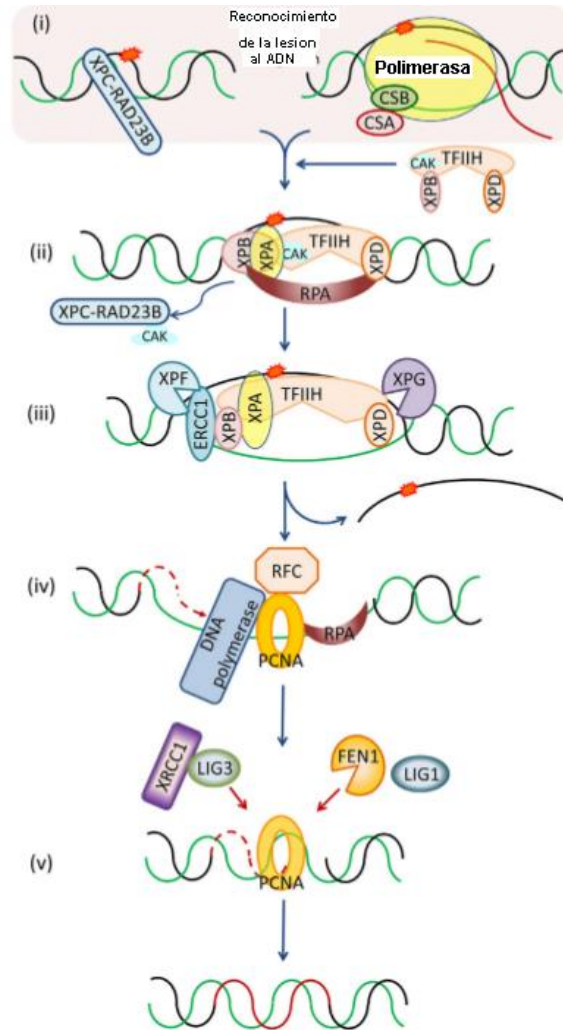


Figura 12. Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y sus sub-vías: GG-NER y TC-NER. (i) XPC-RAD23B reconocen el daño al ADN como paso inicial en GG-NER. TC-NER es iniciado por el bloqueo de la maquinaria de transcripción debido a la modificación estructural de la secuencia del gen transcripcionalmente activo. Posterior al reconocimiento de la lesión, GG-NER y TC-NER involucran componentes proteicos afines. (ii) el complejo TFIIH es reclutado posterior al reconocimiento. Mediante la actividad de helicasa de las subunidades XPB y XPD, TFIIH promueve la apertura del dúplex de ADN alrededor de la lesión, facilitando el reclutamiento de XPA y RPA. (iii) el complejo XPF-ERCC1 es reclutado al sitio de la lesión mediante interacción directa con XPA, mientras que XPG es anclado de manera específica mediante la interacción con TFIIH. Dos endonucleasas, XPF-ERCC1 y XPG, son responsables de realizar la incisión 5' y 3', respectivamente, en el área afectada. (iv) posterior a la doble incisión y a la remoción del fragmento oligonucleotídico que contiene el daño, la ADN polimerasa comienza a rellenar el "gap" en cooperación con RFC y PCNA. (v) finalmente, el corte es sellado tanto por XRCC1/LigIII α como por FEN1/LigI. CAK: Cinasa activadora de la ciclina dependiente de cinasa; RFC Factor de replicación C. Adaptada de [1].

4.1.3. Reparación de apareamientos erróneos (MMR)

Este mecanismo está encargado de corregir errores de replicación en la hebra recién sintetizada. Para mantener la estabilidad genómica, MMR debe ser dirigido a la hebra naciente por una o más señales de discriminación catenaria como ausencia de marcas de metilación en la cadena naciente. MMR es un proceso evolutivamente conservado que corrige los apareamientos erróneos generados durante la replicación del ADN que han escapado al sistema a prueba de error o edición de las polimerasas. Esto es logrado gracias a la interacción de proteínas heterodiméricas con la secuencia de ADN que contiene la lesión, cabe destacar que a pesar de conocer detalladamente el mecanismo de la MMR dirigida por metilos de *E. coli* (MD-MMR), muy poco se sabe respecto a las señales de discriminación y el mecanismo detallado en el caso de eucariontes aunque se asume cierta homología [64-67].

Cuando la integridad genómica se ve comprometida, por estos procesos de inserciones erróneas de nucleótidos por las polimerasas replicativas, proteínas y genes específicos son activados. Uno de estos grupos es la familia de proteínas MutS, integrada por MSH2, MSH3 y MSH6, que está altamente conservada entre especies y se identificó por primera vez en *E. coli*. Estas proteínas MSH reconocen errores en la secuencia del ADN durante la replicación previniendo la duplicación de la cadena dañada y reparando SSBs. MSH2 se une a MSH6 en presencia de apareamientos erróneos de bases formando el heterodímero MutS α (MSH2-MSH6), o bien se une a MSH3 en presencia de delección de bases generando el heterodímero MutS β (MSH2-MSH3) [64-67].

Otros dímeros (por ejemplo MutL y MthH) son reclutados e interactúan con el ADN para iniciar la señalización de la reparación. El heterodímero MutS α se une a la región alterada en el ADN y recluta a la familia de proteínas MutL, como MLH1 y PMS2 con la finalidad de activar a las enzimas requeridas para la reparación. El complejo ADN-MMR inicia el proceso de señalización para reemplazar la secuencia de ADN alterada por medio de la acción de la ADN polimerasa δ y la ligasa I (**Figura 13**). Cabe señalar que el mecanismo de reclutamiento de las proteínas del MMR es dependiente de ATP [64-67].

Adicionalmente, la actividad de los dos dímeros de MutL en el sitio de ADN con el error depende de interacciones con PCNA, el cual es un cofactor de gran importancia que participa tanto en la replicación del ADN como en procesos de reparación. PCNA interactúa con los dímeros de MutS α a través de su dominio MSH6 y el dímero MutS β se une a él mediante una región cerca del dominio MSH3 [64-67].

Los sistemas post-replicativos de ADN-MMR son críticos durante la respuesta contra diversos estímulos dañinos que afectan la fidelidad del ADN, como el estrés oxidante, xenobióticos, radiación, etc. Se ha corroborado que MSH2 participa en el arresto del ciclo celular y apoptosis por diferentes mecanismos, dependientes de la extensión del ADN dañado. Experimentos realizados en una línea celular humana linfoblastoide no tumorigénica *msh2*^{-/-} han demostrado que el sistema MMR promueve el arresto en G2/M después del sometimiento de las células a daño por radiación UVB, y que la deficiencia en MSH2 conduce a una reducción en la activación del punto de monitoreo G2/M del ciclo celular tras la exposición a este agente. Así mismo se observó que las

células competentes en MSH2 incrementan los niveles de las proteínas de punto de monitoreo del ciclo celular como CHK1, CDC25C cuando son comparadas con las deficientes tras el tratamiento con UVB. Estas proteínas, en su estado fosforilado en los residuos aminoacídicos específicos (Ser345, Ser216, Tyr15 y Thr14), regulan el control del ciclo celular e inhiben la división de las células hasta que las alteraciones a la secuencia del ADN sean corregidas, concordando entonces con la idea de que el sistema MMR tiene la capacidad de generar el arresto del ciclo celular **[64-67]**.

Cuando hay deficiencias en los mecanismos de reparación, como en MMR, y estos no son capaces de detectar las secuencias de ADN dañadas, las vías de señalización celular, así como la homeostasis celular, se vuelven inestables debido a que la fidelidad del ADN está comprometida **[64-67]**.

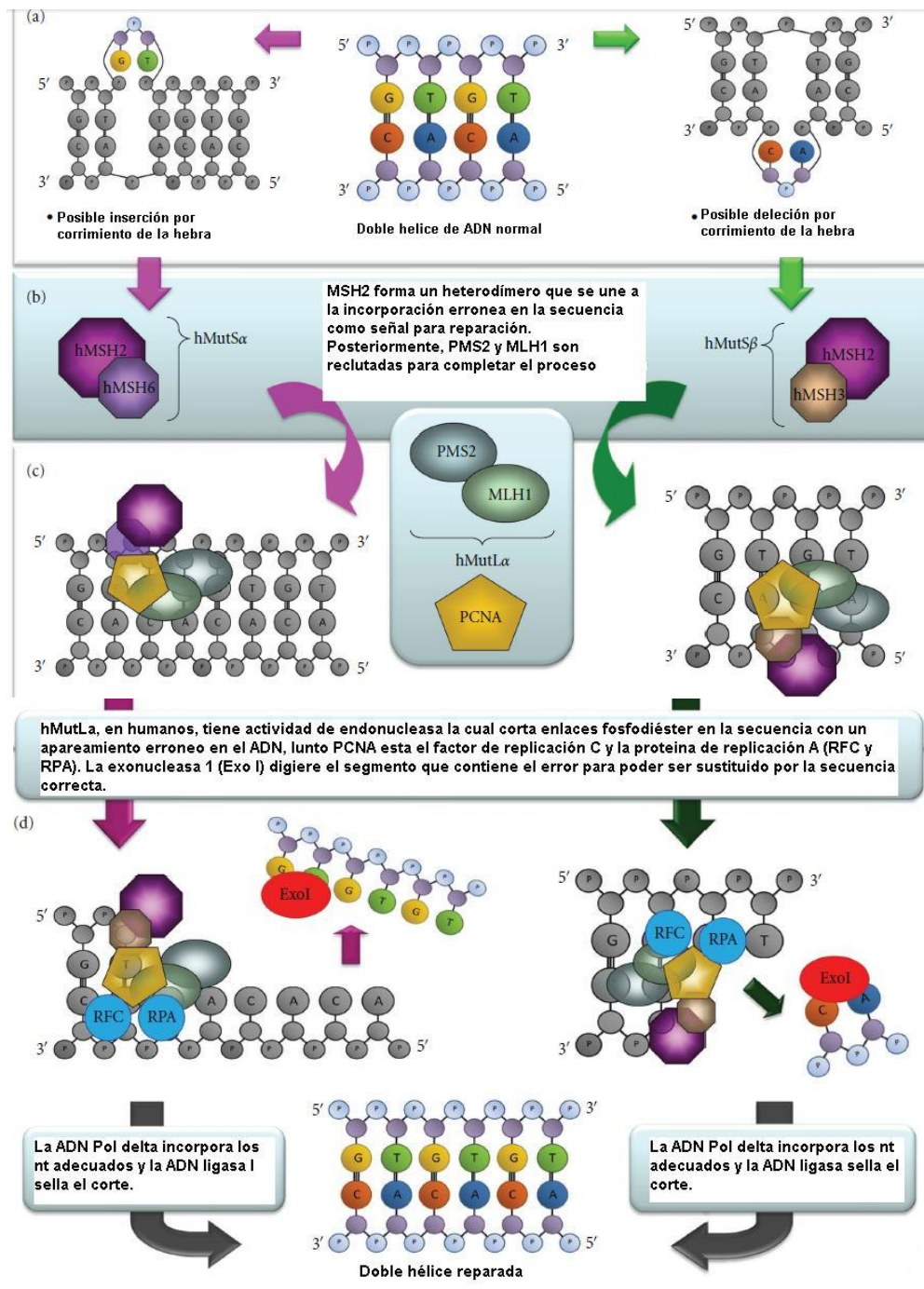


Figura 13. Mecanismos generales de reparación por MMR. Dependiendo del tipo específico de lesión en la secuencia genómica, la familia de proteínas MSH inicia vías de señalización para mantener la integridad y fidelidad de la información genética. (a y b) MSH2 se une a MSH6 en la presencia de malos apareamientos de bases formando el heterodímero MutS α (MSH2-MSH6), o bien, se une a MSH3 en caso de deleción de bases, generando el heterodímero MutS β (MSH2-MSH3). (c) MLH1 y PMS2 ejercen su actividad reclutando a las enzimas necesarias para la reparación. (d) El complejo ADN- MMR inicia la señalización para reemplazar la sección dañada mediante el reclutamiento de la ADN Pol δ y finalmente el sellado de la incisión por la Lig I. El mecanismo de reclutamiento de las proteínas de la MMR es dependiente de ATP. Adaptada de [65].

4.2. Reparación de Rupturas de Doble Cadena (DSBs)

Los DSBs son considerados la forma más deletérea de daño al ADN debido a la ausencia de una cadena complementaria completa para usar como templatado en asistencia a la reparación. De no ser reparados pueden conducir a rompimientos y translocaciones cromosómicos los cuales están asociados con defectos en el desarrollo, neurodegeneración, inmunodeficiencias, radiosensibilidad, esterilidad y predisposición a cáncer [68].

DSBs pueden surgir a causa de factores exógenos como IR, exposición a productos químicos o por rompimientos cromosómicos inducidos durante el desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa, como la recombinación V(D)J y la recombinación de cambio de clase (CSR). Alternativamente, la acción indirecta de numerosos agentes dañinos al ADN que pueden llevar a DSBs, especialmente en células en replicación. La razón de esto es que las lesiones relativamente inofensivas en células en las fases G1:G2 con un sistema de reparación competente, pueden degenerar en una DSB cuando se manifiesten en un contexto de replicación del ADN [69].

En respuesta a los DSBs las células montan una respuesta que puede ser monitoreada citológicamente por medio de la acumulación de señales y factores de reparación en la cromatina que rodea el rompimiento del ADN, lo cual es manifiesto de la formación de distintas estructuras sub-nucleares las cuales son denominadas “foci”.

La respuesta temprana a DSBs emplea interacciones proteína-proteína dependientes de fosforilación para coordinar el reconocimiento del daño y para amplificar la señal.

Los DSBs son detectados primeramente por el complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1) y por las proteínas Ku70/80 quienes rápidamente reclutan y activan a las ser/thr cinasas ATM y DNA-PKcs (La subunidad catalítica de la proteína cinasa ADN-dependiente). Ambas cinasas son miembros de la familia PIKKs, las cuales activan una extensa red de DDR que incluye, entre otras cosas, la activación de puntos de monitoreo del ciclo celular y la facilitación de la reparación al ADN (**Figura 14**).

Durante esta respuesta temprana, la fosforilación de la variable de la histona H2A, la H2AX, mediada por ATM y en menor medida por DNA-PKcs en el residuo ser139 es de suma importancia ya que la forma fosforilada de la H2AX (H2AX γ) sirve como marca del daño al ADN, lo cual medía la subsecuente acumulación de proteínas inductoras de señales en el sitio DSB. En particular, MDC1 (mediador del punto de control de daño al ADN 1), el cual es crítico para la acumulación focal de 53BP1 (Proteína de unión a p53) y el producto del gen supresor de tumores BRCA1 (gen de susceptibilidad a cáncer de mama 1), ambos involucrados de manera importante en sinergia con MDC1 (Proteína de punto de monitoreo mediadora del daño al ADN) como mediadores del punto de control de daño al ADN y están involucrados en la promoción de la reparación de DSBs **[42, 70, 71]**.

Se debe enfatizar que estas etapas tempranas, en la iniciación y amplificación de la respuesta a DBSs dependen de interacciones proteína-proteína dependientes de fosforilación.

En DSBs, dos mecanismos principales son empleados por la célula, lo cual dependerá en parte de la etapa del ciclo celular en el que se realice el daño y estos son: NHEJ y HRR. Probablemente el factor más importante que determina la elección entre ambos mecanismos de reparación del ADN es la etapa del ciclo celular en el que se encuentra la célula al momento de detectar la lesión, sin embargo otros factores influyen, por ejemplo la competencia por las terminaciones en el sitio de la ruptura de ambos mecanismos NHEJ y HRR, las enzimas ku70/80 y RAD52 respectivamente (**Figura 14**) [72].

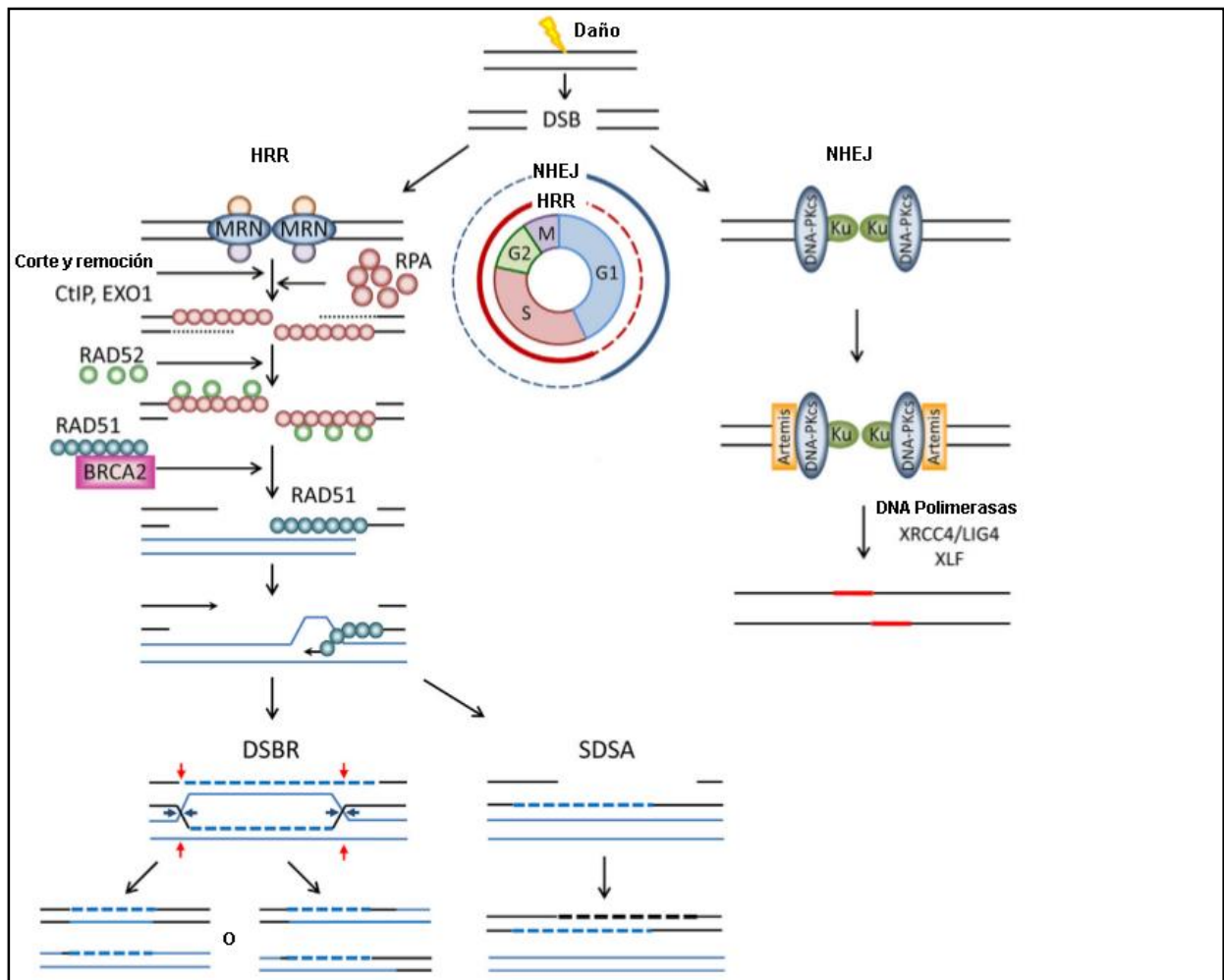


Figura 14. Mecanismos de recombinación. La reparación de DSBs (DSBR) está dividida en dos vías principales: HRR y NHEJ. HRR opera en células en proceso de división y fase S, mientras que NHEJ es activo todo el tiempo independientemente de la fase del ciclo celular. Se ha propuesto que HRR inicia con el reconocimiento de la DSB mediante el complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1). El complejo MRN se asocia a CtIP, el cual inicia el procesamiento 5'-3' dejando un extremo 3' ssADN. Dicho procesamiento es realizado por exonucleasas (posiblemente EXO1), y el ssADN resultante es estabilizado gracias a la unión de RPA. RAD52 es reclutada a RPA. Posteriormente el complejo RAD51-BRCA2 reemplaza al complejo RAD52-RPA para formar filamentos nucleoproteicos de RAD51. Los filamentos permiten la invasión a la cromátida hermana de la región homóloga completa. En la DSBR clásica, una vez que una de las cadenas invade la cromátida hermana, la otra cadena procesada del ADN dañado es "atrapada" por la homología con la correspondiente de la cromátida hermana formando una estructura de entrecruzamiento doble tipo Holliday, lo cual puede resultar en cross-over (cortes en las flechas azules y rojas) o bien de no-cross-over (corte en flechas azules). En SDSA, la cadena invasora es desplazada en el momento en el que la síntesis de ADN ha generado una secuencia homóloga que sirva de templado para la cadena sencilla remanente del DSB, resultando en un producto tipo No-cross-over. NHEJ es iniciada por el reconocimiento de la DSB mediado por el complejo Ku (Ku70/ Ku80), seguido por el reclutamiento de DNA-PKcs. DNA-PKcs activa a Artemis la cual está encargada de procesar las terminaciones de la DSB. Por último se efectúa la síntesis de nucleótidos para llenar los "gap" y la unión de los extremos por el complejo XRCC4-Lig IV. CtIP: Proteína de unión a c-terminal interactora; DNA-PKcs: Subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de ADN. (Para más detalles ver texto). Adaptada de [1].

4.2.1. Reparación por unión de terminaciones no homólogas (NHEJ)

Un DSB generado en una célula que no se encuentra en replicación es candidato para NHEJ, proceso en el cual las dos terminaciones son ligadas sin una extensiva referencia a la secuencia en el sitio de corte [69].

Las proteínas del sistema de reparación por NHEJ fueron identificadas por primera vez como intento de comprensión de los efectos causados por la RI y por la recombinación V(D)J del sistema inmunológico [73, 74]. Las proteínas que conforman el heterodímero Ku70 (69 kDa) y Ku86 (83 kDa, también conocida como Ku80) son el factor de unión al ADN de mayor importancia en NHEJ. La estructura cristalina del complejo Ku70/86-ADN reveló que el heterodímero tiene una distribución espacial toroidal, con un espacio medio lo suficientemente amplio como para alojar a una molécula bicatenaria de ADN. El interior de este anillo asimétrico está constituido por aminoácidos cargados positivamente lo cual favorece la interacción y estabilización del complejo (ADN-Ku70/80) por medio de interacciones electrostáticas con el esqueleto fosfodiéster (carga parcial negativa). La estructura anular no solo explica como Ku interactúa con las terminaciones del ADN en el sitio de corte y previene la degradación nucleolítica, sino que también proporciona un mecanismo por medio del cual Ku se desplaza a lo largo del ADN y conserva sus interacciones con las partes internas del mismo. Sorprendentemente, Ku es dependiente de inositol-6-fosfato (IP6), el cual se une al heterodímero. Al momento no se sabe si IP6 está unido permanentemente a Ku70/80 o si es sintetizado en respuesta al daño al ADN [76,77].

Una vez formado el complejo ADN-Ku70/80, DNA-PKcs es reclutada, cabe destacar que se ensamblan dos heterodímeros flanqueando la lesión a modo especular por lo que el proceso es bidireccional. Posteriormente el complejo se desplaza al borde de la ruptura y las DNA-PKcs, por medio de interacciones proteína-proteína, realizan la formación de un puente entre los dos extremos. Mientras esto ocurre es reclutada la proteína Artemis al complejo, formando lo que se conoce como complejo cinasa dependiente de ADN (DNA-PK), esta proteína tiene actividad de exonucleasa de ADN con actividad 5'-3'; debido a esto, en el lado opuesto (complejo DNA-PK') se une análogamente esta exonucleasa. La actividad de Artemis es procesar las terminaciones de ADN en la ruptura, esto es, escindiendo las bases dañadas o modificadas, actividad que realiza en conjunto con la proteína XRCC4. Esta última es reclutada junto con la DNA-ligasa IV por acción de DNA-PKcs [76,77].

Posterior al alineamiento y procesamiento de las terminaciones quedan pequeños vacíos ("gap") que requieren ser cubiertos para lo cual son reclutados miembros de la familia de las polimerasas X. Se ha descrito (Lieber et al. [75]) que para NHEJ las polimerasas Pol μ y Pol λ están implicadas en el llenado de "gap", ambas polimerasas trabajan en conjunto. También demostraron que mientras una de las hebras en reparación ha terminado el proceso de ligación la otra hebra puede estar en llenado de "gap", implicando que el procesamiento y ligación de las hebras es un proceso independiente. Por último la DNA-ligasa IV cierra las incisiones finalizando así la reparación de la ruptura (**Figura 15**) [76,77].

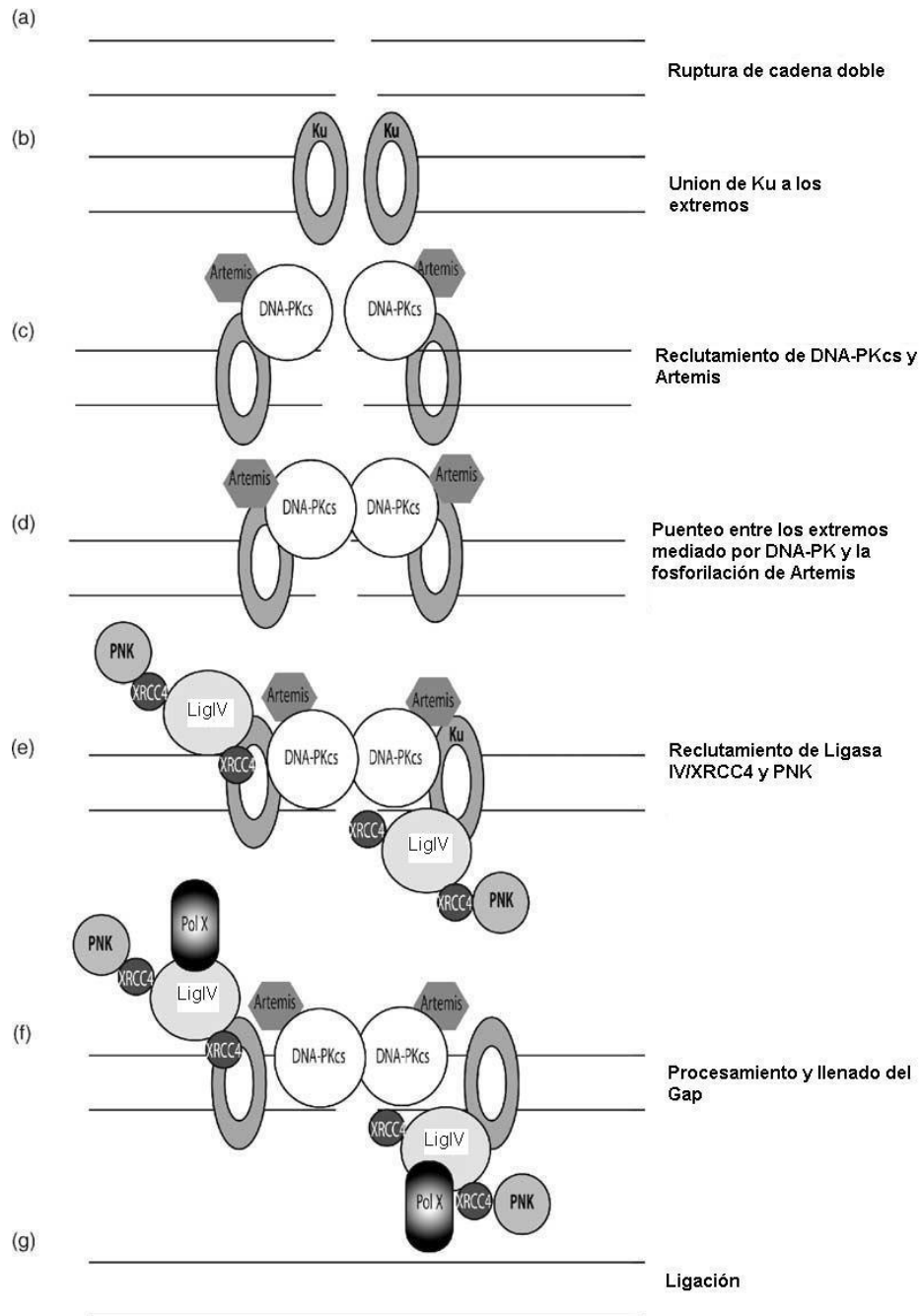


Figura 15 Modelo de NHEJ en células de mamíferos, la inducción de una DSB (a) resulta en el reclutamiento del heterodímero Ku al sitio de la lesión, el cual se une con las terminaciones del ADN (b), esto es seguido por el reclutamiento de DNA-PKcs y Artemis, resultando en la fosforilación/activación de Artemis por DNA-PKcs (c). Se generan interacciones proteína-proteína entre las moléculas de DNA-PKcs y se forma un puente entre las terminaciones de ADN (d). El ensamblaje del complejo DNA-PK resulta en el reclutamiento de la DNA-Ligasa IV y su factor asociado XRCC4. PNK interactúa físicamente con XRCC4 (e), es localizado en el sitio de la ruptura para procesar junto con Artemis las terminaciones del ADN, posteriormente la familia de ADN polimerasas X llena los espacios procesados (f), para finalizar la DNA-ligasa IV cierra la incisión (g). Adaptada de [76].

4.2.2. Reparación por Recombinación Homóloga (HRR)

La HRR es considerada el mecanismo más certero para reparar DSBs, y su ausencia podría degenerar en graves rearrreglos cromosómicos y por ende en inestabilidad genómica. En la HRR, el acoplamiento homólogo de la secuencia de la cromátida hermana sirve como templado para guiar la reparación de la cadena afectada, y debido a que las cromátidas hermanas solo están presentes durante la fase -S y -G2 del ciclo celular, HRR solo puede llevarse a cabo durante estas fases.

Una ejecución exitosa de este mecanismo requiere la acción secuencial de diferentes enzimas en el sitio de la DSB. Durante esta reparación, las terminaciones 5' y 3' de la DSB son procesadas por exonucleasas. Según estudios sugieren que este proceso es mediado por la exonucleasa 1 (Exo1), después de lo cual se recluta a RAD51 mediante BRCA2, la cual es una proteína grande (410 kD) que interactúa con RAD51 por medio de una serie de repeticiones cortas altamente conservadas denominadas motivo BRC. Posteriormente se une la proteína RAD51 al filamento de ssADN (ADN de cadena sencilla). RAD51 es una ATPasa ADN-dependiente que forma filamentos nucleoproteicos con el ADN los cuales favorecen la interacción con la cromátida hermana intacta para ser usada como si fuera un “*primer*”. Debido a la invasión, la cadena complementaria de la cromátida hermana es desplazada formándose una estructura en forma de D (“D-loop”). Existen dos modelos para la HRR: El modelo clásico de recombinación homóloga (HR) o el modelo alternativo de alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA) (**Figuras 14 y 16**). En el caso del modelo clásico de HR, la cadena complementaria desplazada de la cromátida hermana se

alinea con la terminación 3' sobresaliente de la DSB de manera que puede servir como templado por la terminación 5'. Las cromátidas hermanas se conectan por medio de un doble entrecruzamiento tipo *Holliday*, el cual es una unión móvil entre cuatro cadenas de ADN derivadas de dos cromátidas hermanas. Durante la resolución de estas uniones puede ocurrir o no entrecruzamiento (cross-over). Mientras que los cross-over en procesos de recombinación meiotica juegan un papel importante facilitando la segregación cromosómica, en los procesos de recombinación en mitosis pueden conducir a eventos deletéreos de seriedad, incluyendo pérdida de la heterocigocidad. Es por eso que las enzimas encargadas de procesar o resolver los D-loop y entrecruzamientos tipo *Holliday* (como BLM) tienen actividad supresora de cross-over mitóticos y por ende hay una reducción importante del riesgo a inestabilidad genómica [74, 77].

En el modelo de SDSA, los primeros pasos son idénticos al clásico, sin embargo la diferencia radica en la ausencia de la formación de la estructura D-loop, por lo que la cadena invasora es desplazada en el momento en el que la síntesis de ADN ha generado una secuencia homóloga que sirva de templado para la cadena sencilla remanente del DSB [74, 77] (Figura 16).

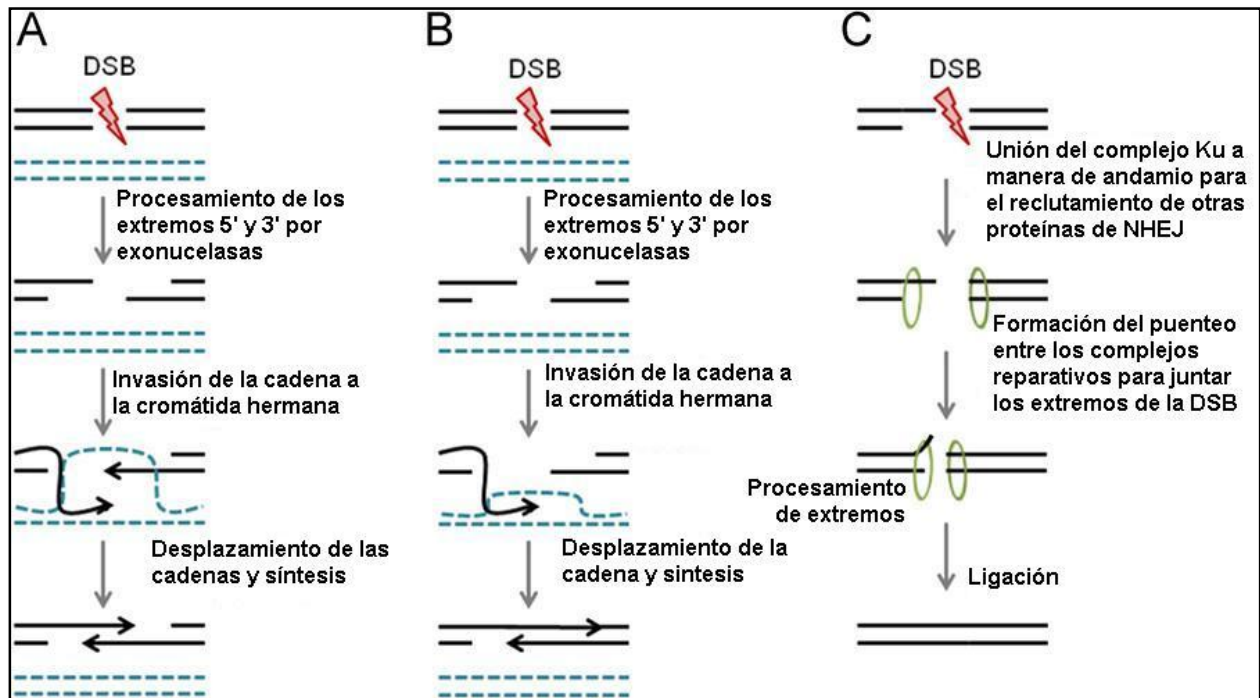


Figura 16. Representación esquematizada de la reparación de DSBs. (A) Modelo clásico de reparación por recombinación homóloga (HRR). (B) Modelo de reparación de SDSA. (C) Modelo de reparación por NHEJ. Adaptada de [77].

5. DDR en Células Troncales (Stem Cells: SC).

Las SC humanas tienen el potencial de diferenciarse en diversos tipos celulares. Las SC adultas se definen como células indiferenciadas que poseen la capacidad de auto-renovación durante largos periodos de tiempo, mientras producen progenies celulares que maduran a células más especializadas órgano específico. Estas células mantienen la homeostasis tisular a largo plazo, el proceso fisiológico responsable de la estabilidad interna de renovación de órganos, incluyendo el número constante apropiado de células así como la regeneración en respuesta al daño (pérdida de la celularidad por diversos factores). En contraste las ESC tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares localizados en los embriones, incluyendo células germinales. Debido a la difícil obtención de éstas y a las implicaciones éticas y consideraciones de seguridad se han generado estrategias de modificación genética para reprogramar el núcleo de células somáticas diferenciadas en células pluripotentes, iPSC [6].

En condiciones normales, las SC adultas transcurren de manera lenta en el ciclo celular, manteniéndose en G0. Cuando realizan un proceso de división, lo pueden realizar simétrica o asimétricamente, esto dependerá si la finalidad de la división es expandir o restaurar las pozas de SC o bien para generar una célula con las propiedades de SC y otra célula que procederá cierto número de divisiones antes de someterse a diferenciación, respectivamente [6].

En SC adultas las alteraciones genéticas han sido implicadas en el impedimento de la capacidad de proliferación, así como el incremento del potencial tumorigénico y envejecimiento [78]. Como SC adultas la capacidad de auto-renovación tendría

complicaciones si estas células no repararan el daño a su secuencia génica, causando acumulación de alteraciones que comprometerían su integridad genética y potencialmente generando patologías. Por lo anterior, las SC emplean a los mecanismos de reparación de manera muy activa para evitarlo, en combinación con la quiescencia y la baja tasa metabólica que reducen el riesgo considerablemente. Adicional a esto y en contraste con células diferenciadas las cuales dependen de la respiración mitocondrial, las SC generan energía principalmente por medio de procesos anaerobios (glucólisis anaerobia) y como es esperado, la obtención de energía por esta vía les confiere una ventaja cito-protectora ya que la producción de ROS y RNS es considerablemente baja [6].

Para la proliferación celular es requerida la progresión del ciclo celular a través de las puntos de monitoreo de las fases G1 y G2, asegurando la duplicación de células viables. En el transcurso de la síntesis del ADN, si la célula recibe daño se activa el punto de monitoreo de G1, generando un retraso en la fase S y permitiendo la reparación adecuada del material genético, proceso que es ejercido en todas las células del organismo. Una vez que el daño ha ocurrido, la célula activara la DDR específica para la lesión generada [6].

Si la reparación del daño resulta ser imposible, diversos procesos celulares se activan lo que deriva en uno de tres caminos posibles: Entrar en senescencia, muerte por apoptosis o (en el caso de las SC) proceder a diferenciación [6].

Diversos estudios han demostrado que hay una relación directa entre la disminución de la capacidad de reparación del ADN y la pérdida de integridad genómica lo cual conduce a la diferenciación o pérdida de la auto-renovación en SC [6].

El destino de las células después de recibir un daño al ADN estará determinado por la severidad del daño, la tasa de reparación en ese momento dado y especialmente por la duración y el grado de activación de la señalización de p53, esto es, entre más rápido se repare el daño más débil será la activación de p53, previniendo entonces la apoptosis. La sensibilidad al daño y la inducción de apoptosis por p53 es muy variable entre SC [6].

Si el daño escapa a la reparación o bien es reparado deficientemente, se manifestará la acumulación de mutaciones en la reserva de SC, generando una inestabilidad importante de la información genética. El genoma mutado podría entonces ser propagado horizontalmente (por auto-renovación) o verticalmente (a la progenie mediante diferenciación). Mutaciones que confieran una ventaja selectiva a SC o a células progenitoras tienen la posibilidad de ser amplificadas posteriormente por el proceso de expansión clonal y después de determinado tiempo esta poza numerosa de SC pueden acumular más mutaciones que eventualmente podrían generar tumorigénesis. Por lo tanto es de suma importancia que estas células posean no solo diversos y redundantes mecanismos de reparación, sino también una alta actividad y eficiencia de los mismos [1, 6, 79].

6. Variaciones en la reparación del ADN tras la diferenciación celular partiendo de células troncales.

Muy poco se sabe sobre los mecanismos moleculares por los cuales el proceso de diferenciación implica una disminución de la capacidad de reparación del ADN; algunos estudios sugieren que es una manera de ahorrar energía y racionarla de una manera más lógica y óptima. Estos han demostrado que la actividad relacionada a NER en cuanto a reparación disminuye durante la diferenciación partiendo de diversos tipos de SC humanas [80,81], así mismo, se sugiere al complejo TFIIH como blanco de ubiquitinación y en consecuencia un mecanismo importante para regular NER durante la diferenciación, en diversas líneas celulares y linajes de diferenciación. Análogamente, variaciones en los mecanismos de reparación BER, HRR, NHEJ y MMR han sido observadas bajo diversos esquemas experimentales [82-89] que sugieren el mismo comportamiento de disminución de la reparación ante el daño al ADN.

Maynard et al. [79] demostraron que las ESC presentan una más eficiente reparación del ADN en comparación con células somáticas en respuesta a diversos agentes dañinos (H₂O₂, UVC, IR y Psoralen). El ensayo cometa en condiciones alcalinas elaborado por este grupo revela que después de una exposición de 20 J/m² de radiación UVC, las dos líneas de ESC probadas presentaron una cinética de reparación mayor en comparación con fibroblastos, indicando una NER más eficiente en las ESC [80]. Ensayos de microarreglos revelaron una mayor expresión de diversos genes relacionados con la reparación del ADN en ESC, entre ellos los relacionados con BER y reparación de DSB comparado con células diferenciadas. Cuando se retaron las ESC

frente a su contraparte diferenciada a H₂O₂ los niveles de la proteína OGG1 y APE1 se vieron incrementados en las ESC. En concordancia, el nivel de las 8-oxoG detectadas fue menor en las ESC que en fibroblastos debido a una reparación de las lesiones oxidativas más eficiente (BER) [6, 82-89].

Además, niveles más altos de las proteínas relacionadas con MMR (MLH1, MSH2 y MSH6), HRR (MRE11, NBS1 y RAD52) y NHEJ (XRCC4 y ligasa IV) fueron detectados en ESC cuando fueron comparados con líneas celulares diferenciadas. Análogamente, se observó una resolución más rápida de *foci* de RAD51 cuando se sometieron las células a 2 Gray (Gy) de IR, lo cual es indicador de activación de HRR. En otro estudio se evaluó la capacidad de NHEJ en ESC y se distinguió que si bien hay una menor actividad de este mecanismo en las células troncales, la eficiencia del mismo fue 1.4 y 2.6 veces mayor en comparación con progenitores neurales y astrocitos respectivamente. Se destaca que en el caso de las ESC el mecanismo preferencial para reparar DSBs es HRR, mientras que en células diferenciadas es NHEJ, pese a la variación de eficiencia. Se concluye que conforme transcurre la diferenciación celular la actividad de NHEJ se incrementa mientras que la fidelidad del proceso disminuye (Figura 17) [6, 82-89].

Otro mecanismo adicional de protección extra de las células troncales es la modificación en los tiempos de las fases del ciclo celular, siendo la duración de G1 más corta y la transición de G1 a S es facilitada por una elevada expresión de CDK4 y de ciclina D2. Esto se interpreta como una cinética única de la fase G1 y una deficiencia parcial del punto de monitoreo de G1/S, que facilita que las SC dañadas progresen a la

fase S, en la cual el daño al ADN es amplificado por el proceso de síntesis conduciendo a la muerte celular [6, 82-89].

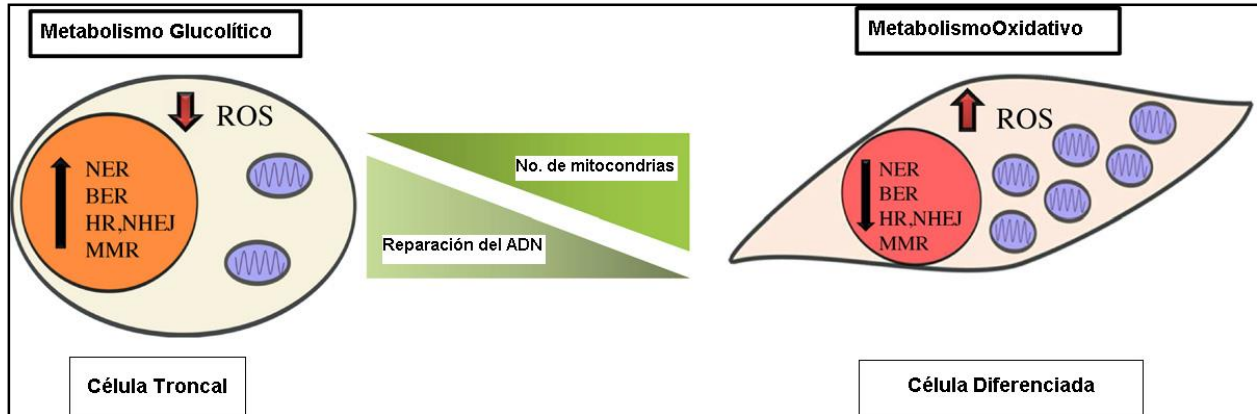


Figura 17. Respiración mitocondrial incrementada y reparación del daño al ADN reducida después de la diferenciación de SC. Las SC presentan altos niveles de capacidad de reparación de daño al ADN y un bajo número de mitocondrias y dependen de procesos glucolíticos anaerobios. La oxidación mitocondrial es suprimida, resultando en producción de ATP mitocondrial y generación de ROS reducida. Durante la diferenciación ocurre el remodelado celular generando el estímulo para el incremento de cantidad de mitocondrias, oxidación y producción de ROS. Además de una disminución en la actividad de los principales mecanismos de reparación como una medida de controlar el gasto energético. Adaptada de [6].

Después de un estrés genotóxico, el supresor de tumores p53 es estabilizado y activado, como en todas las células, previniendo de esta manera la acumulación de mutaciones por medio de la inducción del arresto del ciclo celular, de los mecanismos de reparación, de la apoptosis o la senescencia. Adicional a estas actividades, p53 tiene una función como supresor de genes importantes relacionados con la pluripotencia, como es el caso de *nanog*. Dicha represión es una de las correlaciones más importantes entre daño al ADN y pérdida de la pluripotencia derivando en

diferenciación celular que es una manera de evitar la acumulación de mutaciones futuras en una poza auto-renovable de células [6].

El análisis trascendental de lo anterior probablemente es que la exacerbación de la DDR en SC, en comparación con células diferenciadas, ejerce un efecto de preservación de la integridad genómica potenciado ya que el papel de mayor importancia de este tipo celular es mantener la homeostasis de los tejidos de un organismo dado.

7. Conclusiones

Mantener la estabilidad genómica es una función indispensable para todo ser vivo, y a pesar de que pequeñas modificaciones en la información genética conducen a la diversidad de especies y es un factor de la evolución, este proceso debe efectuarse de manera selectiva y muy fina (eficiente) ya que un cambio abrupto podría derivar en inestabilidad cromosómica e incluso la muerte del organismo.

El daño al ADN puede ser causado por una gran cantidad de agentes tanto endógenos como exógenos o ambientales, la intensidad así como el tipo de daño dependerán directamente del tipo de fuente, la dosis administrada y el tiempo de exposición.

Los daños generados por fuentes endógenas son los más recurrentes y a pesar de que el organismo posee medidas para controlar la actividad deletérea de estos agentes por medio de antioxidantes, moléculas quelantes, sistemas de translocación, señales de movilización y transporte, etc., pueden evadir estas defensas y reaccionar con la molécula informacional generándole cambios composicionales y/o estructurales que comprometen su función principal que es la conservación de la información y su disponibilidad en caso de ser requerida por los sistemas de replicación y transcripción.

Por otra parte, los daños generados al ADN por fuentes exógenas o ambientales dependerán de factores como: exposición ocupacional, estado salud/enfermedad, ingesta de sustancias químicas cuyo efecto impacta en la estabilidad del ADN, exposición recreacional (UVB, UVA y UVC), sometimiento a tratamientos que involucren radiación, etc. Para estos agentes las células no poseen moléculas

específicas para evitar el daño a su material genético, por lo que una vez que se genera la lesión se debe echar mano de procesos para solucionar la modificación.

Los mecanismos de reparación del ADN son la herramienta clave para llevar a cabo esta función de mantener la fidelidad genética. A través de los años se han visto variaciones en la eficiencia de estos mecanismos en los diferentes linajes celulares y estados de diferenciación, lo que nos ha permitido comprender como las células responden al daño y al cambio dependiendo de su situación en el organismo. Así mismo se ha observado una cierta redundancia en estos mecanismos con la cual la célula incrementa las posibilidades de recuperar la fidelidad de su información.

Una vez generado el daño, un paso crítico para la solución del problema es la localización e identificación de la lesión generada que conforma la señal inicial para los procesos de ensamblaje de los complejos de los diferentes mecanismos de reparación del ADN pertinentes al tipo de lesión, lo cual conlleva a la amplificación de dicha señal con la finalidad de restaurar la secuencia genética original en el menor tiempo posible.

Debido a que la reparación del daño al ADN debe ser realizada eficientemente y en el menor tiempo, los mecanismos de reparación requieren intervenir en el proceso del ciclo celular para así evitar la exacerbación de la lesión, por ejemplo a través de procesos de replicación y/o transcripción.

El arresto del ciclo celular es indispensable para evitar la propagación de las mutaciones generadas por el daño al ADN a la progenie y evitar la acumulación de más

alteraciones subsecuentes que podrían degenerar en patologías serias como cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Las SC poseen una exacerbada reparación del ADN en comparación con su descendencia de células diferenciadas, lo cual sugiere una mayor importancia de la conservación del material genético en este linaje celular, esto contrasta con el hecho de la dependencia existente entre la homeostasis tisular del organismo y sus pozas de SC.

Las SC no solo cuentan con una mejor reparación de daño al ADN sino también cuentan con múltiples formas de evitar que se genere como son: metabolismo y obtención de energía mayoritariamente a través de glucólisis anaerobia, baja respiración mitocondrial lo que resulta en poca producción de especies reactivas, quiescencia celular con lo que disminuye la posibilidad de errores asociados a la replicación, duración de fases del ciclo celular modificados con lo cual se favorece la localización del daño y la supresión de genes (mediada por p53) relacionados con la pluripotencialidad para evitar la amplificación de la mutación a la progenie de SC.

Adicionalmente, la apoptosis y la senescencia son procesos alternativos al daño en el ADN sin resolver, mediante los cuales se evita, en todas las células, la transmisión vertical (y horizontal en el caso de las SC) de estas modificaciones.

Se debe enfatizar que los procesos celulares y las medidas para evitar la pérdida de la fidelidad de la información del ADN llegan a fallar, desencadenando muchas veces enfermedades de gran impacto que proceden a degeneración y muerte del individuo en diversas ocasiones. Y que, en algunos casos, estas enfermedades poseen

componentes genéticos que son transmitidos a la descendencia y pueden manifestarse, incluso acumulando más alteraciones genéticas en el proceso que a su vez pueden ser transmitidas de manera análoga.

En la actualidad nuestro entendimiento de la relación entre daño al ADN, la deficiencia en su reparación y su impacto en enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento, cáncer, etc. es limitado. Estudios sugieren una relación entre las células troncales y algunos de estos padecimientos, sin embargo se desconocen los procesos moleculares. De esta premisa deriva la importancia del estudio de estos procesos reparativos del ADN en las células troncales y su comparación con las diferenciadas en ensayos *in vitro* y de ser posible *in vivo*, y posteriormente extrapolar ese conocimiento a la aplicación de nuevas medidas terapéuticas y/o preventivas a enfermedades de importancia, así como las que podrían volverse de impacto debido a su expansión en las poblaciones.

8. Referencias

- [1] Iyama T., Wilson D.M. III. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*. **12**: 620– 636 (2013).
- [2] Hedge M.L., Mantha A.K., Hazra T.K., Bhakat K.K., Mitra S., Szczesny B. Oxidative genome damage and its repair: Implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*. **133**: 157–168 (2012).
- [3] Nickoloff J., Hoekstra M. *DNA Damage and Repair: DNA Repair in Higher Eukaryotes* (Humana Press, New Jersey, 1998).
- [4] Thomson L.H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research*. **751**: 158–246 (2012).
- [5] Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 11–16 (2010).
- [6] Reily C.R., Koch L., Keith O., Marchetto M.C., Martins C.M. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutation research*. **752**: 25–35 (2013).
- [7] Lazzaro F. et al. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair*. **8**: 1055–1067 (2009).
- [8] Auclair Y., Richard S. The role of arginine methylation in the DNA damage response. *DNA Repair*. **12**: 459– 465(2013).
- [9] Jackson S.P.and Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. **461**(7267): 1071–1078 (2009).
- [10] Hühn D., Bolck H.A., Sartori A.A. Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Med Wkly*. 2013; 143: w13837.

- [11] Bounaix Morand du Puch C., Barbier E., Sauvaigo S., Gasparutto D., Breton J. Tools and strategies for DNA damage interactome analysis. *Mutation Research*. **752**, issue 2: 72–83 (2013).
- [12] Berquist B.R., Wilson D.M. III. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Letters*. **327**: 61–72(2012).
- [13] Rahman T., Hosen I., Islam M. M. T., Shekhar H. U. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **3**: 997-1019 (2012).
- [14] Agnez-Lima L.F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research*, **751**: 15–28 (2012).
- [15] Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*. **327**: 26–47(2012).
- [16] Krystona T. B., Georgieva A. B., Pissis P, Georgakilasa A. G.. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, **711**: 193–201 (2011).
- [17] Rooney J.P. et al. Systems based mapping demonstrates that recovery from alkylation damage requires DNA repair, RNA processing, and translation associated networks. *Genomics*, **93**: 42–51 (2009).
- [18] Bordin D.L. et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutation Research*, **753**: 91–99 (2013).
- [19] Hasplova K. DNA alkylation lesions and their repair in human cells: Modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). *Toxicology Letters*, **208**: 76–81 (2012).
- [20] Li P. et al. ABH2 Couples Regulation of Ribosomal DNA Transcription with DNA Alkylation Repair. *Cell Reports*, **4**: 817–829 (2013).

- [21] Dango S. et al. DNA Unwinding by ASCC3 Helicase Is Coupled to ALKBH3-Dependent DNA Alkylation Repair and Cancer Cell Proliferation. *Molecular Cell*, **44**: 373–384 (2011).
- [22] Cao W. Endonuclease V: an unusual enzyme for repair of DNA deamination. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**: 3145–3156 (2013).
- [23] Nabel C.S., Manning S.A., Kohli R.M. The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation and Oxidation as Modulators of Genomic Potential. *ACS Chem Biol.* **7**(1): 20–30 (2012).
- [24] Don-Marc Franchini, Kerstin-Maike Schmitz, Petersen-Mahrt S.K. 5-Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group. *Annu. Rev. Genet.* **46**:419–41 (2012).
- [25] Guz J., Jurgowiak M., Oliński R. Oxidation and deamination of nucleobases as an epigenetic tool. *Postepy Hig Med Dosw* (online). **66**: 275-286 (2012).
- [26] Teperek-Tkacz M., Pasque V., Gentsch G., Ferguson-Smith A.C. Epigenetic reprogramming - is deamination key to active DNA demethylation?. *Reproduction.* **142**(5): doi:10.1530/REP-11-0148 (2011).
- [27] Prestona B.D., Albertson T.M., Herra A.J. DNA replication fidelity and cancer. *Seminars in Cancer Biology.* **20**: 281–293 (2010).
- [28] Batra V.K., Beard W.A., Shock D.D., Pedersen L.C., Wilson S.H. Structures of DNA Polymerase β with Active-Site Mismatches Suggest a Transient Abasic Site Intermediate during Misincorporation. *Molecular Cell.* **30**: 315–324 (2008).
- [29] Liberti S.E., Larrea A.A., Kunkel T.A. Exonuclease 1 preferentially repairs mismatches generated by DNA polymerase. *DNA Repair.* **12**: 92– 96 (2013).
- [30] Agbora A.A., Göksenina A.Y., LeComptea K.G., Hansa S.H., Pursella Z.F. Human Pol ϵ - dependent replication errors and the influence of mismatch repair on their correction. *DNA Repair.* **12**: 954– 963 (2013).

- [31] Martin L.M. et al. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: Making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treatment Reviews*. **36**: 518–527 (2010).
- [32] Thompson L.H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research*. **751**: 158–246 (2012).
- [33] Harper J.V., Anderson J.A., O'Neill P. Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks?. *DNA Repair* **9**: 907–913 (2010).
- [34] Yu Kyung Tak et al. Determination of UV-induced DNA damages to suppress protein expression using reporter gene assay-based single cell cotransfection imaging cytometry. *Toxicology Letters*: **204**: 25–31 (2011).
- [35] Markovitsi D., Gustavsson T., Banyasz A. Absorption of UV radiation by DNA: Spatial and temporal features. *Mutation Research*. **704**: 21–28 (2010).
- [36] Maverakis E. *et al.* Light, including ultraviolet. *J Autoimmun*. **34** (3): J247-57 (2010).
- [37] Batista L. F.Z., Kaina B., Meneghini R., Menck C. F.M. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research*. **681**: 197–208 (2009).
- [38] Moreno de Lima-Bessa K. Et al. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA repair*. **7**: 303–312 (2008).
- [39] Cadet J., Wagner J.R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a012559.
- [40] Raya A., Miluma K., Battua A., Wania G., Wani A.A.. NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair*. **12**: 273– 283 (2013).

- [41] Palomera-Sanchez Z., Zurita M. Open, repair and close again: Chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair*. **10**: 119–125 (2011).
- [42] Novarina D., Amara F., Lazzaro F., Plevani P., Muzi-Falconi M. Mind the gap: Keeping UV lesions in check. *DNA Repair*. **10**: 751– 759 (2011).
- [43] Srivastava N., Gochhait S., de Boer P., Bamezai R.N.K. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research*. **681**: 180–188 (2009).
- [44] Decordier I., Vande Loock K., Kirsch-Volders M. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutation Research*. **705**: 107–129(2010).
- [45] Lenzken S., Loffreda A., Barabino S. M. RNA Splicing: A New Player in the DNA Damage Response. *Int J Cell Biol.*, **Volume 2013**: 12 pages (2013). Mathews L.A., Cabarcas S.M., Hurt E.M. *DNA Repair of Cancer Stem Cells* (Springer, New York, 2013).
- [46] Hoeijmakers J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. **411**; 366-374 (2001).
- [47] Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci*. **71**: 3649–3653 (1974).
- [48] Krokan H.E., Bjøras M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a012583.
- [49] Nemecca A.A., Wallace S.S., Sweasy J.B. Variant base excision repair proteins: Contributors to genomic instability. *Seminars in Cancer Biology*. **20**: 320–328 (2010).
- [50] Parsons J.L., Dianov G.L. Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair*. **12**: 326– 333 (2013).
- [51] Wilson D.M.III, Kimb D., Berquista B.R., Sigurdson A.J. Variation in base excision repair capacity. *Mutation Research*. **711**: 100–112 (2011).

- [52] Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA repair*. **6**: 695–711 (2007).
- [53] Moorea S. P.G., Toomirea K.J., Strauss P.R. DNA modifications repaired by base excision repair are epigenetic. *DNA Repair*. **12**: 1152– 1158 (2013).
- [54] Dalhus B., Laerdahl J.K., Backe P.H., Bjøras M. DNA base repair – recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev*. **33**: 1044–1078 (2009).
- [55] Mantha, A.K., et al., A short review on the implications of base excision repair pathway for neurons: Relevance to neurodegenerative diseases. *Mitochondrion*. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2013.10.007>.
- [56] Michelle L. Heacock, Stefanick D. F., Horton J. K., Wilson S. H. Alkylation DNA damage in combination with PARP inhibition results in formation of S-phase-dependent double-strand breaks. *DNA Repair*, **9**: 929–936 (2010).
- [57] Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA repair*. **6**: 695–711 (2007).
- [58] Staresincic et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J*. **28**(8): 1111–1120 (2009).
- [59] Waters R., Teng Y., Yu Y., Yu S., Reed S.H. Tilting at windmills? The nucleotide excision repair of chromosomal DNA. *DNA Repair*. **8**: 146–152 (2009).
- [60] Sugasawa K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutation Research*. **685**: 29–37 (2010).
- [61] Li et al. Checkpoint protein Rad9 plays an important role in nucleotide excision repair. *DNA Repair*. **12**: 284– 292 (2013).

- [62] Lehmann A.R. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair*. **10**: 730–733 (2011).
- [63] Melis J. P.M., Luijten M., Mullenders L. H.F., van Steeg H. Nucleotide Excision Repair and Cancer. *DNA repair and Human Health*. Chapter 5. 121-127.
- [64] Lujan S.A. Williams J.S., Clausen A.R., Clark A.B., Kunkel T.A. Ribonucleotides Are Signals for Mismatch Repair of Leading-Strand Replication Errors. *Molecular Cell*. **50**: 437–443 (2013).
- [65] Conde-Pérezprina J.C., León-Galván M.A., Konigsberg M. DNA Mismatch Repair System: Repercussions in Cellular Homeostasis and Relationship with Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2012.
- [66] Li L.S. et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*. **158**: 679–692 (2009).
- [67] Hsieh P., Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*. **129**(7-8): 391–407 (2008).
- [68] Polo S.E., Jackson S.P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. **25**: 409-433(2011).
- [69] Scully R., Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation Research*. **750**: 5–14 (2013).
- [70] Al-Hakim et al. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair*. **9**: 1229–1240 (2010).
- [71] Paniera S., Durocher D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair*. **8**: 436–443 (2009).
- [72] Weterings E., van Gent D.C. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of sinapsis. *DNA Repair*. **3**: 1425–1435 (2004).

- [73] Lieber M.R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* **283**, 1–5 (2008).
- [74] Kass E.M., Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters.* **584**: 3703–3708 (2010).
- [75] Lieber M.R. et al. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell.* **16** (5): 701-13 (2004).
- [76] Hefferin M.L., Tomkinson A.E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair.* **4**: 639–648 (2005).
- [77] Caestecker K.W., Van de Walle G.R. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: Past and present. *Experimental Cell Research.* **319**: 575–587 (2013).
- [78] Kenyon J., Gerson S.L., The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res.* **35**: 7557–7565 (2007).
- [79] Maynard S. et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells.* **26**: 2266–2274 (2008).
- [80] Harfouche G., Martin M.T. Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. *Mutation Research.* **704**: 167–174 (2010).
- [81] Frosina G. The bright and the dark sides of DNA repair in stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 845396 (2010).
- [82] Nospikel T., Hanawalt P.C. Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1562–1570 (2000).
- [83] Hildrestrand G.A., Diep D.B., Kunke D., Bolstad N., Bjøras M., Krauss S., et al., The capacity to remove 8-oxoG is enhanced in newborn neural stem/progenitor cells and decreases in juvenile mice and upon cell differentiation. *DNA Repair* **6**: 723–732 (2007).

- [84] Rolseth V. et al. Widespread distribution of DNA glycosylases removing oxidative DNA lesions in human and rodent brains. *DNA Repair* **7**: 1578–1588 (2008).
- [85] Hildrestrand G. et al. Expression patterns of Neil3 during embryonic brain development and neoplasia, *BMC Neurosci.* **10**: 45 (2009).
- [86] Narciso L. et al., Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 17010–17015 (2007).
- [87] Prall W.C. et al. Age-related transcription levels of KU70, MGST1 and BIK in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells, *Mech. Ageing Dev.* **128**: 503–510 (2007).
- [88] Sotiropoulou P.A. et al. Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. *Nat. Cell Biol.* **12**: 572–582 (2010).
- [89] Casorelli I. et al. Methylation damage response in hematopoietic progenitor cells. *DNA Repair.* **6**: 1170– 1178 (2007).