

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA  
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



ESTUDIO COMPARATIVO DE SECUENCIAS Y  
ESTRUCTURAS 3D DE PROTEÍNAS  
REPARADORAS DE ADN ORTÓLOGAS EN  
BALLENAS Y ELEFANTES

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE  
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA

***AUTORA:***

· María Teresa Marcia Castromonte Albinagorta,

***ASESORA:***

· Ph.D. MSc. Claudia Inés Gloria Machicado Rivero

LIMA - PERÚ  
2021

## **CONTENIDO**

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ESTADO DEL ARTE.....	4
CÁNCER EN LA FAUNA SILVESTRE.....	4
PARADOJA DE PETO.....	4
REPARACIÓN DE ADN.....	7
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	8
ESTRATEGIA DE ABORDAJE.....	10
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

## **RESUMEN**

El cáncer es una enfermedad que afecta tanto a humanos como animales domésticos y silvestres. Cada célula y año de vida adicional deberían aumentar la probabilidad de carcinogénesis, sin embargo, la tasa de ocurrencia de cáncer no está en función directa con el tamaño del animal.

La paradoja de Peto señala que no hay asociación entre el tamaño corporal, la longevidad y el riesgo de cáncer entre las especies y predice que los animales con un gran tamaño corporal desarrollarían mecanismos únicos para evadir el cáncer. Se han planteado distintas hipótesis para resolverla y si bien entre ellas se ha mencionado a los genes de reparación del ADN, estos no han sido investigados de manera específica y a un nivel estructural y funcional de sus proteínas.

La reparación del ADN es un mecanismo que evita la acumulación de mutaciones en el genoma y sus vías son altamente conservadas. En la carcinogénesis, la maquinaria de reparación del ADN está dañada, esto genera inestabilidad genómica que promueve la transformación celular. La unión de las proteínas reparadoras de ADN al ácido nucleico se da por medio de dominios que muestran una alta conservación de residuos.

Se ha documentado que las ballenas muestran una estrategia de evasión del cáncer inclinada a la reparación del ADN puesto que presentan amplificaciones en sus genes reparadores, mientras que, los elefantes poseen una estrategia dirigida hacia la apoptosis por medio de *TP53*. Esto sugiere que las ballenas tienen un mecanismo de reparación del ADN más eficiente y exitoso en comparación con los elefantes, lo cual podría tener su explicación en la estructura y función de las proteínas reparadoras. Se plantea un estudio comparativo de las secuencias aminoacídicas y estructuras 3D de las proteínas reparadoras de ADN de humanos ortólogas en ballenas, elefantes y ratones.

*PALABRAS CLAVE: Reparación de ADN, Paradoja de Peto, Carcinogénesis, Cáncer.*

## **ABSTRACT**

Cancer is a disease that affects humans and domestic and wild animals. Each additional cell and year of life should increase the probability of carcinogenesis, nevertheless, the rate of cancer does not have a direct function with the size of the animal.

The Peto paradox points out that there is no association between body size, longevity, and cancer risk between species and predicts that animals with large body sizes would develop unique mechanisms to evade cancer. Different hypotheses have been put forward to solve it, and although DNA repair genes have been mentioned among them, they have not been specifically investigated at a structural and functional level of their proteins.

DNA repair is a mechanism that prevents the accumulation of mutations in the genome and its pathways are highly conserved. In carcinogenesis, the DNA repair machinery is damaged, this generates genomic instability that promotes cell transformation. The binding of DNA repair proteins to nucleic acid is through domains that show high residue conservation.

It has been documented that whales show a cancer avoidance strategy inclined to DNA repair since they present amplifications in their repair genes, whereas elephants have a strategy directed towards apoptosis through TP53. This suggests that whales have a more efficient and successful DNA repair mechanism compared to elephants, which could be explained by the structure and function of repair proteins. A comparative study of the amino acid sequences and 3D structures of orthologous human DNA repair proteins in whales, elephants and mice is proposed.

*KEY WORDS: DNA repair, Peto's paradox, Carcinogenesis, Cancer.*

## **ESTADO DEL ARTE**

### **1. Cáncer en la fauna silvestre**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y los humanos no son las únicas especies afectadas (1). La mayoría de los organismos multicelulares son susceptibles al cáncer. La frecuente aparición de cáncer en metazoos sugiere que la neoplasia tiene un impacto significativo en los niveles de mortalidad y, de manera negativa, en su aptitud biológica (2). Los animales salvajes están profundamente influenciados no solo por las presiones selectivas dentro de su propia especie, sino también por su interacción con los humanos (3).

### **2. Paradoja de Peto**

El cáncer se desarrolla por la acumulación de mutaciones por lo que si la probabilidad de una célula proliferativa normal en sufrir una transformación maligna es igual en todas las células proliferativas, se esperaría que a un mayor número de células proliferativas, la probabilidad de desarrollar carcinogénesis aumentase. Igualmente, si un organismo multicelular tiene una vida útil prolongada, puesto que sus células tienen más tiempo para acumular mutaciones. El desafío de suprimir esta transformación maligna aumenta dramáticamente con cuerpos más grandes y vidas más largas por lo que organismos más grandes y longevos desarrollarían cáncer de manera más frecuente, sin embargo, se ha observado que no hay una correlación entre el tamaño corporal, la longevidad y el cáncer entre especies y esta carencia de relación es reconocida como la paradoja de Peto (4).

Esta paradoja hace referencia al epidemiólogo Richard Peto, quien notó la relación entre el tiempo y cáncer cuando estudiaba cómo se forman los tumores en ratones (5,6). Peto observó que la probabilidad de progresión del cáncer se relacionó con el tiempo de la

exposición al carcinógeno benzopireno. Más tarde agregó a la ecuación la masa corporal (5).

La cuestión de la paradoja de Peto es cómo la selección natural ha cambiado la biología de los organismos grandes y longevos para que desarrollaran mecanismos únicos y así, reducir el riesgo de cáncer (4,7). Distintas hipótesis han sido propuestas para responder dicha interrogante. Puesto que los organismos de cuerpos grandes evolucionaron independientemente a lo largo de múltiples linajes, no se espera que todos los animales grandes y de larga vida hayan desarrollado el mismo mecanismo para suprimir el cáncer, a menos que la supresión provenga de una característica innata común a todos los organismos más grandes (4,5,8).

El envejecimiento es un proceso complejo que conlleva múltiples fenotipos: cambios fisiológicos y moleculares que contribuyen a la degeneración y el deterioro funcional con la edad de prácticamente todos los órganos y sistemas del cuerpo, una mayor susceptibilidad a diversas enfermedades y un aumento exponencial de la mortalidad con la edad (6,8,9).

Después de la madurez sexual, la incidencia de cáncer aumenta exponencialmente con la edad. Por lo tanto, las alteraciones en el envejecimiento pueden afectar el desarrollo de cáncer. Pueden ser alteraciones genéticas que prolongan la vida, mutaciones que interrumpen la reparación del ADN y / o las respuestas al daño del ADN y manipulaciones dietéticas (9).

Los investigadores han utilizado tradicionalmente el ratón y la rata como organismos modelo básicos, especies de corta vida que obviamente carecen de mecanismos de mantenimiento efectivos durante períodos prolongados de tiempo (10,11). En los últimos años, se han realizado varios descubrimientos en especies de mamíferos que no son comúnmente modelos de laboratorio, proporcionando nuevas ideas sobre los mecanismos naturales de resistencia al cáncer. Estos incluyen mecanismos de resistencia al cáncer en la rata topo desnuda, la rata topo ciega y el elefante. Muchas otras especies de mamíferos de larga vida muestran resistencia al cáncer, incluidas ballenas, ardillas grises, murciélagos, vacas y caballos (11).

Se han planteado distintos mecanismos de supresión tumoral que pueden variar entre especies grandes y de larga vida (4,5). Las células de organismos con cuerpos grandes podrían ser más sensibles al daño del ADN o la activación de un oncogén y, por lo tanto, serían más eficientes para la apoptosis (4,12). Otro mecanismo relacionado sería mediante la disminución de la longitud de los telómeros. Al tenerse telómeros más cortos se limitaría el número de veces que las células pueden dividirse y se reducen las oportunidades de acumular mutaciones cancerígenas (4,9).

El aumento de número de copias de genes supresores de tumores también podría suprimir el cáncer en animales grandes ya que para producir un fenotipo maligno tendrían que realizarse más mutaciones para así inhabilitar a todas las copias. Por lo tanto, el aumento de número de copias de los TSG también podría permitir que los organismos grandes y longevos expresaran en mayor cantidad a los TSG en comparación con animales más pequeños y de vida más corta (4, 13, 14).

Los supresores de tumores han sido los más estudiados para explicar la paradoja de Peto a pesar de que no se ha documentado una relación directa entre los genes supresores de tumores y el aumento de la masa corporal y longevidad. La amplificación de estos genes se ha documentado en elefantes con *TP53*, caballos con *MAL* y murciélagos con *FBXO31* (15). En el caso de los elefantes, estos tienen una tasa de cáncer inferior ya que la amplificación de *TP53* les brinda una respuesta apoptótica más eficiente después del daño en el ADN (12).

### **3. Reparación de ADN**

Los genes de reparación de daños en el ADN (DDR) son los responsables del mantenimiento de la estabilidad genómica humana. Su desregulación conduce a niveles altos de inestabilidad genómica, mayor tasa de mutación y mayor heterogeneidad intratumoral (16,17). La remodelación de la cromatina, reparación de ruptura de doble hélice (DSB) y homeostasis redox son los mecanismos principales por los cuales el estado metabólico celular influye en las vías de DDR (16).

Los genes DDR pueden agruparse en vías funcionales definidas por criterios genéticos, bioquímicos y mecanicistas. La reparación por escisión de base (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y las vías de reversión / reparación de daño directo (DR) reparan el daño de la base del ADN, mientras que la reparación mismatch (MMR) corrige los pares de bases y bucles pequeños que a menudo se encuentran en el ADN de secuencia repetitiva. La recombinación homóloga dependiente (HR), la unión del extremo no homólogo (NHEJ), la vía de la anemia de Fanconi (FA) y la síntesis de ADN de translesión (TLS) actúan solos o juntos para reparar roturas de cadenas de ADN y eventos

complejos como enlaces cruzados entre cadenas (17,18). Estos mecanismos de reparación de ADN mencionados se encuentran altamente conservados en diferentes organismos (18).

Las proteínas reparadoras de ADN pueden unirse directamente al ADN o depender de las interacciones proteína-proteína. Los actores en los sistemas de reparación son: endo- y exonucleasas y glicosidasas, helicasas de ADN, ATPasas, ADN ligasas, ADN polimerasas y nucleotidiltransferasas, dominios de unión a ADN y adaptadores. Los dominios implicados en la unión del ADN se encuentran conservados, principalmente en función de su estructura predicha, tamaño pequeño y ausencia de residuos polares involucrados en una actividad catalítica (19). Se ha visto que estudios proteómicos han revelado nuevos conocimientos en estudios comparativos de envejecimiento por lo que el alineamiento múltiple y modelamiento estructural 3D de estas proteínas nos permitirían observar las diferencias específicas en sus secuencias entre distintas especies (20).

## **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La comprensión de la paradoja de Peto implica la comprensión de cómo la naturaleza ha resuelto el problema del cáncer en el transcurso de evolución y se espera que, en un futuro, permita la prevención del cáncer y, en un aspecto ambiental la apreciación de la biodiversidad y la necesidad de conservar especies. Un estudio comparativo entre humanos y las especies que presentan la paradoja de Peto permitiría el desarrollo de nuevos tratamientos tanto como para prevenir como para tratar al cáncer. Diversas hipótesis se han formulado para poder explicar la paradoja de Peto. Sin embargo, estas han variado dependiendo del organismo puesto que el aumento en el tamaño corporal ha

evolucionado de manera independiente a lo largo del tiempo (5). Entre las hipótesis planteadas se encuentran procesos relacionados a la reparación de ADN, sin embargo no específicamente a este mecanismo. La interrupción de la reparación del ADN y / o las respuestas al daño del ADN provocan signos de envejecimiento prematuro y la predisposición al cáncer. Además, las vías de reparación del ADN se vuelven menos eficientes con la edad (9).

Con excepción de la vía FA, todos los procesos moleculares mencionados se han visto identificadas en la mayoría de organismos (17). Esto demuestra que los mecanismos centrales de reparación del ADN se encuentran altamente conservados y se recalca la importancia de la integridad genómica en la célula (14,18). Algunas de las proteínas codificadas de los genes DDR reconocen y unen al ADN por lo que los dominios de unión al ADN juegan un papel importante en su regulación. Estos dominios de unión al ADN muestran una conservación de residuos de contacto de ADN (21).

Genes reparadores de ADN en las ballenas se han visto amplificados y seleccionados positivamente. La ballena boreal (*Balaena mysticetus*) es una ballena grande que puede vivir más de 200 años y que presenta una baja incidencia de cáncer. El gen *ERCCI*, que es parte de la vía de reparación por escisión de nucleótidos, presenta selección positiva en el genoma (22). Este mismo gen presenta selección positiva en la ballena jorobada (23). Además, el genoma de la ballena boreal contiene duplicaciones del gen de reparación de ADN *PCNA*. Por otro lado, genes como *POLE* muestran cambios de aminoácidos idénticos entre taxones dispares unidos por los rasgos de gran tamaño corporal y/o longevidad extrema (22,23).

La inactivación del gen *TP53* conduce a la supresión de la apoptosis, el aumento de la proliferación y la inestabilidad genómica. Se ha reportado que los elefantes tienen una tasa de cáncer inferior y que esta se debería a la amplificación de *TP53* y algunas de sus variantes. El aumento en el número de copias de este gen y sus variantes permitirían una respuesta apoptótica más eficiente después del daño en el ADN ya que las variantes estabilizan a p53 evitando que se ubiquitine y se degrade y la amplificación, menos probabilidades de inactivar al gen (24).

Las estrategias para evadir al cáncer parecen diferir entre las ballenas y los elefantes. Las ballenas evaden el cáncer mediante el mejoramiento de la eficiencia de reparación de ADN, mientras que, los elefantes, mejoran la sensibilidad para responder al daño del ADN e inducir apoptosis. Los estudios mencionados previamente nos llevan a suponer que las ballenas, al tener una estrategia de evasión al cáncer inclinada a la reparación del ADN, podrían tener proteínas reparadoras de ADN más eficientes. Ello puede ocurrir tanto por el aumento de número de copias de genes DDRs como por variaciones en la secuencia de aminoácidos, estructura y función proteica. Estas características estructurales no se apreciarían en los elefantes, que presentan una estrategia dirigida hacia la apoptosis, mas no a una reparación más efectiva. Se plantea un estudio que compare las secuencias de aminoácidos y estructuras 3D de los genes reparadores de ADN de las ballenas, elefantes, ratones y humanos.

## **ESTRATEGIA DE ABORDAJE**

### Determinación de genes DDRs

Se elaborará una lista de los genes DDRs de humano consultando KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), una base de datos útil para comprender las

funciones y utilidades de alto nivel de sistemas biológicos, como la célula, el organismo y el ecosistema (25). Se tomarán en cuenta las siguientes 6 vías en humanos involucradas con reparación del ADN:

- Reparación por escisión de base (BER)
- Reparación por escisión de nucleótidos (NER)
- Reparación mismatch (MMR)
- Recombinación homóloga dependiente (HR)
- Unión del extremo no homólogo (NHEJ)
- Vía de la anemia de Fanconi (FA)

El nombre de los genes e información de las proteínas DDRs y rutas se obtendrán tanto de KEGG como del recurso REPAIRtoire (<http://repairtoire.genesilico.pl/proteins/>).

#### Identificación de ortólogos y alineamientos múltiples.

Se buscarán ortólogos en ballena (*Balaena mysticetus*), elefante (*Loxodonta africana*) y ratón (*Mus musculus*) empleando BLAST, ingresando el nombre de cada gen DDR humano. Se reconocerán los ortólogos en ballenas y elefantes y se descargarán sus secuencias de aminoácidos desde BLAST y Uniprot. Se seleccionarán sólo las proteínas que hayan tenido e-valor <0.0001.

Se realizarán alineamientos múltiples con Clustal W para identificar la conservación de dominios y reconocer los aminoácidos variantes en estos. La información de los dominios se obtendrá de PFAM o Interpro a través de la base de datos REPAIRtoire (<http://repairtoire.genesilico.pl/proteins/>). Los residuos críticos para la función proteica incluida la unión al ADN se obtendrán de BRENDA y Uniprot. En el alineamiento se determinará la conservación o variabilidad de dichas residuos.

### Predicción de la estabilidad de las proteínas DDRs

Con el fin de evidenciar diferencias en la estabilidad de las proteínas DDRs entre las especies de estudio, se estimará la energética de estabilización de los ortólogos. Para ello se empleará i-Mutant (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/I-Mutant.htm>).

### Estudio del impacto de variantes genéticas en la función proteica

Dado que pensamos que los mecanismos de reparación de ADN en elefante son menos eficientes, se estimará el impacto de las variantes genéticas de cada ortólogo en la función de las proteínas DDRs, en las especies de estudio. Se utilizará la base de datos SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) para dichos fines.

### Modelamiento molecular

En aquellas proteínas DDRs donde se aprecie una afectación en la estabilidad proteica y/o su función esté comprometida (variantes dañinas o no toleradas), se conducirá un estudio estructural. Se modelarán las estructuras 3D mediante SwissModel y Phyre2 (<https://swissmodel.expasy.org/>) y se visualizarán con Chimera y SwissPDB Deep viewer. Se superpondrán los ortólogos mediante la herramienta “IterativeMagic Fit” de Deep View. Se calculará el rmsd (desviación de la media cuadrática) para estimar las diferencias estructurales en los dominios catalíticos. Se identificarán el arreglo espacial que adquieren los dominios catalíticos de los ortólogos y se describirá la conformación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albuquerque TAF, Drummond do Val L, Doherty A, de Magalhães JP. From humans to hydra: patterns of cancer across the tree of life. *Biol Rev.* 2018;93(3):1715–34.
2. Madsen T, Arnal A, Vittecoq M, Bernex F, Abadie J, Labrut S, et al. Cancer Prevalence and Etiology in Wild and Captive Animals. In: *Ecology and Evolution of Cancer*. Elsevier Inc.; 2017. p. 11–46.
3. Pesavento PA, Agnew D, Keel MK, Woolard KD. Cancer in wildlife: patterns of emergence. Vol. 18, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2018. p. 646–61.
4. Caulin AF, Maley CC. Peto's paradox: Evolution's Prescription for Cancer Prevention. *Trends Ecol Evol.* 2011;26(4):175–82.
5. Tollis M, Boddy AM, Maley CC. Peto's Paradox: How has evolution solved the problem of cancer prevention? *BMC Biol.* 2017;15(1):1–5.
6. Tidwell TR, Søreide K, Hagland HR. Aging, metabolism, and cancer development: From Peto's paradox to the Warburg effect. Vol. 8, *Aging and Disease*. International Society on Aging and Disease; 2017. p. 662–76.
7. Ferris E, Abegglen LM, Schiffman JD, Gregg C. Accelerated Evolution in Distinctive Species Reveals Candidate Elements for Clinically Relevant Traits, Including Mutation and Cancer Resistance. *Cell Rep.* 2018 Mar 6;22(10):2742–55.
8. Nunney L. Size matters: Height, cell number and a person's risk of cancer. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2018 Oct 24;285(1889).
9. De Magalhães JP. How ageing processes influence cancer. Vol. 13, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2013. p. 357–65.

10. Dammann P. Slow aging in mammals—Lessons from African mole-rats and bats. Vol. 70, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 154–63.
11. Seluanov A, Gladyshev VN, Vijg J, Gorbunova V. Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:433–41.
12. Abegglen LM, Caulin AF, Chan A, Lee K, Robinson R, Campbell MS, et al. Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA*. 2015;17(314):1850–60.
13. Nunney L. Resolving Peto’s paradox: Modeling the potential effects of size-related metabolic changes, and of the evolution of immune policing and cancer suppression. *Evol Appl*. 2020;(April):1–12.
14. MacRae SL, Croken MMK, Calder RB, Aliper A, Milholland B, White RR, et al. DNA repair in species with extreme lifespan differences. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(12):1171–84.
15. Caulin AF, Graham TA, Wang LS, Maley CC. Solutions to peto’s paradox revealed by mathematical modelling and cross-species cancer gene analysis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015;370(1673).
16. Turgeon MO, Perry NJS, Poulogiannis G. DNA damage, repair, and cancer metabolism. *Front Oncol*. 2018;8(FEB).
17. Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, Chambwe N, Gao GF, Cherniack AD, et al. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep*. 2018 Apr 3;23(1):239–254.e6.
18. Brunette GJ, Jamalruddin MA, Baldock RA, Clark NL, Bernstein KA. Evolution-based screening enables genome-wide prioritization and discovery of DNA repair genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(39):19593–9.

19. Aravind L, Walker DR, Koonin E V. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(5):1223–42.
20. Tomblin G, Gigas J, Macoretta N, et al. Proteomics of Long-Lived Mammals. *Proteomics.* 2020;20(5-6): e1800416.
21. Chang YL, Tsai HK, Kao CY, Chen YC, Hu YJ, Yang JM. Evolutionary conservation of DNA-contact residues in DNA-binding domains. *BMC Bioinformatics.* 2008;9(SUPPL. 6):1–9.
22. Tollis M, Robbins J, Webb AE, Kuderna LFK, Caulin AF, Garcia JD, et al. Return to the Sea, Get Huge, Beat Cancer: An Analysis of Cetacean Genomes Including an Assembly for the Humpback Whale (*Megaptera novaeangliae*). *Mol Biol Evol.* 2019;36(8):1746–63.
23. Keane M, Semeiks J, Webb AE, Li YI, Quesada V, Craig T, et al. Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome. *Cell Rep.* 2015;10(1):112–22.
24. Li Y, Zhang MC, Xu XK, Zhao Y, Mahanand C, Zhu T, et al. Functional diversity of p53 in human and wild animals. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(MAR).
25. Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, et al. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D354–D357.