



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA DNASA I Y  
PROTEASAS COMO ESTRATEGIA ANTITUMORAL;  
ENSAYO PRELIMINAR**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A**

**BLANCA TERESA GUTIÉRREZ DÍAZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y  
TOXICOLOGÍA AMBIENTAL**

**UNIDAD PERIFÉRICA DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA EN CANCER, INCAN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**Facultad de Medicina**





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA  
COORDINACIÓN

**DR. GERMÁN ENRIQUE FAJARDO DOLCI**  
DIRECTOR  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
PRESENTE

Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: **"Estudio Preclínico de la DNasa I y Proteasas como estrategia antitumoral; ensayo preliminar"**, que presenta la alumna **BLANCA TERESA GUTIÉRREZ DÍAZ** con número de cuenta **30828709-3**, cumple con los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dr. Fernando López Casillas

Dr. Alfonso Dueñas González

Dra. Martha Robles Flores

Dr. Diego González Halphen

Dra. Ana María Salazar Martínez

## AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado de manera desinteresada la mejor educación y oportunidades de desarrollo académico.

Al Dr. Alfonso Dueñas, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Catalina, el Dr. Enrique y la Dra. Lucy, por el tiempo, cariño y paciencia con el que me enseñaron y por haber ido más allá del papel de asesores.

A los miembros de mi jurado el Dr. Fernando López Casillas, la Dra. Martha Robles Flores, la Dra. Ana María Salazar Martínez y el Dr. Diego González Halphen, por las correcciones, comentarios y sugerencias a este trabajo.

A mis padres Blanca y Guillermo por haberme inculcado el gusto por el aprendizaje, por su apoyo en mis estudios y por haberme enseñado que trabajando con disciplina y perseverancia, pero sobretodo con pasión y amor, nada es imposible.

A mis hermanitas Elizabeth y Alejandra, por todo su cariño y apoyo incondicional que desde siempre me han brindado. Las amo.

A Lalo por ser mi gran compañero, confidente y mejor amigo.

A mis amigos de la licenciatura Mariana, Adriana, Pedro y Rodrigo, por haber sido un soporte en los tiempos difíciles y multiplicadores de alegría en los momentos felices.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Caty, Desi, Mau, Vale, Julia, Clarita, Betty, Mandy, Dominique y a los "físicos" Héctor y Alfonso, por su retroalimentación en el trabajo, cálida compañía en las tardes de experimentos, fiestas y salidas, pero sobre todo por haber hecho de mi estancia en el laboratorio una experiencia única.

A mis amigos de toda la vida, Pablo y Alfredo, por enseñarme que la humildad de tus orígenes no es una limitante para el éxito y por demostrarme que la verdadera amistad está más allá del tiempo y el espacio.

Y a todas las personas que por espacio no pude mencionar pero que han sido igual de importantes durante mi desarrollo y me han ayudado a crecer como la mujer profesional que soy. Muchas gracias.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
TABLA DE ABREVIATURAS .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Generalidades del Cáncer.....	3
Terapias Estándar .....	5
Cirugía .....	5
Radioterapia.....	5
Quimioterapia citotóxica.....	6
Terapia Dirigida.....	7
Microambiente Tumoral (TME).....	9
Ácido Desoxirribonucleico Extracelular (exDNA).....	11
ANTECEDENTES .....	15
DNasa I.....	16
Efecto de las Proteasas.....	17
JUSTIFICACIÓN .....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
Material biológico.....	19
Colecta y preparación de sueros humanos .....	20
Colecta y preparación de los sueros de rata .....	20
Tratamiento enzimático del suero <i>in vitro</i> .....	20
Cuantificación del exDNA en suero.....	20
Cuantificación de proteínas.....	21
Peso molecular de proteínas séricas.....	21
Cultivo líneas celulares.....	21
Tratamiento enzimático <i>in vivo</i> con DNasa I y proteasas.....	21
Efecto antitumoral <i>in vivo</i> del tratamiento enzimático.....	22
Pruebas estadísticas .....	23

RESULTADOS .....	24
Degradación de exDNA <i>in vitro</i> .....	24
Degradación de proteínas séricas <i>in vitro</i> .....	25
Degradación de exDNA y proteínas séricas <i>in vivo</i> .....	28
Efecto antitumoral del tratamiento en un modelo <i>in vivo</i> .....	31
DISCUSIÓN .....	34
CONCLUSIONES .....	43
PERSPECTIVAS .....	43
ARTÍCULO .....	44
BIBLIOGRAFÍA .....	53
ANEXO .....	63

## RESUMEN

**Introducción.** El DNA libre de célula (exDNA) circula por el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer e induce transformación celular y progresión tumoral *in vivo*. Basado en esto se ha hipotetizado que la eliminación del exDNA con DNasa I y una mezcla de proteasas podría tener efectos antitumorales.

**Objetivo General.** El objetivo del estudio fue demostrar que la DNasa I y una mezcla de proteasas (papaína, tripsina y quimiotripsina) pueden degradar al exDNA y proteínas del suero de individuos sanos, pacientes con cáncer y suero de ratas Wistar tratadas con las enzimas por vía intravenosa. Además se evaluó el efecto antitumoral de la administración sistémica de la mezcla de proteasas (intraperitoneal) y DNasa I (intramuscular) en ratones inmunodeficientes con tumores provenientes de la línea celular de cáncer de colon humano SW480.

**Resultados.** El DNA de suero de pacientes con cáncer e individuos sanos es degradado *in vitro* por la combinación de DNasa I y proteasas, pero no por ninguna de las enzimas por separado. La administración intravenosa de las enzimas llevó a una disminución importante en proteínas de suero y exDNA en las ratas. En los ratones inmunodeficientes tratados solamente con DNasa I o la mezcla proteasas, no se observó un efecto antitumoral y el desarrollo tumoral fue muy semejante al grupo control; mientras que los animales que recibieron ambas enzimas mostraron una inhibición tumoral notable, ya que un 40% de los animales presentaron una respuesta patológica completa.

**Conclusión.** Los resultados de estos estudios demuestran que la administración sistémica de DNasa I y una mezcla de proteasas que contiene, tripsina y quimiotripsina en ratas, disminuye los niveles de exDNA y proteínas del suero tanto *in vitro* como *in vivo*; además, este tratamiento tiene un efecto antitumoral en ratones inmunodeficientes inoculados con una línea de carcinoma de colon humano. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el exDNA tiene un rol en la progresión tumoral que puede abatirse si se éste se elimina de la circulación.

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>D</b>	DNasa I
<b>DMH</b>	1,2 dimetilhidracina
<b>DMT</b>	Dosis máxima tolerada
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>exDNA</b>	DNA circulante, extracelular o libre de célula
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>NET</b>	Trampas extracelulares de neutrófilos
<b>P</b>	Papaína
<b>PCR</b>	Reacción polimerasa en cadena
<b>Q</b>	Quimiotripsina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>T</b>	Tripsina
<b>TAN</b>	Neutrófilos asociados al tumor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TME</b>	Microambiente tumoral
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b><math>\alpha</math>-1-AT</b>	Alfa 1 anti-tripsina
<b><math>\alpha</math>-2-M</b>	Alfa 2 microglobulina



# INTRODUCCIÓN

## Generalidades del Cáncer

Tumor o neoplasia es el nombre que se le da al grupo de alteraciones en las que hay un crecimiento anormal de las células, produciendo un aumento en el volumen de los tejidos. Las neoplasias, según su desarrollo, son divididas en dos grupos: benignas y malignas. Las neoplasias malignas agrupan a un conjunto de más de 100 enfermedades, las cuales se caracterizan por el crecimiento rápido y diseminación descontrolada de un grupo de células. Toda neoplasia maligna, es conocida como cáncer (Fernández *et al.* 2011). El tumor maligno puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo, invadiendo y destruyendo al tejido circundante. Si éste no es diagnosticado a tiempo, las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, a través del torrente sanguíneo y/o el sistema linfático, colonizando otros nichos, en un proceso denominado metástasis, lo que con frecuencia conlleva a la muerte del paciente (National Cancer Institute 2009; American Cancer Society 2015e; World Health Organization 2015).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes, se diagnosticaron 14.1 millones de nuevos casos y en la actualidad 32.6 millones de personas lo padecen. En 2012 los tipos de cáncer diagnosticados con más frecuencia fueron mama, próstata, pulmón, colon y cervico-uterino, mientras que los que causaron un mayor número de decesos correspondieron a cáncer de pulmón, mama, hígado, próstata y colon (World Health Organization 2012). Se prevé que el número de nuevos casos aumentará aproximadamente 70% en los próximos 20 años, pasando de los 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (Figura 1) (World Health Organization 2014b).

En México, el cáncer es un padecimiento de alta incidencia; los tumores malignos son la tercera causa de defunciones a nivel nacional, después de la diabetes y de las enfermedades hipertensivas, afectando al 16% de la población con una tasa de mortalidad de 90 muertes por cada 100 mil habitantes (World Health Organization 2014a). De acuerdo con las estadísticas de mortalidad del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el número absoluto de defunciones por cáncer se incrementó de 64,333 en 2004 a 78,582 muertes en 2013, lo que representa un aumento de casi el 20%, (Figura 2) (Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2013). De acuerdo con la información de la Secretaría de Salud, se considera a la morbilidad y a la mortalidad por cáncer como un problema de salud pública desde 1990. En la actualidad 32.6 millones de personas lo padecen y cada año se diagnostican nuevos casos, razón por la cual en 2012 se destinó una cantidad importante de recursos a su tratamiento e investigación (Fernández *et al.* 2011).

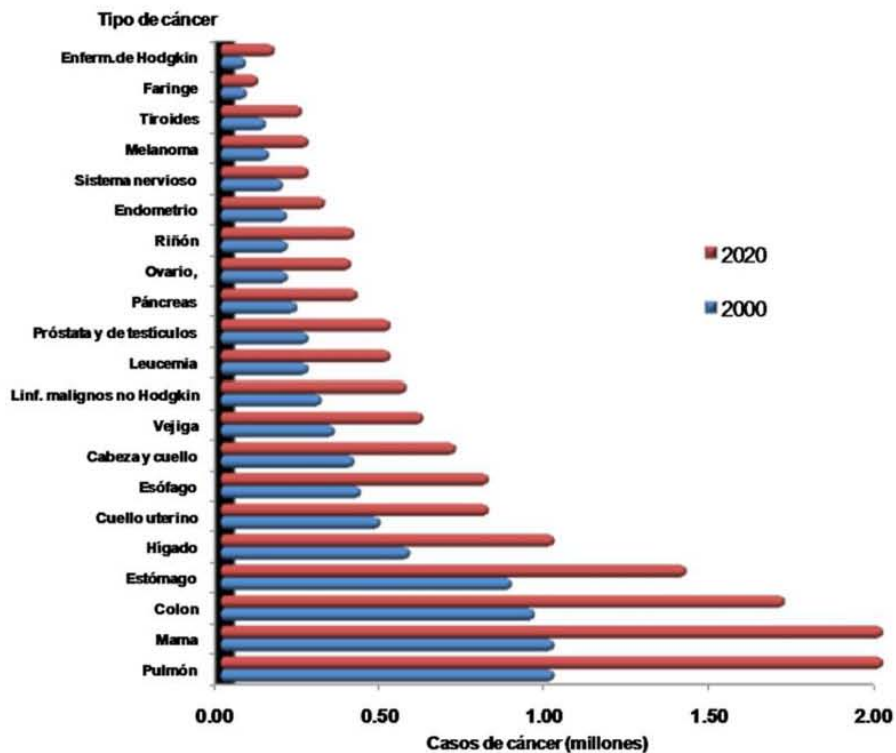


Figura 1. Casos de cáncer; Panorama internacional 2000-2020 (Fernández CS, León AG, Herrera TM, Salazar SE, Sánchez DM, Alcalá OR et al. 2011).

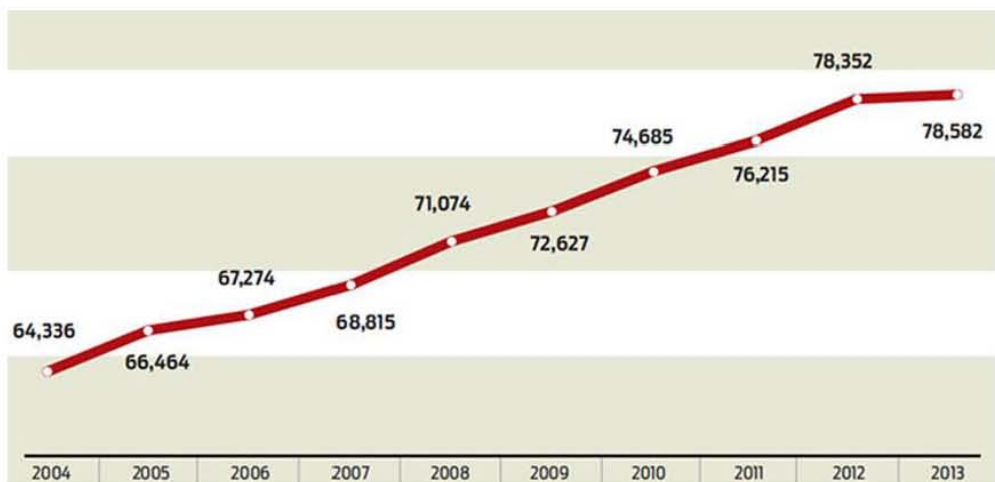


Figura 2. Defunciones anuales por tumores malignos en los años 2004-2013 (Fuentes and México Social 2015).

## Terapias Estándar

El cáncer por ser una enfermedad compleja y heterogénea, demanda medidas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas que demuestren calidad, seguridad y eficacia. De ahí es que la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia han emergido como los tratamientos estándar del cáncer.

### Cirugía

La cirugía se utiliza para tumores sólidos que están contenidos en un sitio determinado (tumores localizados). Los fines de una cirugía pueden ser para extirpar la masa tumoral, reducir el tamaño (cuando existe riesgo de daño a un órgano si se extirpa por completo) o bien para aliviar el dolor o presión que causa el crecimiento del mismo.

Algunos tipos de cirugía comprenden:

- ◆ Cirugía láser: El láser es utilizado en lugar de bisturí para cortar tejido.
- ◆ Criocirugía: Usa spray de nitrógeno líquido a través de una sonda, enfriando lo suficiente para congelar y matar tejidos anormales.
- ◆ Electrocirugía: Se utiliza una corriente de alta frecuencia para destruir tejido.
- ◆ Ablación con radiofrecuencia (RFA): Ondas de radio de alta energía son enviadas a través de una aguja para calentarla y destruir al tejido.
- ◆ Cirugía micrográfica: también conocida como cirugía de Mohs se usa para remover ciertos tipos de cáncer de piel mediante la remoción de una capa muy delgada de ésta. Esta cirugía se utiliza cuando se desconoce la extensión del cáncer o cuando se busca dañar la menor cantidad de tejido sano posible, como en el cáncer de ojo.
- ◆ Cirugía laparoscópica: Se realiza utilizando un laparoscopio. Todo el procedimiento se realiza a través de pequeños orificios y usando instrumental especializado.

Cabe mencionar que este tipo de tratamiento es exitoso para tumores bien delimitados, por lo que su uso en un cáncer que se ha extendido, es limitado y su uso en leucemias queda descartado (American Cancer Society 2015a; National Cancer Institute 2015c).

### Radioterapia

Así como la cirugía, la radioterapia se usa principalmente para tumores localizados. La radiación produce rompimientos en el DNA de las células cancerosas, imposibilitando su crecimiento y división celular. Más de la mitad de las personas con cáncer son tratadas con radiación en algún punto. Puede usarse sola o junto con cirugía y quimioterapia. La radioterapia se da de tres formas, en todas se dirigen rayos de alta energía al tumor para que éste sea destruido:

- ◆ Radiación externa: A través de una máquina que dirige la radiación hacia el tumor y tejido circundante.
- ◆ Radiación interna: También llamada braquiterapia, usa un implante como fuente de radiación, el cual es colocado dentro del cuerpo cerca del tejido canceroso.
- ◆ Radiación sistémica: Se emplean fármacos radioactivos, denominados radiofármacos, los cuales se encuentran unidos a anticuerpos monoclonales que los dirigen a las células cancerosas. Estos fármacos pueden ser administrados vía intravenosa u oral.

A pesar de que este tratamiento tendrá un efecto deletéreo sobre la mayoría de las células cancerosas, los efectos secundarios pueden llegar a ser abrumadores e inclusive peligrosos. Algunos de los efectos secundarios a corto plazo son fatiga, problemas de piel (rubor, irritación, hinchazón, aparición de ampollas), pérdida de cabello, linfedema, cambio en los valores del conteo sanguíneo y problemas alimenticios. Estos efectos suelen presentarse durante los tratamientos y la mayoría desaparecen con el tiempo; sin embargo, algunos padecimientos podrían durar o aparecer hasta años después. Debido a que la radiación no solo afecta a las células cancerosas, el funcionamiento de algunos órganos en el área radiada puede verse disminuida. Asimismo, existe el riesgo de desarrollar un segundo cáncer en el futuro, resultado del daño al tejido normal (American Cancer Society 2015c; National Cancer Institute 2015b).

### **Quimioterapia citotóxica**

Se refiere a la terapia que mediante el uso de fármacos elimina a las células cancerosas. Estos fármacos circulan en el torrente sanguíneo y actúan directamente sobre células que se dividen rápidamente, deteniendo su capacidad de crecer y dividirse. Debido a que los tumores contienen células con una alta tasa de proliferación, esta característica es el principal blanco de la terapia. Este tipo de tratamiento, en comparación con la cirugía y la radioterapia, actúa en todo el cuerpo, dañando células tumorales que se encuentran en una locación distinta a la del tumor primario. El objetivo principal de la quimioterapia consiste en eliminar a las células cancerosas e impedir su recurrencia. Sin embargo, en ocasiones en las cuales no es posible eliminar el cáncer, la quimioterapia puede usarse para retardar su crecimiento o para reducir los síntomas. Más de 100 medicamentos se conocen y éstos pueden usarse en distintas combinaciones para alcanzar a un mayor grupo de células, reduciendo la posibilidad de que el cáncer se vuelva resistente a alguno de los fármacos. Asimismo, ésta puede emplearse junto con cirugía y radioterapia para mejorar el pronóstico del paciente.

Los quimio-fármacos pueden clasificarse en:

- ◆ Agentes alquilantes: Dañan directamente el DNA, añadiendo un grupo alquilo a la guanina, lo que detiene la división celular de las células cancerosas. Ejemplos: carboplatino, cisplatino, temozolomida.

- ◆ Antimetabolitos: Interfieren con la producción de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), suelen ser moléculas similares a las purinas y pirimidinas. Ejemplos: 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, capecitabina.
- ◆ Antibióticos: Tienen diferentes efectos, pueden romper DNA y disminuir o detener la tasa de producción de DNA. Ejemplo: daunorubicina, doxorubicina, actinomicina D, bleomicina.
- ◆ Inhibidores de la topoisomerasa: Tienen como blanco a las enzimas del mismo nombre, interfiriendo así con la separación de las hebras de DNA al momento de la duplicación, deteniendo la mitosis, por lo que ejercen su acción durante la fase M del ciclo celular. Ejemplos: topotecan, irinotecan, etoposido, teniposido.
- ◆ Inhibidores de mitosis: Suelen ser alcaloides u otros compuestos derivados de productos naturales. Trabajan deteniendo la mitosis en la fase M del ciclo celular, pero pueden dañar a las células interfiriendo con las enzimas involucradas en la producción de proteínas. Ejemplo: paclitaxel, ixabepilón, vinblastina.

Desafortunadamente el uso continuo de estos medicamentos tiene varias desventajas, entre las que destacan:

- 1) **Resistencia.** Ocurre cuando las células cancerosas que habían respondido de manera positiva a una terapia, comienzan a crecer de nuevo. Es decir, las células adquieren la capacidad de resistir los efectos de la quimioterapia. Esto puede suceder porque algunas de las células que no mueren durante el tratamiento, adquieren mutaciones que les confieren resistencia. Si un cáncer se vuelve resistente a un fármaco o grupo de fármacos, es muy posible que sea resistente a otros medicamentos.
- 2) **Toxicidad.** Estos fármacos van dirigidos hacia las células cancerosas que crecen y se dividen más rápidamente que las células normales sin embargo, este tratamiento no afecta únicamente a células cancerosas. En el cuerpo hay células sanas que de manera normal presentan una alta tasa de proliferación, por lo que el tratamiento puede dañarlas irreversiblemente. Ejemplo de éstas son las células de la médula ósea, tracto digestivo y de la piel. Como consecuencia, los efectos tóxicos más comunes incluyen mielosupresión (disminución en la producción de células sanguíneas, lo que conlleva a inmunosupresión), mucositis (inflamación del revestimiento del tracto digestivo), alopecia (pérdida de cabello), entre muchos otros efectos (American Cancer Society 2015b; National Cancer Institute 2015a).

## Terapia Dirigida

Debido a que en la actualidad contamos con conocimiento más amplio sobre el origen y desarrollo del cáncer, ahora es posible diferenciar a nivel molecular entre células sanas y células cancerosas. Usualmente estas diferencias tienen que ver con la maquinaria celular y pueden ser utilizadas como blancos farmacológicos. El conjunto de tratamientos que utiliza este principio, ha sido denominado Terapia Dirigida. Estos medicamentos pertenecen al grupo de los quimiofármacos, sin embargo, no trabajan de la misma manera. La terapia dirigida bloquea el crecimiento de células cancerosas interfiriendo con

moléculas específicas necesarias para la carcinogénesis y el crecimiento del tumor, en lugar de simplemente interferir con todas las células que se dividen rápidamente.

Según su naturaleza se pueden dividir en varios grupos:

- ◆ Anticuerpos: Como su nombre lo indica, utilizan anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen específicamente a moléculas de la superficie de las células cancerosas o a proteínas. Ejemplo: rituximab, trastuzumab, cetuximab.
- ◆ Hormonas: Comprenden a las hormonas y medicamentos similares a ellas, disminuyen el crecimiento del tumor y la posibilidad de que regrese el cáncer. Ejemplo: tamoxifen, leuprolide, prednisona.
- ◆ Moléculas pequeñas: Son compuestos de bajo peso molecular, por lo que pueden atravesar la membrana celular y actuar contra blancos intracelulares. Estas moléculas pueden presentar diferentes actividades como la inhibición de las cinasas de tirosina (imatinib, dasatinib, gefitinib) o a las cinasas de serina/treonina (temsirolimus, everolimus, trametinib).

A pesar de que estos fármacos van dirigidos a blancos moleculares específicos que son comunes en células cancerosas, éstos también pueden encontrarse en células sanas. Por su mecanismo de acción, los medicamentos tienden a presentar efectos secundarios diferentes al tratamiento citotóxico, los cuales dependen del medicamento administrado. Entre los más comunes se encuentran la diarrea y problemas en el hígado. Otros podrían incluir problemas en la cascada de coagulación y cicatrización de heridas, presión alta, fatiga, llagas en la boca, cambio en las uñas, pérdida de color de cabello, problemas de piel (salpullidos y piel seca). La mayoría de los efectos secundarios desaparecen cuando el tratamiento termina (Lackner, Wilson, and Settleman 2012; National Cancer Institute 2014; American Cancer Society 2015d).

Para concluir esta sección, es importante resaltar que aunque las terapias actuales han demostrado ser eficientes en ciertos tipos de cáncer y etapas clínicas, hay ciertos tipos de tumores malignos, básicamente los sólidos, que cuando son tratados con cirugía, a largo plazo tienen un pobre pronóstico y cuando se les somete a quimioterapia o radioterapia convencional, ésta sólo ofrece posibilidades limitadas para asegurar la restricción de recurrencia local o a distancia (metástasis) del tumor primario. De igual manera, la duración de los beneficios observados en las terapias dirigidas suele ser invariablemente corta debido a la adquisición rápida de resistencia a este tipo de drogas. Asimismo, el desarrollo de fármacos contra alteraciones moleculares en los tumores ha sido difícil y en general este acercamiento ha producido una mejora muy modesta en la sobrevivencia en comparación con las terapias tradicionales (Seruga *et al.* 2010; Vera-Badillo *et al.* 2013). Por ello, aunque está claro que el desarrollo de terapias dirigidas debe de continuar, se necesitan nuevos paradigmas en el tratamiento de cáncer que guíen el diseño de fármacos, con el fin de optimizar las bases de los tratamientos para el cáncer y así asegurar el éxito en la erradicación de esta enfermedad (American Cancer Society 2015b; National Cancer Institute 2015a).

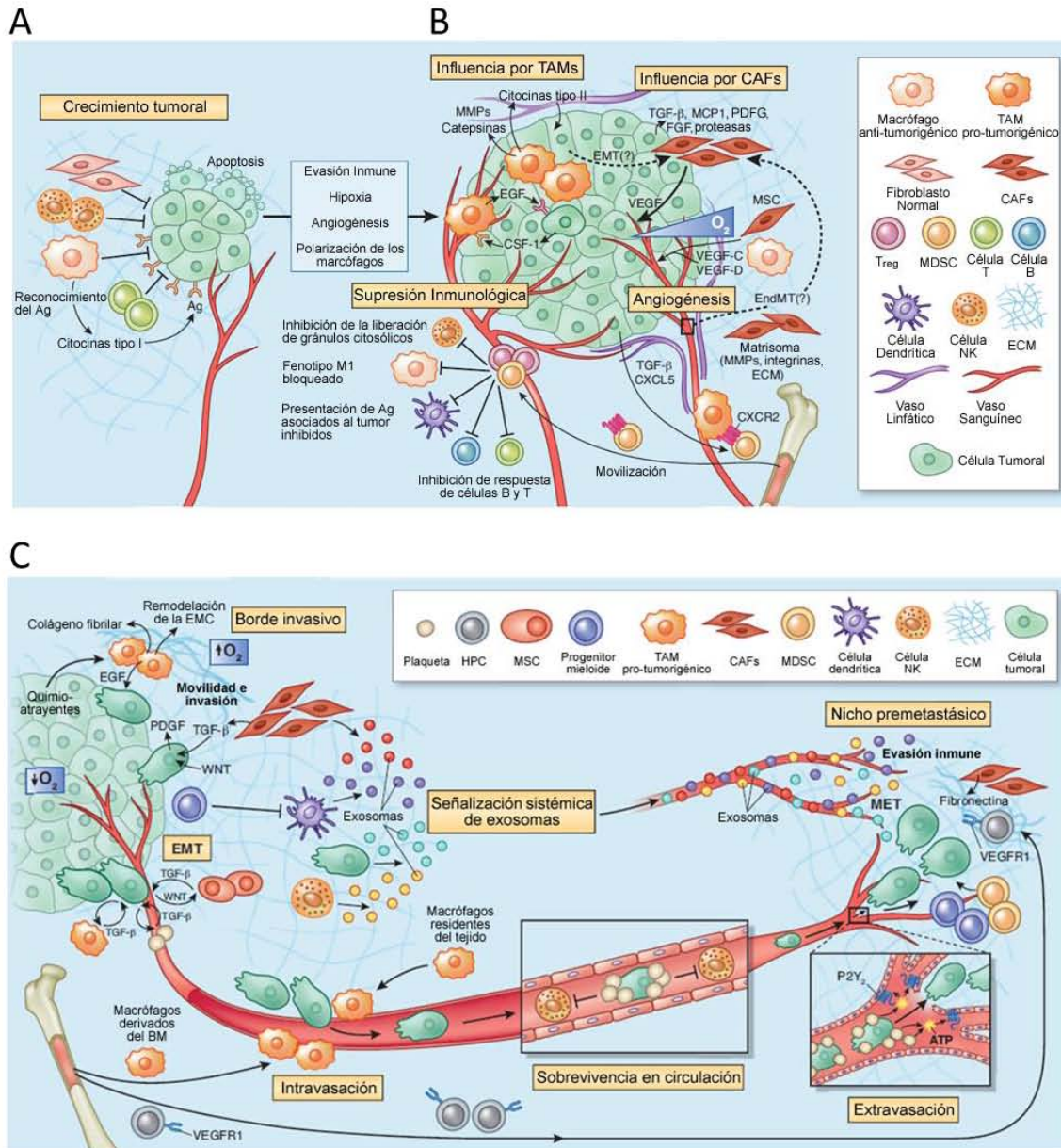
## Microambiente Tumoral (TME)

La célula cancerosa ha sido el dogma de la investigación del cáncer. Durante más de cuatro décadas se ha buscado entender a los oncogenes dominantes y genes supresores de tumores cuya activación, sobre-expresión o pérdida de función confiere propiedades aberrantes a las células, promoviendo su transformación a células cancerosas. Esta idea fue enunciada por primera vez en 1914 por Theodor Boveri en su libro titulado “El origen de los tumores malignos” el cual menciona que “el problema de los tumores es un problema de célula” y que el cáncer se da y permanece por “ciertos cambios permanentes en la cromatina” que “sin necesidad de estímulos externos, obliga a la célula a dividirse de nuevo” (Boveri 1929). Esta teoría asume que los cambios moleculares en el DNA de la célula fundadora harán que ésta sea incapaz de controlar su proliferación y que después de una selección rigurosa, dará lugar a un tumor maligno con ciertas características que incluyen la autosuficiencia de señales proliferativas, insensibilidad a supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, inducción de angiogénesis y la capacidad de invadir otros tejidos y generar metástasis (Hanahan and Weinberg 2000, 2011).

El desarrollo de fármacos también consideró a las células cancerosas como el blanco de las terapias. De ahí surgieron los tratamientos estándar: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, es bien sabido que estas terapias tienen limitaciones: una respuesta inicial del paciente al tratamiento es habitualmente seguida de la progresión de la enfermedad que, acompañada por una disminución de opciones terapéuticas, conlleva finalmente al fallo del tratamiento y muerte por metástasis recurrente (Roché and Vahdat 2011). El panorama de los nuevos fármacos no es más prometedor, ya que en su mayoría no han mostrado una mejoría substancial en la prolongación del tiempo de vida y calidad de la misma (Seruga *et al.* 2010; Vera-Badillo *et al.* 2013), lo que sugiere que desarrollar fármacos o terapias basadas únicamente en la eliminación de las células tumorales podría ser una dirección equívoca.

Recientemente se ha comenzado a estudiar cómo las células cancerosas crecen y desarrollan metástasis bajo la influencia de otras células. El cáncer no es solo una masa de células malignas, sino un órgano complejo en el que otras células son reclutadas y corrompidas. Las interacciones entre células malignas y normales crean el microambiente tumoral (TME) (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012). Ahora se sabe que las células no malignas del TME tienen una función dinámica y muchas veces pro-tumoral en todas las etapas de la carcinogénesis que inclusive influye en la eficiencia de las terapias (Klemm and Joyce 2015). Esta aproximación ha dado explicación a varias observaciones clínicas como la regresión espontánea de neuroblastomas y tumores hormono-sensibles, la normalización de neoplasias mediante la regulación de la arquitectura del tejido, la carcinogénesis causada por cuerpos extraños y neoplasias epiteliales por la alteración del estroma, fenómenos que no habían podido ser explicadas desde el pensamiento “citocéntrico” (Soto and Sonnenschein 2011).

Los principales tipos de células no malignas del TME son células del sistema inmune (Linfocitos T y B, células NK y NKT, células dendríticas, Macrófagos y Neutrófilos asociados al tumor y células supresoras de origen mieloide), fibroblastos, pericitos, adipocitos, la vasculatura y los vasos linfáticos del tumor (Balkwill *et al.* 2012). Así pues la comunicación intercelular es dirigida por una compleja y dinámica red de citocinas,



**Figura 3. Influencia del microambiente tumoral en (A) prevención del crecimiento tumoral, (B) establecimiento del nicho primario y (C) colonización de sitios secundarios (metástasis).** Ag, antígeno; BM, médula ósea; CAFs, fibroblastos asociados al cáncer; ECM, matriz extracelular; EMT, transición epitelio mesénquima; EndMT, transición endotelio mesénquima; HPC, células progenitoras hematopoyéticas; MDSC, células supresoras de origen mieloide; MET, transición mesénquima epitelio; MMPs, metaloproteinasas; MSC, células troncales mesenquimales; TAMs, macrófagos asociados al tumor. (Tomado y modificado de Quail and Joyce 2013).



quimiocinas, factores de crecimiento, enzimas inflamatorias y remodeladoras de la matriz celular en un fondo de perturbaciones mayores a las propiedades físicas y químicas del tejido (Balkwill *et al.* 2012).

Las células del TME suelen prevenir el crecimiento del tumor sin embargo, mediante mecanismos que todavía no son completamente entendidos, pueden llegar a corromperse y favorecer el establecimiento del nicho primario mediante la inhibición del sistema inmune, regulación de la disposición de factores de crecimiento y producción *de novo* de vasos sanguíneos. También se sabe que dichas células pueden favorecer la colonización de sitios secundarios y subsecuente formación de metástasis promoviendo la transición epitelio mesénquima, sobrevivencia en circulación y facilitando la extravasación (Quail and Joyce 2013) (Figura 3).

Así como el TME es capaz de favorecer la progresión tumoral, muchos estudios han demostrado que el microambiente también es capaz de normalizar a las células tumorales sugiriendo que la reprogramación de las células estromales, en lugar de la ablación de células cancerosas, podría ser una estrategia efectiva (Quail and Joyce 2013). Así pues, elegir como blanco algunos aspectos del TME podría permitir alcanzar un “punto de inflexión” donde el sistema promotor de tumor y supresor del sistema inmune del TME sea desarmado y reprogramado, el suministro caótico de sangre normalizado y las células malignas eliminadas (Balkwill *et al.* 2012).

## **Ácido desoxirribonucleico extracelular (exDNA)**

Se ha propuesto que uno de componentes del TME que podría afectar el desarrollo del tumor es el DNA extracelular (exDNA) (Hawes, Wen, and Elquza 2015). Se le conoce como DNA libre de célula o circulante al DNA que no se encuentra confinado dentro de una célula y que puede encontrarse en fluidos corporales como la sangre, esputo, saliva, orina, entre otros, o bien en el espacio intersticial cercano a las células. Ahora se sabe que este DNA se encuentra de manera regular en el torrente sanguíneo tanto en personas sanas como en una gran variedad de patologías como lo son lupus eritematoso, artritis reumatoide y cáncer entre otros (Davis *et al.* 1999; Wen *et al.* 2013; Trejo-Becerril 2014).

A pesar de que se conocía de la presencia de DNA en plasma de humanos desde mediados del siglo pasado (Mandel and Metais 1948), la mayoría de la comunidad científica pensó que este DNA era solo un deshecho producto de necrosis o apoptosis celular. Tuvieron que pasar casi 30 años para que este paradigma comenzase a cambiar.

El trabajo pionero de Leon y colaboradores demostró que en pacientes con cáncer hay una mayor concentración de DNA en circulación. Asimismo notaron que la disminución de éste generalmente correlacionaba con una mejoría en el paciente (disminución del tamaño tumoral y/o reducción de dolor) y por el contrario, la ausencia de respuesta al

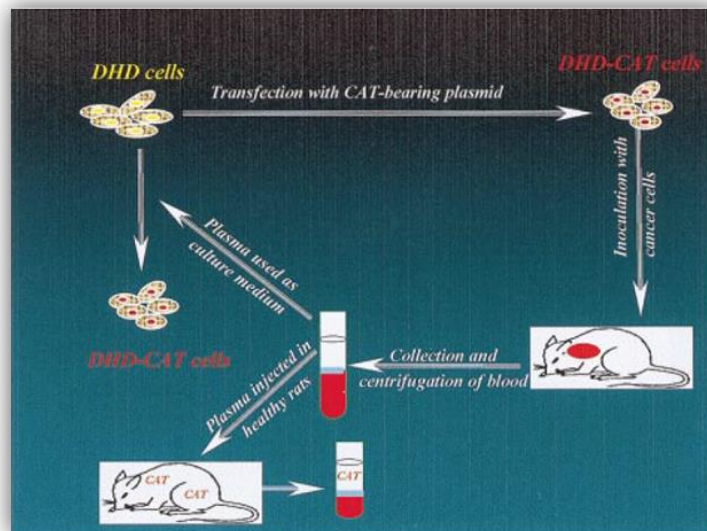
tratamiento correspondía a sujetos con concentraciones de exDNA sin cambio o en aumento durante el tratamiento (Leon *et al.* 1977).

Diecisiete años después y de manera simultánea, dos grupos encontraron en sangre de pacientes con leucemia y cáncer pancreático secuencias mutadas de RAS. Dado que los tumores de estos pacientes contenían las mismas secuencias, se sugirió que el exDNA detectado podría provenir de células tumorales y se propuso que estas secuencias podrían servir como marcadores diagnósticos y pronósticos (Sorenson *et al.* 1994; Vasioukhin *et al.* 1994). Esta idea prevalece en la actualidad y ha tomado más fuerza a medida que se ha encontrado una relación más fuerte entre niveles de exDNA en suero/plasma y metástasis (Kopreski *et al.* 1997; Jahr *et al.* 2001; Anker, Mulcahy, and Stroun 2003; Diehl *et al.* 2008; Guadalajara *et al.* 2008; Holdenrieder *et al.* 2008; Gahan 2010; Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011; Mittra 2015; Ocaña *et al.* 2016). Actualmente se sabe que el rango de concentración de exDNA en el suero/plasma de personas sanas está en un rango entre 0.1 a 100 ng/ml mientras que en pacientes con cáncer va desde los 5 ng/ml hasta los 2 µg/ml (Gahan and Stroun 2010).

Todas estas observaciones clínicas hicieron que varios investigadores se preguntasen si el exDNA era simplemente deshecho tumoral o si éste tenía implicaciones importantes en el desarrollo del cáncer. Así en 1994 se descubrió que el sobrenadante de células cancerosas transforma líneas celulares. El grupo de Anker encontró que la línea celular murina NIH3T3 incubada con el sobrenadante de una línea de carcinoma de colon humana (SW480), produce la aparición de focos transformados en el cultivo, similares a los que se obtienen con la transfección con calcio del gen K-ras mutado. Sorprendentemente, observaron que los focos de NIH3T3 transformados por el sobrenadante también adquirieron las secuencias mutadas de K-ras, presumiblemente mediante transferencia horizontal, sugiriendo que este intercambio genético fue el responsable de la transformación celular (Anker *et al.* 1994). Posteriormente otro grupo observó un fenómeno similar en el que DNA, proveniente de cuerpos apoptóticos, podía llegar al núcleo de las células que lo fagocitaron (fibroblastos, macrófagos y células endoteliales) para permanecer de manera estable y transcribirse (Holmgren *et al.* 1999). Otros experimentos que utilizaron cuerpos apoptóticos provenientes de líneas celulares cancerosas mostraron que sólo fibroblastos deficientes en p53 podían ser transformados mientras que células normales no lo hacían, sugiriendo que sólo las células iniciadas son susceptibles a transformación y se propuso a la transferencia horizontal como un mecanismo de inestabilidad genómica (Bergsmedh *et al.* 2001).

A pesar de la calidad y cantidad de experimentos que apoyan la transferencia de material genético en cáncer, todos ellos habían sido presentados en un contexto *in vitro*. En 1999 el grupo de García Olmo presentó pruebas de que este mecanismo podría estar sucediendo *in vivo*. El grupo de trabajo desarrolló un modelo experimental de cáncer usando células con una etiqueta o "tag" asociado al genoma. Transfectaron una línea celular de carcinoma de colon (DHD) con un plásmido que incluía cDNA para el gen bacteriano de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y un gen seleccionador de resistencia a neomicina (NeoR) y obtuvieron una línea celular DHD con secuencias CAT (DHD-CAT).

Posteriormente inocularon células DHD-CAT en ratas inmunocompetentes para generar tumores. Una vez que el tumor se estableció, tomaron sangre de las ratas y obtuvieron plasma para cultivar células DHD (sin marca). Lo que encontraron fue que estas células adquirieron secuencias CAT. Así pues, señalaron que las células DHD podían adquirir el marcador genético CAT y convertirse en una célula DHD-CAT de dos maneras: i) la canónica, como resultado de la transfección directa del plásmido con el marcador genético o ii) mediante contacto directo de plasma de rata con cáncer DHD-CAT (Figura 4). Cabe mencionar que uno de los cultivos que se co-cultivó con plasma de rata DHD-CAT, presentó resistencia a neomicina lo que indica que las secuencias de DNA no sólo son capaces de transferirse *in vivo*, sino también de expresarse. Asimismo inocularon cuatro ratas sanas con plasma de cuatro ratas con tumor DHD-CAT. De manera interesante, en los cuatro animales se encontró el gen marcador CAT en extractos de pulmones, lugar al que las ratas inoculadas con DHD (de manera subcutánea o por inyección en la pared del ciego del intestino grueso) siempre desarrollan metástasis (García-Olmo 1999).



**Figura 4. Representación esquemática de los experimentos de García-Olmo.** Células DHD se convierten en células con tag (DHD-CAT) de dos maneras: mediante transfección directa o como resultado de cultivo en medio con plasma de ratas con tumores DHD-CAT (García-Olmo 1999).

En estudios posteriores, el mismo grupo utilizó el sobrenadante de otras líneas celulares cancerosas, plasma de pacientes con cáncer colorectal y personas sanas para cultivarlo con células NIH3T3 y encontraron que estas células eran transformadas por el sobrenadante de las células cancerosas y el plasma de pacientes con cáncer, mientras que el plasma de individuos sanos no lo hacía (García-Olmo and García-Olmo 2001; García-Olmo *et al.* 2010).

En resumen, todos estos experimentos proponen que el exDNA puede transformar a células susceptibles, presumiblemente mediante su transferencia horizontal y que este es un proceso que puede suceder *in vivo*.

El origen del DNA extracelular es muy diverso. Puede provenir de cuerpos apoptóticos (Bergsmedh *et al.* 2001; Holmgren *et al.* 1999; Samos *et al.* 2006), necrosis (Jahr *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; García-Olmo *et al.* 2008), diversas vesículas extracelulares en las que se incluyen microvesículas, exosomas y virtosomas (Gahan and Stroun 2010; Rykova *et al.* 2012; Cai *et al.* 2013, 2014; Minciacchi, Freeman, and Di Vizio 2015) así como de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Cools-Lartigue *et al.* 2014; Hawes *et al.* 2015). A este respecto es importante mencionar que en años recientes ha crecido el número de reportes apuntando a que en cáncer al menos una parte del exDNA proviene de NETs y que éste también está asociado a la progresión tumoral. Ahora se sabe que la inflamación es un rasgo importante relacionado al desarrollo del cáncer, a tal grado que ha sido marcado como un sello característico del cáncer (Hanahan and Weinberg 2011) y que los neutrófilos están fuertemente asociados a este proceso. De hecho, se sabe que ciertos grupos de ellos pueden asociarse íntimamente con los tumores promoviendo en algunos casos la progresión tumoral (Quail and Joyce 2013). En un estudio reciente, encontraron que pacientes con sarcoma de Ewig cuyos tumores fueron positivos a NETs (un 25% del total) tuvieron una recaída temprana, a pesar de entrar en remisión completa después de un tratamiento de quimioterapia intensiva, por lo que sugirieron que la presencia de NETs podría estar asociada a una mala prognosis (Berger-Achituv *et al.* 2013). En otro estudio, donde utilizaron ratones con leucemia, carcinoma de Lewis y carcinoma mamario, encontraron mayores niveles de exDNA y un mayor número de neutrófilos en circulación. Además, cuando aislaron estos neutrófilos de circulación, las células eran más susceptibles a formar NETs en comparación a los neutrófilos de animales sanos (Demers *et al.* 2012). En apoyo a estos resultados, el grupo de Wen encontró que hay exDNA cubriendo células de cáncer pancreático y que éste es crítico para el comportamiento metastásico, asimismo encontró una vía de retroalimentación entre este exDNA y la expresión de Interleucina 8 (IL-8), molécula que produce formación de NETs (Wen *et al.* 2013). Aunque el mecanismo de estos fenómenos no ha sido del todo elucidado, se ha sugerido que las NETs ayudan a la adhesión de células cancerosas a sitios distantes, evasión del sistema inmune, aumento en la proliferación celular y desarrollo de angiogénesis (Demers *et al.* 2012; Cools-Lartigue *et al.* 2014; Hawes *et al.* 2015; Kim and Bae 2016).

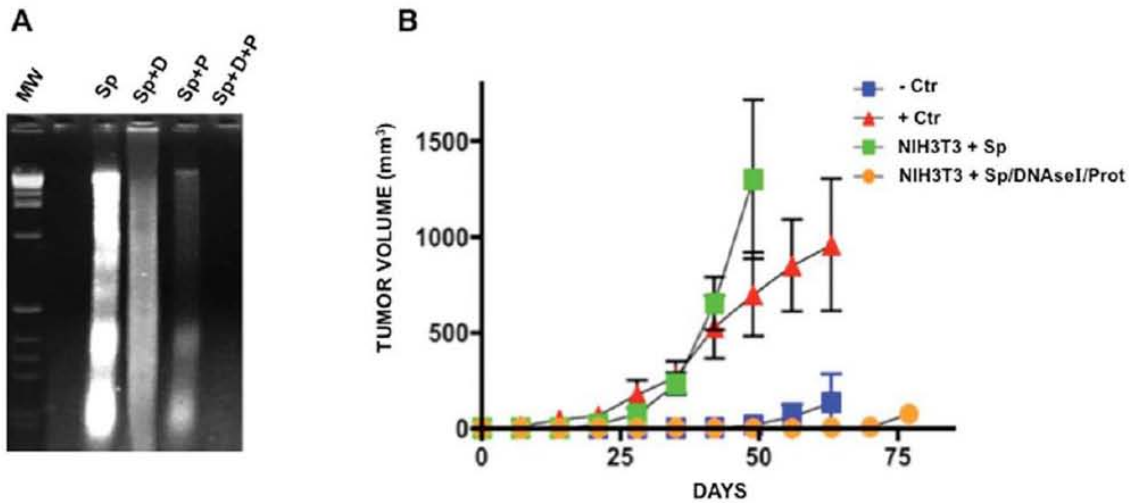
En resumen, todos estos experimentos llevaron a plantear la teoría de que el exDNA, lejos de ser un deshecho biológico, está implicado directamente en el desarrollo de transformación y metástasis, posiblemente mediante su transfección a células susceptibles (Holdenrieder *et al.* 2011) y/o a través de inmunoección del cáncer con la formación de NETs (Berger-Achituv *et al.* 2013).

## ANTECEDENTES

En el grupo de investigación del Dr. Alfonso Dueñas se estudia el papel que el exDNA tiene en la progresión tumoral. En 2012 publicaron el trabajo titulado “Progresión del cáncer mediado por transferencia horizontal de genes en un modelo *in vivo*”. En este trabajo se confirmó la habilidad del exDNA para inducir transformación *in vitro* y se demostró que la progresión tumoral horizontal por exDNA se da por la adquisición de este material genético a células iniciadas en un modelo *in vivo* (Trejo-Becerril *et al.* 2012).

Para demostrar la transformación *in vitro*, los autores incubaron fibroblastos murinos NIH3T3 con 1) el sobrenadante de la línea celular humana de cáncer de colon SW480, 2) suero de pacientes con cáncer y 3) suero de personas sanas, para después inyectarlos subdérmicamente en ratones inmunocompetentes. Se observó que las células cultivadas con el sobrenadante y el suero de pacientes desarrollaron tumores muy parecidos a los que se obtienen cuando se inoculan células NIH3T3 transfectadas con DNA genómico de SW480, mientras que con el suero de personas sanas no hubo desarrollo tumoral. Posteriormente, se eliminó el DNA presente en el sobrenadante de la línea celular cancerosa y se encontró que éste sólo era eliminado cuando se trataba con una combinación de DNasa I y Proteinasa K. Esto no ocurría cuando era tratado únicamente con DNasa I o Proteinasa K por separado (Figura 5A). También se demostró que si se agregaba sobrenadante de SW480 tratado con estas enzimas al cultivo de los fibroblastos, éstos no desarrollaban tumores al inocularse en los ratones (Figura 5B).

En el trabajo también se demostró que la transferencia horizontal ocurre *in vivo*. Para probarlo utilizaron ratas inmunocompetentes y se formaron seis grupos: 1) Control negativo (sin tratamiento); 2) ratas inoculadas con SW480; 3) ratas tratadas con el carcinógeno de colon 1,2-dimetilhidrazina (DMH); 4) ratas con DMH y SW480; 5) ratas con DMH, SW480, DNasa I y una mezcla de proteasas (tripsina, quimiotripsina y papaína) y 6) ratas con DMH, DNasa I y proteasas (Tabla 1). Se encontró que el grupo cuatro tuvo un mayor número de ratas que desarrollaron tumores en colon (62.5%) comparado con el grupo que sólo fue tratado con DMH (16.6%). Además, las ratas de este grupo (cuatro) desarrollaron diseminación tumoral (metástasis) a nivel peritoneal y pleural, lo que sugería que la presencia del DNA exógeno exacerba la carcinogénesis. Por otro lado, encontraron que los animales del grupo cinco, a pesar de haber sido tratados con DMH y células cancerosas, presentaron tumores sólo en el 16.6% de los casos, porcentaje similar al obtenido en el grupo que sólo fue tratado con DMH (grupo tres). Por lo que propusieron que las enzimas (DNasa I y proteasas), degradan el exDNA *in vivo* y que la eliminación de este complejo DNA-proteínas es la causa de una disminución tumoral en los animales. Esta conclusión es apoyada por un gran número de artículos, mencionados a continuación con mayor detalle, que han mostrado la actividad anti-tumoral y anti-metastásica de estas enzimas; sin embargo, en todos estos reportes, las enzimas han sido administradas por separado y no en conjunto.



**Figura 5. Tumorigénesis resultante de la inoculación de células NIH3T3 cultivadas con diferentes sobrenadantes. (A)** Electroforesis en gel de agarosa de DNA extraído del sobrenadante (Sp) de SW480 o con tratamiento: sobrenadante tratado con DNasa I (Sp+D), con papaína, tripsina y quimiotripsina (Sp+P) y con todas las enzimas (Sp+D+P). **(B)** Crecimiento tumoral de células NIH3T3 cultivadas con los sueros e inoculadas a ratones inmunocompetentes. -Ctr: Células SW480, +Ctr: Células NIH3T3. (Trejo-Becerril *et al.* 2012)

**Tabla 1. Resultados de tumorigénesis *in vivo* en ratas Fisher inmunocompetentes.**

Grupo	Tratamiento	Animales	Tumores
(i)	Ninguno	6	0 (0%)
(ii)	SW480	7	0 (0%)
(iii)	DMH	12	2 (16.6%)
(iv)	DMH+SW480	16	10 (62.5%)*
(v)	DMH+SW480+D/P	6	1 (16.6%)
(vi)	DMH+D/P	6	2 (40%)

D/P significa tratamiento con DNasa I/Proteasas

\*Estadísticamente significativo con el test de Fisher comparado con el grupo (iii).

(Trejo-Becerril *et al.* 2012)

## DNasa I

El uso de la DNasa para el tratamiento del cáncer no es nuevo, fue sugerido por primera vez por un grupo de investigadores que observaron que la administración de DNasa a ratones con carcinoma de Ehrlich disminuía la proliferación de las células cancerosas y aumentaba su tiempo de vida (De Lamirande 1961). En otro estudio se le administró

DNasa I a ratones con leucemia y se disminuyeron algunos síntomas característicos de esta enfermedad como lo son la proliferación de células cancerosas y también hubo un incremento importante en el tiempo de sobrevivencia (Salganik *et al.* 1967). Otro grupo de investigación observó que la administración de DNasa I en ratas con cáncer originados por la inoculación de líneas celulares de linfoma y ascitos de hepatoma, disminuye el número de metástasis y aumentaba el tiempo de vida (Sugihara *et al.* 1990, 1993). En otro reporte se demostró que el tratamiento *in vitro* con DNasa I, disminuye la viabilidad celular y proliferación de líneas celulares de cáncer de pulmón, cervicouterino y de fibroblastos (Alcázar-Leyva *et al.* 2009). Finalmente Shklyeva mostró que en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis, los animales tratados con concentraciones bajas de DNasa I disminuye el área de metástasis (Shklyeva *et al.* 2007) y el grupo de Patutina reforzó lo encontrado por ellos y observó los mismos efectos pero en hepatomas (Patutina *et al.* 2010, 2011).

### **Efecto de las proteasas**

En el caso de la tripsina, quimiotripsina y papaína también hay un gran número de publicaciones en las que se ha observado que tienen efectos antitumorales. Entre 1900 y 1910 se publicaron al menos 13 trabajos que reportaron la eficiencia del uso de enzimas pancreáticas en diversos tumores (Beuth 2008). En un trabajo posterior, observaron que la administración rectal de papaína, tripsina y quimiotripsina en ratones con melanoma, aumentó su sobrevivencia e inhibió el desarrollo de metástasis (Wald, Závadová, *et al.* 1998). En otro reporte, donde utilizaron el mismo tratamiento en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis encontraron que el número de metástasis disminuyó, aumentó tanto el tiempo como la tasa de sobrevivencia y se modificó la expresión de algunas proteínas de adhesión (Wald, Olejár, *et al.* 1998; Wald *et al.* 2001). En otro trabajo, se reportó que el mismo tratamiento retardó el crecimiento de un adenocarcinoma pancreático humano trasplantado a un ratón inmunodeficiente (Wald *et al.* 1999). Por otra parte, se observó que el tratamiento *in vitro* de varias líneas células cancerosas con tripsina y quimiotripsina inhibe su proliferación y metabolismo, además de disminuir su sobrevivencia y abolir la migración celular (Novak and Trnka 2005; Elzer *et al.* 2008). Asimismo, la administración *in vivo* de tripsina y amilasa en ratones con melanoma y tumores inducidos por metilcolantreno incrementó la sobrevivencia y propició la generación de péptidos angiostáticos (Novak and Trnka 2005). Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas enzimas ejercen sus efectos antitumorales es todavía desconocido. Con estos antecedentes, en el presente estudio se planteó la posibilidad de desarrollar una terapia antitumoral basada en la administración sistémica de DNasa I, papaína, tripsina y quimiotripsina, así como evaluar su papel en el contexto del exDNA.

## **JUSTIFICACIÓN**

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y los tratamientos actuales son insuficientes. Estudios recientes sugieren que el exDNA podría ser un blanco terapéutico novedoso. Por lo anterior es necesario investigar si la degradación de este material genético es de valor terapéutico.

## **HIPÓTESIS**

Se ha establecido que el exDNA juega un papel importante en el desarrollo del cáncer. Por ello se propone que la administración sistémica de una mezcla de proteasas (papaína, tripsina y quimiotripsina) y DNasa I puede degradar el exDNA e influir sobre el desarrollo tumoral en modelos *in vivo*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Demostrar que la DNasa I y la mezcla de proteasas (papaína, tripsina y quimiotripsina), pueden degradar el exDNA y proteínas del suero de personas sanas, pacientes con cáncer y ratas Wistar así como determinar si la administración de la combinación de estas enzimas tiene un efecto antitumoral.

### **Objetivos Particulares**

- ◆ Evaluar la capacidad de DNasa I, papaína, tripsina y quimiotripsina para degradar el exDNA en el suero de pacientes con cáncer y de personas sanas.
- ◆ Determinar el efecto de la administración sistémica de DNasa I, papaína, tripsina y quimiotripsina sobre los niveles de exDNA y proteínas séricas en ratas inmunocompetentes.
- ◆ Establecer el potencial antitumoral del tratamiento enzimático en un modelo de ratones inmunocomprometidos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

- I. Se obtuvieron cuatro muestras de mujeres sanas y cuatro muestras de pacientes con cáncer de mama (carcinoma ductal infiltrante). La obtención de las muestras fue aprobada por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cancerología cumpliendo los lineamientos de la Declaración de Helsinki (World Medical Association 2013).
- II. Se utilizaron células SW480 que es una línea celular humana de cáncer de colon obtenida de la "American Type Culture Collection (ATCC)" (Rockville, E.U.A) # de cat. CCL-228.
- III. Se utilizaron células C6 de una línea celular aislada a partir de un glioma de rata Wistar inducido por la inyección del carcinógeno N-nitrosometilurea (Benda *et al.* 1971), fue obtenida de la "American Type Culture Collection (ATCC)" (Rockville, E.U.A) # de catálogo CCL-107.
- IV. Todos los experimentos, así como la manipulación y mantenimiento de los animales fue de acuerdo con las especificaciones técnicas para el uso de los animales de laboratorio de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), y siguiendo las directrices y estándares de Animal Research Advisory Committee (ARAC) del NIH Office of Animal Care and Use (ORAC). Las cepas de animales que se usaron fueron las siguientes:
  - a. Ratas Wistar; Se utilizaron ratas macho Hsd:WI de 5-6 semanas de edad con aproximadamente 250-300 g de peso (Harlan Laboratories, # de cat. RccHan:WIST). Antes y durante los experimentos, los animales se mantuvieron con alimento para roedor y agua *ad libitum*, a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo 12 horas luz:12 horas oscuridad y una humedad relativa de 50%.
  - b. Ratones BALB/c (nu/nu); Se utilizaron ratones hembras atímicos BALB/c (nu/nu) de 5-6 semanas de edad (Harlan Laboratories, # de cat. Hsd:athymic nude-Foxn1nu). Antes y durante los experimentos, los animales, su cama, alimento y agua se mantuvieron en esterilidad a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo 12 horas luz:12 horas oscuridad y una humedad relativa de 50%.

## **Colecta y preparación de sueros humanos**

La sangre se obtuvo mediante punción venosa de la vena cubital media (interior del codo) y fue colectada en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, 368162) que contiene un activador de coagulación y un gel de polímeros que ayuda a la separación del suero. Se obtuvieron de 5 a 6 mL de muestras de sangre por individuo, las cuales se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento, siempre dentro de las siguientes 24 h. Los sueros obtenidos fueron centrifugados a 1,000x g por 20 min (Biofuge primo R, Heraeus) a 4°C. Una vez separada la fracción celular, el suero fue retirado manualmente y filtrado con una membrana de 0.45 µm (Sartorius, 16555) con el objetivo de remover células y detritus celulares. Las muestras fueron almacenadas a -80°C para análisis subsecuentes.

## **Colecta y preparación de los sueros de rata**

La extracción de suero en las ratas Hsd:Wistar, se realizó por canulación de la vena caudal; 500 µL de sangre fueron colectadas en tubos sin anticoagulantes (Terumo, T-M) a los 7.5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 6 h post administración del tratamiento además de la muestra 0 antes del tratamiento. Todas las muestras de sangre se incubaron a 4°C mínimo por 2 horas y luego se centrifugaron a 4°C a 1000g por 20 min. El suero fue colectado y filtrado con un filtro de 0.45 µm y se guardaron a -80°C para ensayos posteriores.

## **Tratamiento enzimático del suero *in vitro***

Se prepararon soluciones stock (10 mg/mL) de cada una de las enzimas: papaína (Sigma-Aldrich, # de cat. P4762), tripsina (Sigma-Aldrich, # de cat. T1426), quimiotripsina (Sigma-Aldrich, # de cat. C4129) y DNasa I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, # de cat. D4263). Las enzimas se pesaron y diluyeron en solución salina (NaCl al 0.9%), la solución madre fue preparada al momento del experimento y el sobrante se descartó.

La digestión de las muestras se realizó incubando 100 µL de suero con las enzimas de interés en las siguientes concentraciones: papaína (0.31 mg/mL), quimiotripsina (0.125 mg/mL), tripsina (0.125 mg/mL) y/o DNasa I (1.44mg/mL) durante 1 h a 37°C, en un volumen final de 101.5-103.1 µL. Posteriormente se inactivaron por 30 min a 56°C.

## **Cuantificación del exDNA en suero**

Se utilizó el método descrito por Goldshtein (Goldshtein, Hausmann, and Douvdevani 2009) para cuantificar el exDNA directamente en suero (humano y murino) utilizando SYBR® Gold (Invitrogen). Para ello se diluyó SYBR Gold con dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) en una proporción 1:1000 y esta dilución a su vez fue diluida 1:8 en amortiguador de fosfatos (PBS). Se preparó la curva patrón a partir de una solución madre de DNA de timo de ternera y se realizaron las diluciones necesarias para obtener las siguientes concentraciones; 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 ng/µL en PBS con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) al 2% (v/v). Las muestras se prepararon diluyendo los sueros al 20% en PBS (v/v). En microplacas de 96 pozos se añadió por pozo, 10 µL de solución de DNA (curva patrón o muestra) más 40 µL de SYBR Gold en PBS. La placa se cubrió con papel aluminio para evitar el contacto con la luz y se midió la fluorescencia en un fluorómetro (Tecan Infinite® 200 PRO series) a una longitud de onda

de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Los sueros hemolizados se excluyeron de este estudio, ya que se observó que la hemólisis interfiere con las lecturas.

### **Cuantificación de proteínas**

Las proteínas séricas se cuantificaron utilizando el método descrito por Bradford (Bradford 1976). El reactivo de Bradford se preparó con azul brillante de Coomassie G-250 al 0.01% (m/v), etanol al 4.7% (m/v) y Ácido Fosfórico al 8.5% (m/v). Para la curva patrón se disolvió Seroalbúmina Bovina (BSA, Sigma-Aldrich) en H<sub>2</sub>O y se realizaron soluciones madre de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 µg/µL. Las muestras de suero se diluyeron en una proporción 1:200 con H<sub>2</sub>O. La reacción se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos y se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford más 10 µL de curva patrón o muestra por pozo. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Labsystems, Multiskan MS) a una longitud de onda de 595 nm.

### **Peso molecular de proteínas séricas**

El peso molecular (integridad) de las proteínas séricas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 7.5 o 12% (v/v). Se cargaron 10 µg por carril y las muestras se corrieron a 115 mV durante 2 horas. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se fotografiaron, desecaron y almacenaron. Para el análisis densitométrico de cada carril, en los geles SDS-PAGE se usó el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015) según las especificaciones de la Guía del Usuario.

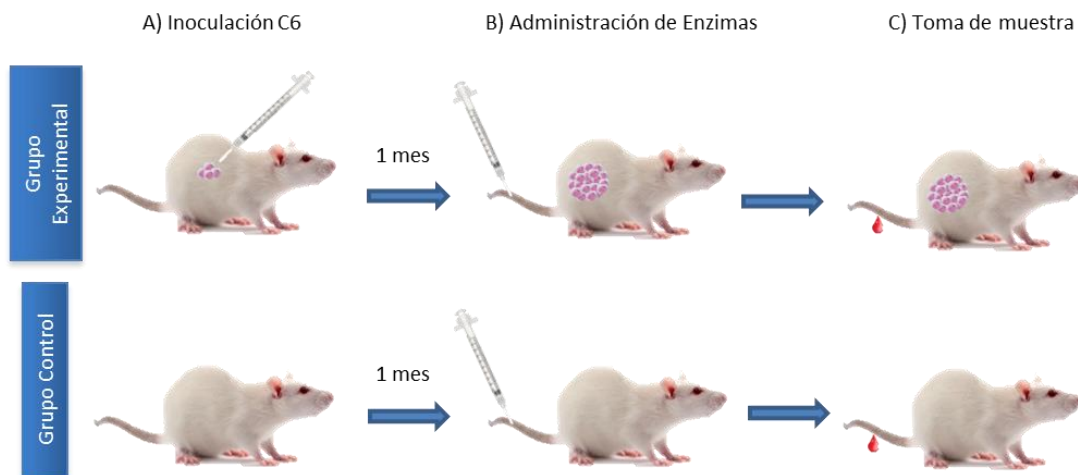
### **Cultivo líneas celulares**

Las células C6 y SW480 se cultivaron en botellas de 175 cm<sup>2</sup> (Corning, 431085), con 25 mL de medio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12; Invitrogen) y con 2% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) al 10% (v/v). El cambio de medio fue realizado cada 48 h. Ambos cultivos se mantuvieron en una incubadora (Thermo, Forma Series II-3110) que mantuvo una temperatura constante de 37°C, humedad relativa del 98% y una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%.

### **Tratamiento enzimático *in vivo* con DNasa I y proteasas**

Se utilizaron ratas Hsd:Wistar, las cuales se dividieron en dos grupos: A) grupo control y B) grupo tumoral, cada uno con cuatro ratas. Los animales del grupo tumoral fueron inoculados con la línea celular tumoral C6. Las células inoculadas fueron obtenidas de cultivos al 75% de confluencia. Para despegar a las células, se les adicionó amortiguador de fosfato salino más etilen-diamino-tetraacético (PBS-EDTA) más tripsina (Sigma-Aldrich) y se incubaron por 5 min a 37°C. La reacción se detuvo con medio DMEM-F12, más SFB al 5%. Posteriormente se centrifugaron (Biofuge primo R, Heraeus) a 1000 RPM por 5 min y se lavaron en 3 ocasiones sólo con medio para eliminar el SFB. Posteriormente se contaron con un hemocitómetro (TC10, BioRad) y se resuspendieron en un volumen de 200 µL de medio sin suero. Finalmente 2x10<sup>6</sup> células se inocularon vía subcutánea en cada flanco (izquierdo y derecho) en el lomo de la rata.

Después de 4 semanas de la inoculación, las ocho ratas fueron tratadas con una dosis única de enzimas: papaína 25 mg/kg, tripsina 10 mg/kg, quimiotripsina 10 mg/kg y DNasa I 2.3 mg/kg. Todas las enzimas fueron administradas a través de una cánula que se colocó en la vena caudal y se retiró después de terminar el ensayo. Se obtuvieron muestras de sangre antes del tratamiento y a los 7.5 min, 15 min, 30 min y 60 min después de la administración de las enzimas a través de una cánula en la vena caudal. La Figura 6 muestra el diseño del experimento.



**Figura 6. Diseño Experimental para evaluar el tratamiento enzimático en un modelo *in vivo*.** A: Inoculación subdérmica de  $10^6$  de células C6 por flanco, B: Administración vía intravenosa de DNasa I (2.3 mg/kg), papaína (25 mg/kg), tripsina (10 mg/kg) y quimiotripsina (10 mg/kg), C: Toma de sangre a los 7.5 min, 15 min, 30 min y 60 min.

### Efecto antitumoral *in vivo* del tratamiento enzimático

Se utilizaron ratones atímicos BALB/c (nu/nu) los cuales fueron inoculados vía subcutánea con  $1 \times 10^6$  células SW480 por flanco, resuspendidas en 100  $\mu$ L de medio DMEM-F12 sin suero (el cultivo y procesamiento de las células para la inoculación, fue similar al descrito anteriormente para las células C6). Los 24 ratones se dividieron en 4 grupos con 6 animales cada uno. Los grupos fueron los siguientes:

- I. Inyección de células SW480 como control positivo no tratado.
- II. Inyección de células SW480 más tratamiento con proteasas: tripsina (10 mg/kg), quimiotripsina (10 mg/kg) y papaína (25 mg/kg).
- III. Inyección de células SW480 más tratamiento con DNasa I (2.3 mg/kg).
- IV. Inyección de células SW480 más tratamiento con Proteasas y DNasa I (con las dosis anteriormente descritas).

La administración de la DNasa I fue vía intramuscular mientras que la mezcla de proteasas se administró por vía intraperitoneal. Todas las enzimas fueron diluídas en solución salina. El tratamiento enzimático se administró diariamente por 63 días, iniciando

al día 21 después de la implantación del tumor. El crecimiento de los tumores y el peso del animal fueron monitoreados y registrados semanalmente. El tamaño del tumor se midió con un vernier electrónico y se estimó el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula:

$$a \times b^2 \times \left(\frac{\pi}{6}\right) = V(mm^3)$$

donde a = diámetro mayor, b = diámetro menor y V = volumen en milímetros cúbicos (Kjønniksen *et al.* 1989). Después de 63 días, los animales fueron sacrificados y los tumores o sitios de implantación fueron removidos y procesados para un análisis rutinario histopatológico con hematoxilina y eosina. Un patólogo realizó la evaluación en ciego y se definió como respuesta patológica completa a la ausencia de células tumorales viables. El diseño del experimento se muestra en la Figura 7.



**Figura 7. Diseño Experimental para determinar el efecto antitumoral del tratamiento enzimático en un modelo *in vivo*.** A: Inoculación subdérmica de  $10^6$  SW480, B: Administración diaria intramuscular de DNasa I (2.3 mg/Kg) e intraperitoneal de proteasas (papaína; 25 mg/kg, tripsina; 10 mg/kg y quimiotripsina; 10 mg/kg), C: Medición del tamaño tumoral y peso, D: Sacrificio y remoción del sitio de implantación o tumor.

## Pruebas estadísticas

La elaboración de las gráficas, pruebas T de Student así como el análisis de varianza (ANOVA) de un factor seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunnet o Tukey, se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California EE.UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## RESULTADOS

### Degradación de exDNA *in vitro*

Como primer objetivo, se diseñó un experimento *in vitro* con suero de sujetos sanos y pacientes con cáncer de mama para probar el efecto que tiene el tratamiento enzimático, sobre los niveles de exDNA. De cada muestra de suero se formaron cuatro grupos:

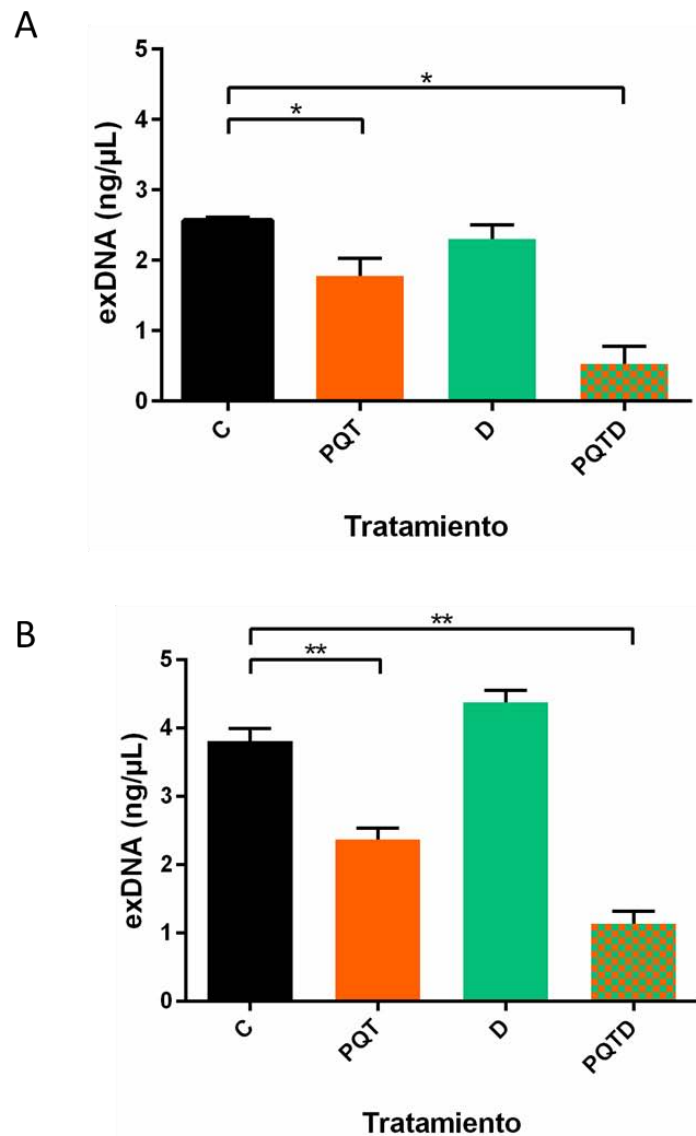


Figura 8. Concentración de exDNA en suero de sujetos sanos (A) y pacientes con cáncer de mama (B) tratados *in vitro* con la mezcla enzimática. C: Suero sin tratamiento, P: papaína (0.31 mg/mL), Q: quimiotripsina (0.125 mg/mL), T: tripsina (0.125 mg/mL) y D: DNasa I (1.44 mg/mL). Tukey's test \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.0005$ .

1) suero + DNasa I (D); 2) suero + papaína + quimiotripsina + tripsina (PQT); 3) suero + P+Q+T+D y 4) suero sin tratar (C). Los resultados se muestran en la Figura 8. De manera general, se observa que la concentración de exDNA es aproximadamente de 1 ng mayor en los pacientes con cáncer en comparación con los sujetos sanos, pero el efecto tras el tratamiento con las enzimas es similar en ambos grupos de sujetos.

En el grupo de sujetos sanos (Figura 8A), se observó que el tratamiento con las proteasas (PQT) disminuyó un 31% los niveles de exDNA en comparación con el control; el tratamiento con DNasa I (D) en un 22% y el grupo que se trató con todas las enzimas en un 81% (PQTD). Se realizaron las pruebas estadísticas de Anova y de Tukey, encontrándose que en comparación al control, sólo los grupos PQT ( $p=0.0010$ ) y PQTD ( $p<0.001$ ) presentaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 6). Asimismo encontramos que entre estos dos grupos también hay diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.0001$ ).

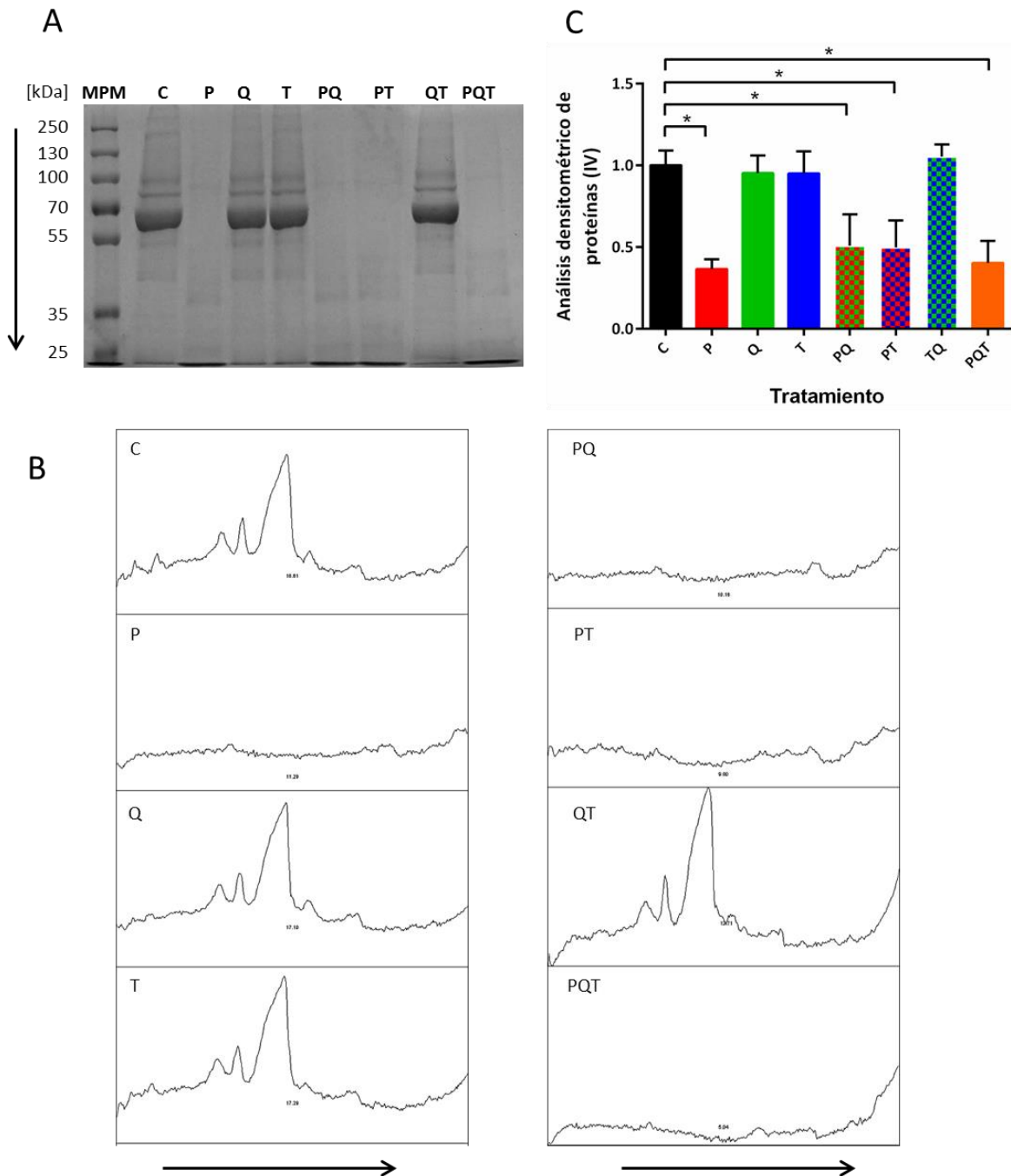
En el grupo de los pacientes con cáncer de mama (Figura 8B), el suero tratado con proteasas (PQT) disminuyó un 18% los niveles de exDNA, en tanto que el que fue tratado con sólo DNasa I (D) presentó un aumento del 15%; mientras que el suero tratado con PQTD presentó una disminución del 93% en comparación al control. Sin embargo, al aplicar las pruebas estadísticas de Anova y de Tukey se encontró que sólo los grupos PQT ( $p=0.0005$ ) y PQTD ( $p<0.0001$ ) presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Anexo 6). Asimismo, se observó que estos dos grupos presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0017$ ).

En conclusión, el tratamiento que mayor efecto tuvo sobre los niveles de exDNA en ambos grupos de individuos, fue el grupo de sujetos tratados con PQTD, seguido de PQT.

## **Degradación de proteínas séricas *in vitro***

Una vez evaluado el efecto de las enzimas sobre el exDNA, se investigó el efecto de éstas sobre las proteínas séricas. Como las proteasas utilizadas tienen distintos sitios de corte (Anexo 1), se decidió evaluar el efecto de cada una de las proteasas por separado y en combinación. Se utilizó otra alícuota de los sueros de las personas sanas y de las pacientes con cáncer de mama y se trataron con las proteasas. Se formaron ocho grupos; 1) suero + papaína (P); 2) suero + tripsina (T); 3) suero + quimiotripsina (Q); 4) suero + papaína + tripsina (PQ); 5) suero + papaína + quimiotripsina (PQ); 6) suero + tripsina + quimiotripsina (TQ); 7) suero + papaína + tripsina + quimiotripsina (PQT); y 8) suero sin tratar (C). Una vez que los sueros se digirieron con las proteasas solas o en combinación se evaluó el peso molecular de las proteínas séricas. Debido a que un decremento en el peso molecular nos indica de manera indirecta si una proteína ha sido cortada por alguna de las proteasas, este parámetro fue utilizado como sinónimo de integridad proteica. Las imágenes de los geles se analizaron mediante el programa ImageJ, el cual evalúa las intensidades de las bandas de cada carril y las representa como trazos densitométricos,

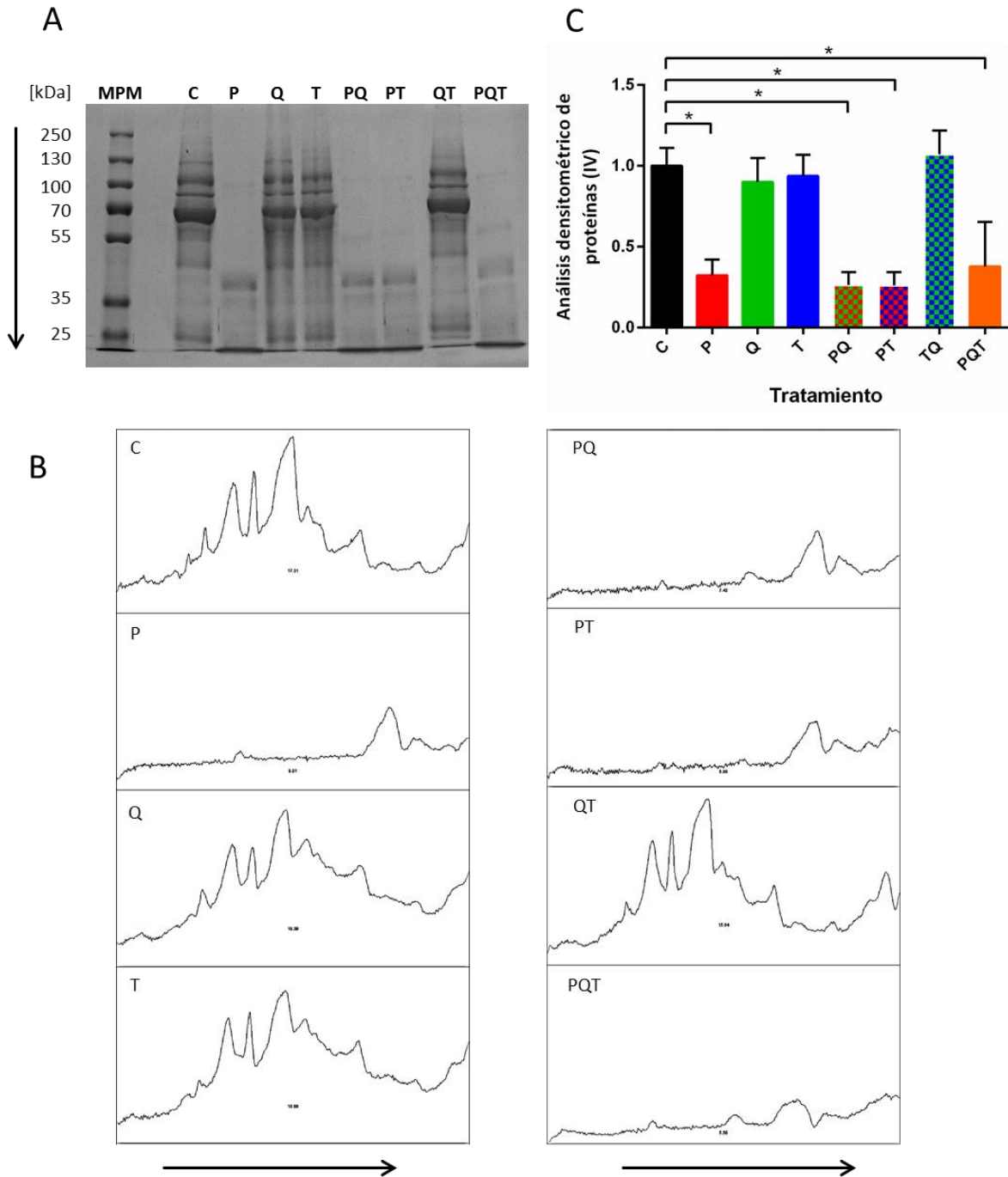
como se muestra en las Figuras 9B y 10B. Para analizar la integridad de las proteínas, se seleccionó el carril completo, se obtuvieron los trazos densitométricos y posteriormente se seleccionó el área bajo la curva. Los análisis estadísticos se hicieron sobre estos datos.



**Figura 9. Degradación de proteínas de suero de sujetos sanos. (A)** Imágenes representativas de gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) de C: Suero control, y tratados con P: papaína (0.31 mg/mL), Q: quimiotripsina (0.125 mg/mL) y T: tripsina (0.125 mg/mL). **(B)** Imágenes representativas de los trazos densitométricos. **(C)** Análisis de las densitometrías de los gels, Tukey's test  $*p < 0.0004$ . IV: Incremento en veces.



En los sujetos sanos observamos que los grupos tratados con T, Q y TQ no hay cambios en los niveles de proteínas y no existe una diferencia significativa con respecto al control (Figura 9C). Sin embargo, en cualquiera de los grupos donde se adicionó papaína



**Figura 10. Degradación de proteínas de suero de pacientes con cáncer. (A)** Imágenes representativas de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de C: Suero control, y tratados con P: papaína (0.31 mg/mL), Q: quimiotripsina (0.125 mg/mL) y T: tripsina (0.125 mg/mL). **(B)** Imágenes representativas de los trazos densitométricos. **(C)** Análisis de las densitometrías de los geles, Tukey's test \* $p < 0.0001$ . IV: Incremento en veces.

(P, PQ, PT o PQT), se encontró una disminución significativa en la integridad de las proteínas séricas de más del 50% en comparación al control (Figura 9C). En el gel de la Figura 9A se observa la desaparición de bandas de alto y mediano peso molecular y la aparición e incremento de bandas de menor peso, lo cual se corroboró en los trazos densitométricos (Figura 9B). Se realizó también una prueba de Anova y de Tukey y se encontró que sólo los grupos P, PQ, PT y PQT presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.004$ ) con respecto al control y al comparar los cuatro tratamientos entre ellos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 7).

En el grupo de pacientes con cáncer de mama, se encontró el mismo efecto observado en los sujetos sanos. Así, los grupos T, Q y TQ no muestran cambios importantes en los niveles de proteínas; pero en los grupos P, PQ, PT y PQT hay una disminución de más del 60% en la integridad de las proteínas con respecto al control (Figura 10A), lo cual se corroboró en los trazos densitométricos (Figura 10B). Se realizaron las mismas pruebas estadísticas (Anova y Tukey) y se encontró que los grupos P, PQ, PT y PQT presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) con respecto al control, mientras que entre ellos no hay diferencias significativas (Figura 10C y Anexo 7).

En resumen, la combinación de enzimas que tienen un mayor efecto sobre la concentración de proteínas séricas *in vitro* tanto de personas sanas como de pacientes con cáncer de mama, son los sueros tratados con P, PQ, PT y PQT.

## **Degradación de exDNA y proteínas séricas *in vivo***

Una vez que se demostró que el tratamiento con proteasas y DNasa I disminuye los niveles de exDNA y afecta la integridad de las proteínas séricas *in vitro*; se decidió analizar y evaluar el efecto de esta mezcla enzimática pero en un modelo *in vivo*, utilizando los mismos parámetros: exDNA y proteínas séricas.

Para ello se utilizaron ratas Wistar sanas y con tumores generado con la línea celular C6. En las ratas sanas el nivel promedio de exDNA detectado antes del tratamiento fue de 9.7 ng/mL; 7.5 minutos después de la administración de las enzimas el promedio del exDNA bajó a 9 ng/mL; a los 15 minutos disminuyó aún más, alcanzando el valor más bajo de 5 ng/mL (disminución del 48% con respecto al control); a los 30 minutos subió a 8 ng/mL y a la hora alcanzó los 7 ng/mL (Figura 11A). Se realizó una prueba de Anova seguido de una prueba de Dunnett y se encontraron diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en todos los grupos (Anexo 8).

En las ratas con tumor, la concentración promedio de exDNA antes del tratamiento fue de 11.8 ng/mL (Figura 11B); a los 7.5 min después de la administración de las enzimas la concentración disminuyó hasta un 79% con respecto al control (2.5 ng/mL); a los 15 min subió a 9 ng/mL; a los 30 min llegó a los 11 ng/mL y a los 60 min el promedio fue de 10 ng/mL. Se realizaron los mismos análisis estadísticos y se encontraron diferencias

significativas en los grupos de 7.5 y 15 minutos comparados con el control ( $p < 0.011$ ); sin embargo, en los grupos de 30 y 60 minutos no hubo diferencia significativa (Anexo 8).

En resumen, se demostró que al administrar la mezcla enzimática hay una disminución en los niveles de exDNA *in vivo* tanto en el grupo de animales sin tumor como el grupo con tumor.

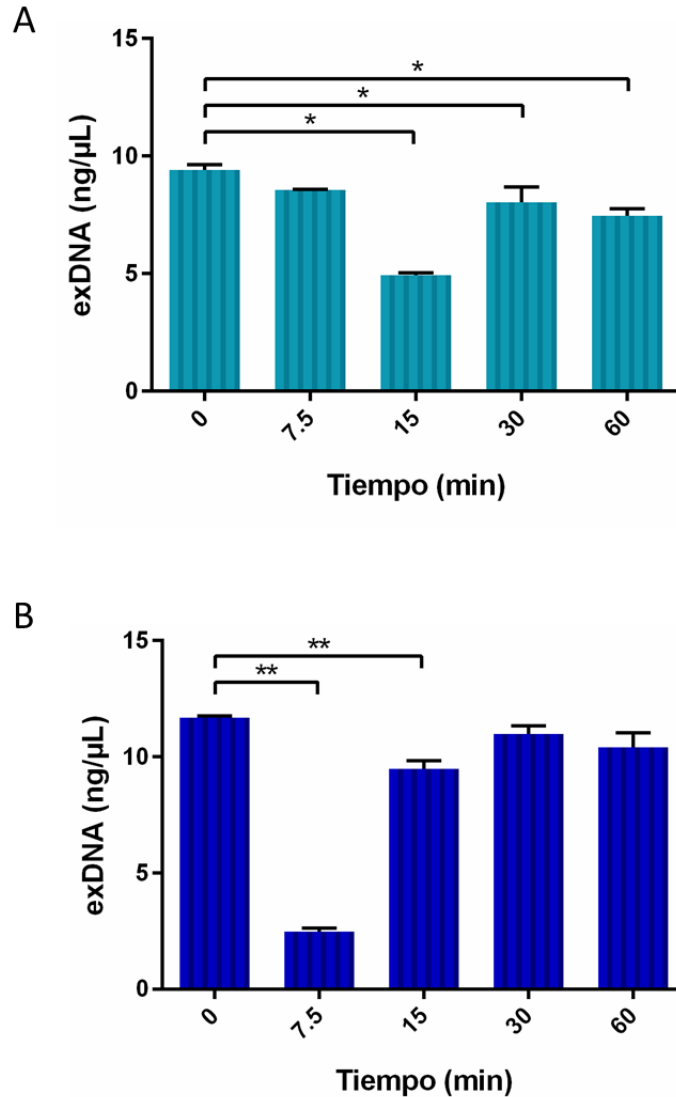
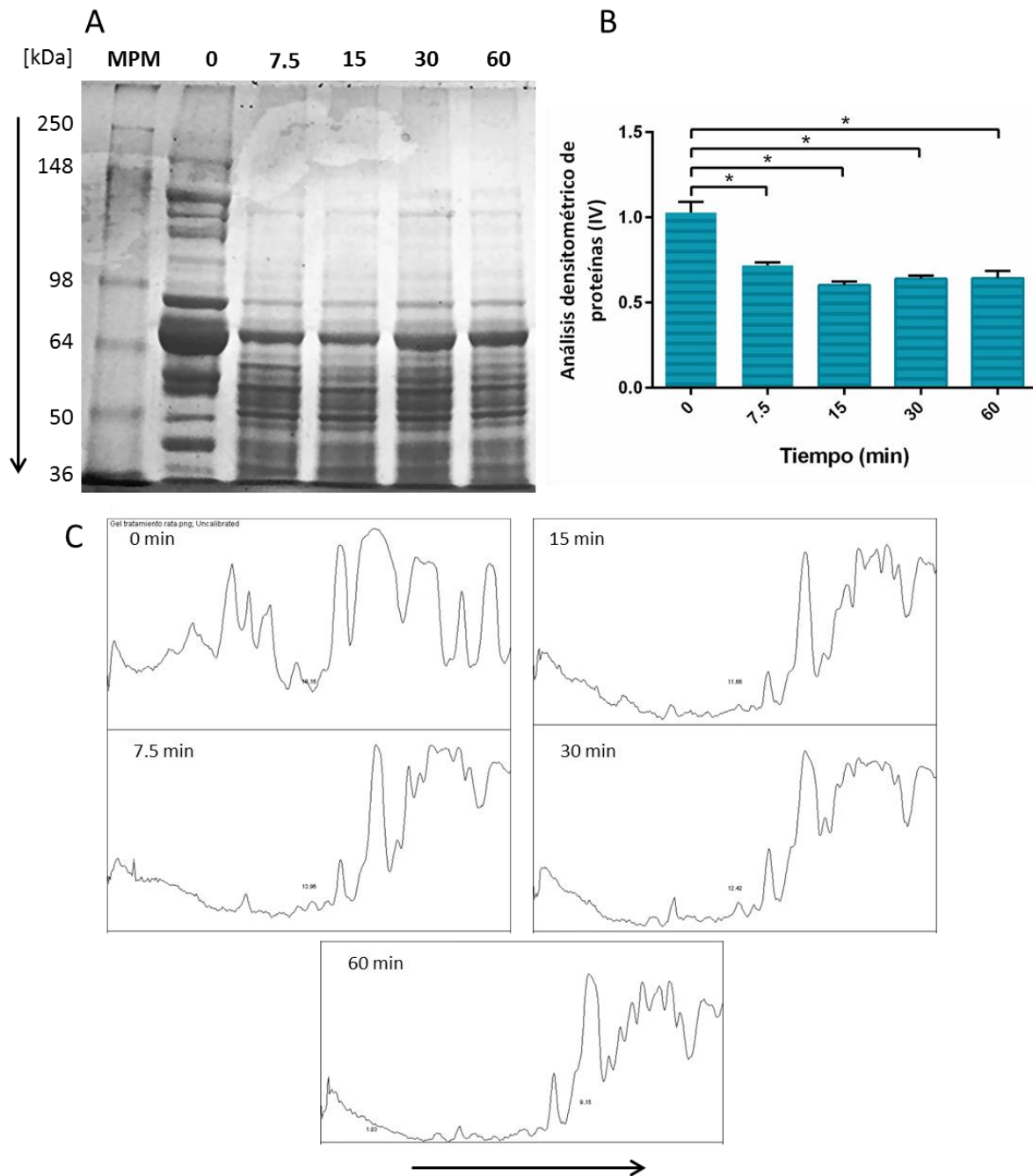


Figura 11. Concentración de exDNA en el suero de ratas Wistar normales (A) y con tumor (B) tratadas con la mezcla de enzimas. Papaína (25 mg/kg) + tripsina (10 mg/kg) + quimiotripsina (10 mg/kg) + DNasa I (2.3 mg/kg). Las muestras de sangre se tomaron a cuatro intervalos diferentes de tiempo después del tratamiento. 0: Concentración de exDNA antes del tratamiento. Dunnett's test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.011$ .

Con respecto a las proteínas, en la Figura 12A se muestra un gel de poliacrilamida representativo de las proteínas séricas de las ratas normales y en la Figura. 12C los



**Figura 12. Degradación de proteínas de suero de ratas Wistar sin tumor tratadas con la mezcla de enzimas. Papaína (25mg/kg) + tripsina (10mg/kg) + quimiotripsina (10mg/kg) + DNasa I (2.3mg/kg). Las muestras de sangre se tomaron a cinco diferentes intervalos de tiempo después del tratamiento. 0: Suero control sin tratar. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). B) Imágenes representativas de los trazos densitométricos. C) Análisis de las densitometrías de los gels, Dunnett's test  $*p < 0.0001$ . IV: Incremento en veces.**

resultados de la densitometría del mismo, lo cual se corroboró en los trazos densitométricos (Figura 12B). Como se observa, después del tratamiento hubo una disminución en la integridad de las proteínas séricas con respecto al control; a los 7.5 minutos hay una reducción promedio del 30%, a los 15 min del 40%, a los 30 min del 37% y a los 60 min del 36%. El valor más bajo de proteínas séricas se detectó a los 15 minutos. Se realizó una prueba de Anova seguido de una prueba de Dunnett para todos los valores y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos con respecto al control ( $p < 0.0001$ ) (Anexo 9).

## **Efecto antitumoral del tratamiento en un modelo *in vivo***

Una vez que se evaluó el efecto del tratamiento enzimático sobre los niveles de exDNA y en proteínas séricas tanto *in vitro* como *in vivo*, se procedió a determinar si este tratamiento tiene algún efecto sobre el crecimiento tumoral. Para ello se utilizaron ratones BALB/c (nu/nu) a los cuales se les inoculó por vía subdérmica, la línea celular de carcinoma de colon humano (SW480) y después de 28 días que ya había desarrollado tumor, se formaron 4 grupos de 6 animales cada uno y se les aplicó diferentes combinaciones del tratamiento enzimático: Grupo 1) papaína + quimiotripsina + tripsina (PQT); Grupo 2) DNasa I (D); Grupo 3) papaína + quimiotripsina + tripsina + DNasa I (PQTD) y Grupo 4) el grupo control (C).

La administración fue diaria durante 63 días utilizando la dosis descrita en Materiales y Métodos para cada enzima (papaína 25 mg/kg, tripsina 10 mg/kg, quimiotripsina 10 mg/kg y DNasa I 2.3 mg/kg). Cada semana los animales se pesaron y se les evaluó el tamaño tumoral.

En la gráfica de la Figura 13 se muestra que el grupo control creció hasta alcanzar un volumen final promedio de 770 mm<sup>3</sup>. Mientras que en los grupos PQT y D se observó que los tumores crecieron más que el control sin embargo, al final del experimento el volumen tumoral promedio de ambos grupos fue similar al del control y muy parecido entre ellos (751 y 752 mm<sup>3</sup> respectivamente). De manera importante, el grupo de ratones tratados con todas las enzimas (PQTD), presentó una disminución en el tamaño tumoral, efecto mayormente visible desde los 42 días y el grupo finalizó con un volumen tumoral promedio de 219 mm<sup>3</sup>. Al realizarse las pruebas estadísticas pertinentes entre el grupo control y los grupos con tratamiento, sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.0118$ ) en el grupo con la mezcla de las 4 enzimas (PQTD) (Anexo 10).

En la Figura 14 se muestran las fotos representativas de los animales de cada uno de los grupos de estudio, en las cuales se observan claramente las diferencias en el tamaño tumoral entre cada grupo. Cabe destacar que en el grupo tratado con todas las enzimas (PQTD), el resultado del tratamiento fue muy importante; ya que 8 de los 12 animales, es decir el 67%, presentaron una reducción en el tamaño tumoral al final del tratamiento; y en los 4 animales restantes (33%) el tumor fue eliminado (Tabla 2); resultados que fueron confirmados por el análisis histológico, el cual mostró que la respuesta histopatológica fue

completa. También es importante mencionar que la eficiencia en el desarrollo tumoral fue del 100% y que el peso de los animales no fue afectado por el tratamiento, ya que los pesos basales y finales del grupo control fueron  $27.73 \pm 2.2$  g y  $28.2 \pm 2.97$  respectivamente mientras que los pesos basales y finales del grupo PQTD, fueron de  $26.82 \pm 2.99$  y  $26.36 \pm 2.29$  g respectivamente (Tabla 3).

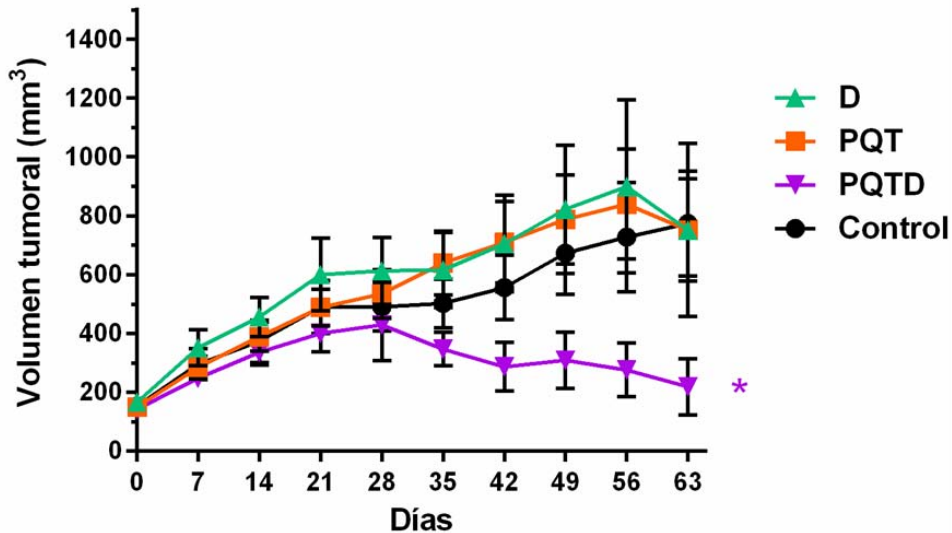


Figura 13. Efecto antitumoral del tratamiento enzimático en ratones atímicos. Se muestra el efecto que tiene el tratamiento de la mezcla de enzimas (papaína, tripsina, quimiotripsina y DNasa I) sobre el crecimiento tumoral. T student test  $*p < 0.012$

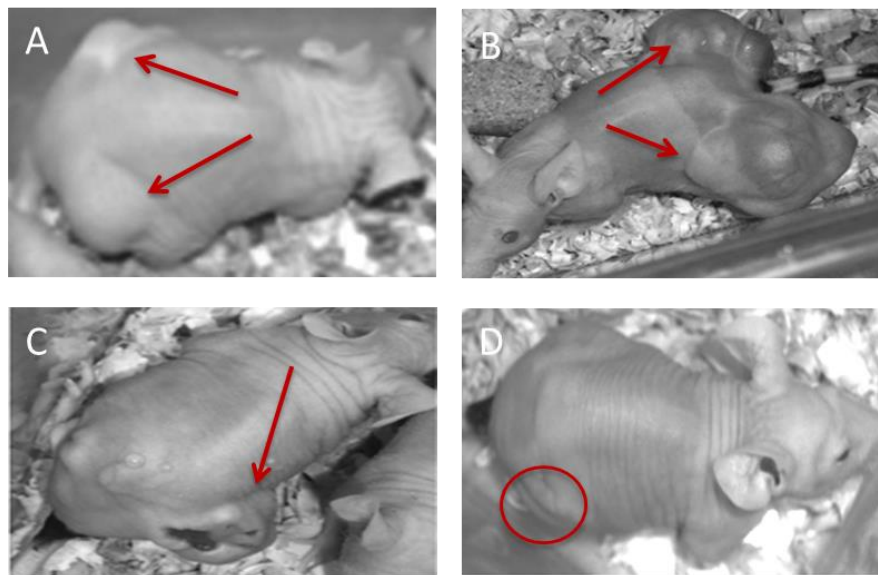


Figura 14. Potencial antitumoral del tratamiento enzimático. Imágenes representativas del desarrollo tumoral en los diferentes grupos. Las flechas rojas señalan los tumores mientras que el círculo rojo muestra el sitios donde se observó regresión tumoral. A: Control positivo (SW480), B: SW480 + proteasas, C: SW480 + DNasa I, D: SW480 + proteasas + DNasa I.

**Tabla 2. Efecto antitumoral del tratamiento enzimático.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Animales Inoculados</b>	<b>Eficiencia</b>	<b>Animales con Reducción Volumen Tumoral</b>	<b>Animales con Eliminación tumor*</b>
SW480	12	100%	0/12 (0%)	0/12 (0%)
SW480 + Proteasas	12	100%	0/12 (0%)	0/12 (0%)
SW480 + DNasa I	12	100%	0/12 (0%)	0/12 (0%)
SW480 + Proteasas +DNasa I	12	100%	8/12 (66%)	4/12 (33%)

\*Evaluación histopatológica

**Tabla 3. Peso de los animales al inicio y final del tratamiento**

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso Inicial</b>	<b>Peso Final</b>
SW480	27.73±2.20	28.2±2.97
SW480 + Proteasas	27.67±2.61	29.09±4.18
SW480 + DNasa I	27.0±2.37	28.91±2.30
SW480 + Proteasas +DNasa I	26.82±2.99	26.36±2.29

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran datos relevantes e interesantes sobre el exDNA, su implicación en el cáncer y su eliminación como estrategia antitumoral.

Dado que la mayoría de la literatura sugiere que el exDNA tiene un papel importante en la progresión tumoral, además de los resultados que obtuvimos en el trabajo anteriormente publicado (Trejo-Becerril *et al.* 2012), llegamos a la conclusión de que el exDNA podría ser un blanco terapéutico. En este trabajo propusimos el uso de dos grupos de enzimas para la degradación de este complejo: 1) proteasas (papaína, tripsina y quimiotripsina) que tendrían como objetivo la degradación de las proteínas asociadas al exDNA y 2) DNasa I que tendría como blanco al exDNA.

La idea de usar enzimas como fármacos está fundada en dos características importantes de éstas moléculas: primero, las enzimas se unen y actúan en sus blancos con gran afinidad y especificidad y segundo, son catalizadores que convierten múltiples moléculas blanco en productos deseados. Todo esto las convierte en drogas específicas y potentes que pueden lograr lo que otros compuestos no pueden (Vellard 2003). El concepto de combinar proteasas se basa en que la actividad proteolítica resultante de cada enzima son mutuamente aditivas (Steffen and Menzel 1985). Asimismo, podemos trabajar con estas cuatro enzimas y asegurar su estabilidad porque está documentado que la DNasa I normalmente es secretada al ducto pancreático junto con altas concentraciones de enzimas digestivas sin que ésta sea dañada (Dayan 1994) y porque las secuencias de aminoácidos de todas las enzimas usadas en el trabajo, no contienen sitios de corte para ninguna de las proteasas empleadas (Swiss Institute of Bioinformatics 2016).

En los experimentos mostrados en este trabajo, si bien el tratamiento con DNasa I disminuyó *in vitro* levemente los niveles de exDNA en algunos casos, cuando se analizan los datos de manera individual, no produjo una diferencia significativa en los niveles de DNA en el suero de personas y pacientes con cáncer de mamá (Figura 8). Sin embargo, la administración conjunta de DNasa I y proteasas disminuyó de manera significativa estos niveles. Algo que llamó la atención fue que el grupo tratado únicamente con proteasas fue capaz de disminuir de manera significativa los niveles de exDNA, inclusive más aún que en el grupo tratado con sólo DNasa I (Figura 8). Aunque este resultado parece contradictorio, se explica de la siguiente manera: se sabe que en el plasma y en el suero humano, hay DNasa I y que ésta presenta una actividad catalítica que varía entre los 0.013 y 0.766 U/mL (Tamkovich *et al.* 2006; Cherepanova *et al.* 2008). Dado que el suero que se trató *in vitro* se inactivó hasta después de la incubación con las enzimas, sugerimos que probablemente el tratamiento con proteasas pudo haber liberado al exDNA protegido por algunas proteínas, haciéndolo accesible a la DNasa endógena del suero lo degradase. Así que los resultados de este experimento sugieren fuertemente que el exDNA se encuentra en un complejo DNA-proteínas. Algo similar se encontró en el trabajo de Trejo-Becerril, ya que demostró que el exDNA de sobrenadante tampoco fue digerido totalmente por DNasas, sino que también fue necesario el uso de proteinasa K



para que fuera eliminado por completo. La existencia de un complejo DNA-proteína también explicaría la resistencia a degradación por nucleasas endógenas que algunos grupos han reportado (Vlassov, Laktionov *et al.* 2007; Rykova *et al.* 2012).

A pesar de que la naturaleza del exDNA es cada vez más clara, todavía se desconoce la composición proteica del complejo que lo protege ya que las fuentes de éste son diversas. Se ha propuesto que el exDNA proviene de cuerpos apoptóticos (Holmgren *et al.* 1999; Bergsmedh *et al.* 2001; Samos *et al.* 2006), necrosis (Jahr *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; García-Olmo *et al.* 2008), diversas vesículas extracelulares en las que se incluyen microvesículas, exosomas y virtosomas (Gahan and Stroun 2010; Rykova *et al.* 2012; Cai *et al.* 2013, 2014; Minciacchi *et al.* 2015) e inclusive de neutrófilos que secretan DNA en forma de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Cools-Lartigue *et al.* 2014; Hawes *et al.* 2015). Debido a que la naturaleza de cada uno de estos complejos es diferente, no ha sido posible determinar a los componentes proteicos que se encuentran protegiendo al DNA. Lo único en lo que sí hay consenso, es que este complejo DNA-proteínas transita por el torrente sanguíneo, por lo que las proteínas asociadas al exDNA deben de encontrarse en el suero/plasma. Así que el siguiente paso fue evaluar el efecto que la mezcla de proteasas tuvo sobre el suero de pacientes con cáncer de mama y sujetos sanos *in vitro*.

Encontramos que los grupos tratados con papaína, redujeron de manera significativa la integridad de las proteínas del suero, mientras que los grupos tratados sólo con tripsina o Quimiotripsina, no las disminuyeron. Es posible que este efecto se deba a dos razones. La primera causa es que los sitios de corte de la papaína son menos restrictivos y más diversos que los de la tripsina y la quimiotripsina (Anexo 1), lo que da como resultado que la papaína corte de manera más eficiente a un mayor número de proteínas. Sin embargo, la razón más importante es que la tripsina y la quimiotripsina interaccionan principalmente con dos inhibidores proteicos denominados Alfa 1 anti-tripsina ( $\alpha$ -1-AT) y Alfa 2 Microglobulina ( $\alpha$ -2-M), de tal manera que la mayoría de su actividad proteolítica es inhibida (Wald 2008), efecto que desaparece cuando el suero es inactivado previamente a la incubación con las proteasas (Anexo 2).

Una vez que se probó que la administración de este grupo de enzimas disminuye los niveles de exDNA y a las proteínas séricas *in vitro*, se decidió evaluar su efecto *in vivo*. Para ello se administró una dosis única de las cuatro enzimas y se evaluaron las variaciones de estos parámetros con el tiempo. Observamos que el efecto *in vivo* (Figura 11 y 12) es similar al observado *in vitro* (Figura 9 y 10); es decir, la administración intravenosa de la DNasa I, la papaína, la tripsina y la quimiotripsina, disminuyó la concentración del exDNA y la de las proteínas séricas. Sin embargo, el efecto de la DNasa I fue momentáneo, ya que hubo un restablecimiento en los niveles del exDNA a los 30 min; mientras que el efecto de las proteasas sobre las proteínas séricas se mantuvo al menos hasta los 60 minutos después de la administración de las proteasas (Figura 12).

En un estudio en el que se administró DNasa I recombinante (rhDNasa) a humanos con lupus en dosis menores a las que se utilizó en nuestro estudio (25 o 125  $\mu$ g/kg),

encontraron que la vida media de esta enzima fue de 3-4 horas y que durante periodos substanciales de tiempo se alcanzaban concentraciones séricas iguales o mayores a 40-100 ng/mL que se sabe tienen actividad hidrolítica (Davis *et al.* 1999). Además se conoce que la vida media biológica de las tres proteasas después de su reabsorción (vía oral) es relativamente larga (12-20 horas para la tripsina) y aunque en torrente sanguíneo se encuentren unidas a sus inhibidores, se sabe que pueden liberarse y mantenerse activas durante un periodo corto de tiempo o bien mantenerse unidas a la antiproteasa y trabajar por un tiempo relativamente largo (Kolac, Streichhan, and Lehr 1996). Por lo que es posible sugerir que ambas enzimas se encontraban activas en el suero de los animales y ayudaron a degradar el exDNA y algunas proteínas del suero. No obstante, es necesario realizar estudios de Farmacocinética y de Biodistribución que apoyen esta sugerencia y arrojén más datos sobre la dinámica de las enzimas.

Una vez probado que este tratamiento disminuye el exDNA que está en suero, se evaluó si la administración de estas enzimas tenía un efecto anti-tumoral y lo que se encontró fue notable. De los animales que recibieron DNasa I, papaína, tripsina y quimiotripsina un 66% mostró una disminución en el tamaño tumoral y en la mitad de ellos no se detectaron células tumorales al final del experimento (Figura 13) hallazgo corroborado posteriormente por pruebas histopatológicas. Es importante mencionar que este efecto no se debió a la involución espontánea de los tumores ya que los 48 animales utilizados en este experimento desarrollaron tumores después de la implantación de las células cancerosas. Ni el tratamiento con las proteasas ni con la DNasa I por sí sola logró disminuir el tamaño tumoral, lo que indica que la combinación de ambos grupos de enzimas es la responsable de la disminución del tamaño tumoral y por ende, ambas enzimas tienen blancos importantes que evitan el desarrollo de este cáncer.

Desde la década de los sesentas se descubrió que la DNasa I tiene efectos anti-tumorales y desde entonces un gran número de estudios han corroborado sus efectos anticancerígenos. Se ha reportado que la administración de DNasa I a cultivos de células cancerosas disminuye su viabilidad, proliferación y capacidad de migración e invasión (Alcázar-Leyva *et al.* 2009; Wen *et al.* 2013). Por otra parte, la administración sistémica de DNasa I en ratones con distintos tipos de cáncer, ha dado como resultado una disminución en la proliferación de células malignas, así como un aumento del tiempo de supervivencia de los animales y una importante disminución en el número de metástasis (De Lamirande 1961; Salganik *et al.* 1967; Sugihara *et al.* 1990, 1993; Shklyayeva *et al.* 2007; Patutina *et al.* 2010, 2011; Wen *et al.* 2013; Cools-Lartigue and Spicer 2013). A pesar que los resultados de cada uno de estos experimentos son similares, en la mayoría de ellos se desconocía cuál era el mecanismo de acción de la enzima. No es hasta 2010 que Patutina propone que el efecto antitumoral de la DNasa I está dado por la eliminación del DNA extracelular.

En el caso de la tripsina, quimiotripsina y papaína también hay un gran número de publicaciones en las que se ha observado que tienen efectos antitumorales. Entre 1900 y 1910 se puede encontrar que en al menos 13 publicaciones se reportó la eficiencia del uso de las enzimas pancreáticas en diversos tumores (Beuth 2008). Asimismo, se

observó que la administración rectal de 25 mg/kg papaína, 10 mg/kg tripsina y 10 mg/kg quimiotripsina (dosis empleadas en nuestros experimentos) en ratones con melanoma, aumentó su supervivencia e inhibió el desarrollo de metástasis (Wald, Zavadová, et al. 1998). El mismo tratamiento aplicado a ratones con carcinoma de pulmón de Lewis disminuyó el número de metástasis, aumentó tanto el tiempo como la tasa de supervivencia y modificó la expresión de algunas proteínas de adhesión (Wald, Olejár, et al. 1998; Wald et al. 2001) y en otro trabajo también retardó el crecimiento de un adenocarcinoma pancreático humano trasplantado a un ratón inmunodeficiente (Wald et al. 1999). Por otra parte se observó que el tratamiento *in vitro* de varias líneas celulares cancerosas con tripsina y quimiotripsina inhibe su proliferación y metabolismo, disminuye su supervivencia y abole la migración celular (Novak and Trnka 2005; Elzer et al. 2008). Además, la administración *in vivo* de tripsina y amilasa en ratones con melanoma y tumores inducidos por metilcolantreno incrementó la supervivencia y propició la generación de péptidos angiostáticos (Novak and Trnka 2005). Estas enzimas también han demostrado tener efectos positivos en estudios clínicos al administrarse junto con las terapias estándar recomendadas. En un grupo de pacientes con cáncer de mama la incidencia de efectos secundarios fue menor y el tiempo de remisión fue más largo (Beuth et al. 2001), en otro estudio con cáncer de colon encontraron resultados similares (Popiela et al. 2001) y en un grupo de pacientes con mieloma múltiple observaron un incremento en el tiempo de remisión y el tiempo medio de supervivencia (Sakalová et al. 2001).

Es cierto que el uso de proteasas en el tratamiento de cáncer puede llegar a ser controversial, ya que se sabe que las metaloproteinasas (MMP) y otras proteasas se encuentran sobre-expresadas en cáncer y parecen ser importantes para la invasión a tejidos cercanos y para el desarrollo de metástasis (Hanahan and Coussens 2012; Klemm and Joyce 2015). Sin embargo, también es cierto que los fármacos inhibidores de MMPs tales como Marimastat y Batimastat dieron resultados pobres en pruebas preclínicas o bien tenían efectos altamente tóxicos en los pacientes (Rothenberg, Nelson, and Hande 1999; Sparano et al. 2004). Más preocupante aún, fue el resultado de dos pruebas en las que se usó Tanomastat, otro inhibidor de MMP, ya que los estudios tuvieron que detenerse precipitadamente porque los pacientes que recibían el inhibidor, mostraban una supervivencia significativamente más baja que la de los pacientes que recibieron el placebo. Ahora se sabe que el papel de las MMPs es más complejo, ya que también participan en un número importante de procesos “normales” como la escisión-liberación de receptores y activación-inactivación de citocinas y quimiocinas, por lo que su inhibición podría afectar algunos procesos de defensa en el huésped que controlan el crecimiento tumoral (Smyth 2003). Por ejemplo, se ha propuesto que la tripsina podría tener un efecto antitumoral ya que se ha visto que en tejidos humanos cancerosos hay una disminución en su expresión ligada a la hipermetilación de su promotor (Yamashita et al. 2003). Asimismo se sabe que algunas proteasas de cisteína que se originan en plantas, como la bromelina o la fastuasina, tiene efectos anti-inflamatorios y anti-tumorales (Zavadová, Desser, and Mohr 1995; Desser et al. 2001; Guimarães-Ferreira et al. 2007). Dados estos descubrimientos, es razonable deducir que la actividad de proteasas podría tener influencia en vías de regulación necesarias para la homeostasis del organismo.

Nuestros resultados apoyan todos los reportes en los que se ha encontrado que la administración de DNasa I, papaína, tripsina y quimiotripsina tiene efectos antitumorales, sin embargo, hay que hacer énfasis que en nuestro modelo ninguna de las enzimas por sí solas mostraron tener efecto sobre el crecimiento tumoral a pesar de que las dosis usadas fueron similares a la de algunos trabajos aquí presentados (Wald, Olejár, *et al.* 1998; Wald *et al.* 1999, 2001; Patutina *et al.* 2010, 2011; Shklyueva *et al.* 2007; Cools-Lartigue and Spicer 2013); sino que el mayor efecto antitumoral ocurrió bajo la administración de las cuatro enzimas. Estas diferencias podrían deberse al modelo experimental por sí mismo, ya que se utilizan ratones desnudos inoculados con células cancerosas humanas, o bien porque la ruta de administración que utilizamos (intravenosa) logró una mayor concentración de enzimas en suero que la conseguida en los otros reportes (administración subcutánea o rectal).

Trejo-Becerril observó que el sobrenadante de células SW480 tratado con DNasa I y proteinasa K evitó la transformación de células iniciadas y la formación de tumores cuando éstas eran inoculadas en ratones inmunocompetentes. De igual forma, sus experimentos sugirieron que la administración intramuscular de la DNasa I e intraperitoneal de la papaína, tripsina y quimiotripsina disminuye la formación de tumores (Trejo-Becerril *et al.* 2015). A pesar de que se apuntaba al exDNA como el principal causante, se necesitaba demostrar que el tratamiento disminuía los niveles de exDNA y proteínas asociados a éste en circulación. Este trabajo logró mostrar que el tratamiento con estas enzimas puede disminuir los niveles de exDNA y proteínas del suero, sin embargo, todavía queda muchas preguntas sobre el mecanismo de estas enzimas y más aún sobre el del exDNA en la progresión tumoral. Por ello tomando en cuenta los reportes consultados durante la elaboración de esta tesis y los resultados obtenidos en la misma, planteo dos procesos que podrían estar ocurriendo en el modelo de los ratones desnudos tratados con las cuatro enzimas.

### **1) Inhibición de transferencia horizontal**

Actualmente se sabe que los pacientes con cáncer tienen un incremento en sus niveles de exDNA y que parte de este DNA que se encuentra en circulación contiene secuencias mutadas de DNA que provienen muy posiblemente del tumor primario (Kopreski *et al.* 1997; Jahr *et al.* 2001; Anker, Mulcahy, and Stroun 2003; Diehl *et al.* 2008; Guadalajara *et al.* 2008; Holdenrieder *et al.* 2008; Gahan 2010; Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011; Mittra 2015; Ocaña *et al.* 2016). Aunque el mecanismo por el cual este exDNA llega a la circulación es incierto, varios autores han sugerido que proviene de células cancerosas y que éste tiene la capacidad de transferirse al núcleo de células susceptibles, en muchos casos promoviendo su transformación (Anker *et al.* 1994; García-Olmo 1999; Holmgren *et al.* 1999; Bergsmedh *et al.* 2001; García-Olmo *et al.* 2010; González-Masiá *et al.* 2011). En este trabajo se demostró que la administración de DNasa I y otras enzimas, disminuyó los niveles de exDNA y proteínas séricas. Por ello, sugerimos que en nuestro modelo, la disminución en los niveles de exDNA y de proteínas asociadas a éste por la administración diaria de las enzimas, podría haber interferido con la

transferencia horizontal de secuencias oncogénicas y la transformación subsecuente de otras células. Este mecanismo también podría explicar el decremento de la tasa de crecimiento del tumor y su subsecuente desaparición (Figura 13 y Tabla 2). Esta idea es apoyada por los trabajos de Laktionov en el que observó que el tratamiento con tripsina inhibe la incorporación de ácidos nucleicos por las células (Laktionov *et al.* 1999) y el de Trejo-Becerril en el cual se demostró que la administración sistémica de las cuatro enzimas en un modelo de ratas inmunocompetentes tratadas con el carcinógeno DMH, inoculadas con la misma línea celular (SW480) o bien con ambos, disminuyó de manera importante el número de metástasis (Trejo-Becerril *et al.* 2012).

Para darle más bases a estos argumentos, utilizando el mismo modelo y esquema de administración de enzimas de este trabajo, sería interesante obtener muestras de sangre a lo largo del tratamiento y evaluar lo que sucede con los niveles de exDNA. También sería conveniente evaluar mediante PCR cuantitativo la presencia de secuencias mutantes específicas de la línea celular inoculada en los animales y verificar si también hay una disminución en los niveles de éstas en sangre. Debido a que en nuestros experimentos solo se evaluó el efecto del tratamiento en el tamaño del tumor primario, sería interesante evaluar los niveles de proteínas séricas, exDNA y secuencias tumor-específicas en un modelo de metástasis, ya que se ha observado que los efectos de la DNasa I son más importantes en el desarrollo de metástasis que a nivel del tumor primario y también por los trabajos que sugieren una relación entre niveles de exDNA en pacientes y desarrollo de metástasis.

## **2) Regulación en la actividad de neutrófilos**

La presencia de NETs (Trampas Extracelulares de Neutrófilos) en cáncer se ha asociado recientemente a una pobre prognosis (Berger-Achituv *et al.* 2013; Uribe-Querol and Rosales 2015). Los mecanismos mediante los cuales se ha propuesto que las NETs promueven la progresión tumoral son muchos incluidos la evasión del sistema inmune, un incremento en la adhesión de células tumorales, el aumento en la proliferación celular y el desarrollo de la angiogénesis (Demers *et al.* 2012; Cools-Lartigue *et al.* 2014; Hawes *et al.* 2015; Kim and Bae 2016). Es ampliamente aceptado que en ausencia de bacterias, la formación de NETs es causada por algunas citocinas como el IL-8 y el TNF (Uribe-Querol and Rosales 2015), por lo que la eliminación de estas moléculas también resulta en la inhibición de la producción de NETs. En este sentido es importante el descubrimiento de Wen, en el que (al igual que nosotros) encontró que la administración de DNasa I disminuye los niveles de exDNA (posiblemente provenientes de NETs), así como la producción de IL-8 a nivel RNAm y proteína (Wen *et al.* 2013). Dados estos hallazgos y a que está reportado que en ratones nu/nu hay un mayor número de neutrófilos activos en comparación con los ratones inmunocompetentes (Hazlett and Berk 1978), es muy posible que en nuestro modelo la administración sistémica de DNasa I podría estar 1) destruyendo los NETs que se encuentran en circulación

y en el tumor, 2) evitando la producción *de novo* de las mismas y 3) evitando el desarrollo del tumor primario. Esta hipótesis es apoyada por los experimentos de Cools-Lartigue en los que mostró que los efectos antitumorales logrados por la DNasa I eran muy similares a los obtenidos con la administración de inhibidores de formación de NETs (Cools-Lartigue and Spicer 2013).

A pesar de que las NETs tienen una influencia positiva sobre los tumores, la presencia de neutrófilos no siempre es asociada a una pobre prognosis; de hecho recientemente se han identificado dos grupos de neutrófilos asociados a tumores (TANs), la población N1 que muestra funciones antitumorales y la población N2 que exhibe actividad pro-tumoral (Kim and Bae 2016). Aunque las señales que llevan a un grupo u otro de neutrófilos a tener alguno de los dos fenotipos son todavía desconocidas, se ha observado que la ausencia de TGF- $\beta$  aumenta el reclutamiento de neutrófilos con una mayor actividad citotóxica hacia los tumores, mientras que su presencia favorece el reclutamiento de la población N2 (Fridlender *et al.* 2009). Entonces, ya que los neutrófilos son importantes en la estimulación de otros linajes celulares como los macrófagos y linfocitos T, la disminución en los niveles de TGF- $\beta$  daría lugar a la activación del sistema inmune para la eliminación del tumor. A este respecto, es interesante hacer notar el efecto que tiene la administración de papaína, tripsina y quimiotripsina sobre los niveles de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 en pacientes con cáncer (Desser *et al.* 1997, 2001). Se sabe que estas proteasas se unen en suero a su inhibidor y se producen complejos  $\alpha$ -2-M-proteasa que tienen una gran capacidad para unirse e inactivar de manera irreversible a varias citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  (Lauer *et al.* 2001; Wald *et al.* 2001), disminuyendo el estado de inflamación sistemático. Otro efecto interesante de la administración de estas enzimas es que además tienen efectos sobre varias células del sistema inmune, ya que se ha visto que tienen la capacidad de estimular la capacidad citotóxica de los neutrófilos (Závadová *et al.* 1995) y acelerar la maduración *in vitro* de las células dendríticas en pacientes con cáncer de ovario (Závadová *et al.* 2001).

Con base en los reportes, se sugirió que la administración las proteasas también podría estar teniendo un efecto en el microambiente tumoral disminuyendo la inflamación general y promoviendo la activación del sistema inmune contra el tumor en desarrollo. Sin embargo, esta propuesta está sustentada sobre lo reportado en la literatura, por lo que sería necesario evaluar la concentración de citocinas y presencia de NETs en el tumor primario antes, durante y después del tratamiento con estas enzimas para darle mayor solidez a estos argumentos.

Si bien se considera a las NETs como una fuente de DNA extracelular (Cools-Lartigue and Spicer 2013; Wen *et al.* 2013; Cools-Lartigue *et al.* 2014), en éste caso específico es independiente del primer mecanismo propuesto, ya que el papel que está desempeñando este tipo de exDNA en este punto, lejos de ser el de transformación horizontal, es el de inmunomodulador del microambiente tumoral.

Es importante mencionar que dentro de la propuesta, ambos mecanismos de acción no son mutuamente excluyentes entre sí por lo que ambos podrían estarse llevando a cabo en un mismo tiempo y espacio.

Finalmente, es importante mencionar que una de las primeras pruebas que un fármaco tiene que completar antes de pasar a las fases clínicas y posteriormente a su lanzamiento en el mercado, son las pruebas toxicológicas, es decir, se tiene que demostrar que su administración no tiene efectos secundarios tóxicos. Se considera que las pruebas toxicológicas son las más rigurosas, ya que del total de los fármacos que están en fase de experimentación un 70% se quedan en esta etapa (DiMasi, Hansen, and Grabowski 2003), por lo cual es importante prestar atención a los posibles efectos tóxicos de un fármaco que está en fase de experimentación.

En el caso de la DNasa I, su uso para el tratamiento de algunas enfermedades no es una práctica nueva ya que hay registros de su uso en pacientes con meningitis tuberculosa y pulmonar, gota, abscesos de pulmón y otras condiciones bacterianas supurantes. Un aspecto que hay que hacer notar es el que la administración intravenosa de la DNasa I bovina fue muy bien tolerado, inclusive cuando las dosis usadas alcanzaban los millones de Unidades (Johnson, Goger, and Tillet 1954; Ayvazian and Ayvazian 1960). En la actualidad, hay una DNasa I recombinante humana que se vende en el mercado desde hace más de 20 años bajo el nombre comercial de Pulmozyme® (F. Hoffmann-La Roche SA, Basilea, Suiza) y es utilizada para tratar a pacientes con fibrosis cística (Wagener and Kupfer 2012). En nuestro caso, realizamos curvas de Dosis Máxima Tolerada (DMT) en ratones BALB/c con dosis de 10, 50 y 100 veces más de las empleadas en el experimento sin registrar muerte alguna (Anexo 3A).

En el caso de la papaína, realizamos pruebas de DMT y encontramos que la administración intravenosa de concentraciones muy altas tiene un efecto deletéreo sobre los animales (Anexo 3B). Estudios de sangre demostraron que hay un alargamiento de los tiempos de coagulación, posiblemente por la degradación de las proteínas involucradas en la cascada de coagulación (Anexo 4 y 5). Estos hallazgos son similares a los encontrados en conejos, a los cuales se les administró de manera intravenosa altas concentraciones de papaína (Monkhouse 1955). Sin embargo, también es importante mencionar que la combinación de tripsina, quimiotripsina y papaína activas son componentes del medicamento comercial Wobe-Mugos® (Mucos Pharma GmbH, Geretsried, Germany), usada actualmente para disminuir procesos inflamatorios crónicos, como los presentados en pacientes con cáncer durante la radioterapia y quimioterapia. Este medicamento ha sido administrado a humanos en dosis iguales a las que nosotros empleamos en los animales, sin provocar serios problemas a la salud, ya que en estos estudios solamente en el 3.6% de los casos, los pacientes presentaron problemas moderados que desaparecieron una vez que se suspendió el medicamento (Popiela *et al.* 2001; Sakalová *et al.* 2001). Tampoco en nuestro modelo observamos que los ratones inmunodeficientes fueran afectados por la administración diaria del tratamiento, por lo que su uso bajo este esquema de administración y dosis son seguros.

Para concluir, si el mecanismo de acción de estas enzimas es o no el propuesto en este escrito, este trabajo probó que ambas enzimas tienen un efecto antitumoral notable y dado que su toxicidad no es alta, su aplicación como un fármaco anticancerígeno podría ser factible en el futuro.



## CONCLUSIONES

- ◆ El tratamiento enzimático en conjunto, y no por separado, de DNasa I, papaína, tripsina y quimiotripsina disminuye los niveles de exDNA en el suero de personas sanas y pacientes con cáncer *in vitro*.
- ◆ La proteasa con una mayor actividad proteolítica en suero es la papaína, mientras la actividad catalítica de la tripsina y la quimiotripsina es limitada debido a proteínas endógenas del suero.
- ◆ La administración sistémica de las cuatro enzimas, disminuye los niveles de exDNA y proteínas séricas *in vivo*.
- ◆ La administración continua de la mezcla de estas enzimas, y no por separado, disminuye el tamaño tumoral de manera notable, presumiblemente mediante la disminución del exDNA.
- ◆ Ningún animal, con los esquemas de tratamiento empleados en el trabajo, mostró síntomas de toxicidad aparente por la administración continua de las enzimas.

Este trabajo ha sido publicado en la revista "Integrative Cancer Therapies". Se anexa artículo.

## PERSPECTIVAS

- ◆ Utilizando el modelo de ratón inmunoincompetente:
  - Determinar la dinámica de los niveles totales y tumor-específicos (mutaciones en K-ras) del exDNA en el suero a lo largo del tratamiento
  - Examinar la presencia de neutrófilos en circulación
  - Revisar la presencia de NETs en el TME
- ◆ Evaluar el desarrollo de metástasis después del tratamiento con la mezcla de enzimas, en un modelo de metástasis
- ◆ Evaluar el perfil de citocinas antes y después del tratamiento, en especial de IL-8 y TGF- $\beta$
- ◆ Hacer un estudio completo de toxicidad por tratamiento con la mezcla de enzimas.
- ◆ Evaluar la farmacocinética y farmacodinámica de las cuatro enzimas.

# Antitumor Effects of Systemic DNase I and Proteases in an *In Vivo* Model

Integrative Cancer Therapies  
January-March: 1–9  
© The Author(s) 2016  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1534735416631102  
ict.sagepub.com



Catalina Trejo-Becerril, PhD<sup>1</sup>, Enrique Pérez-Cardenas, MSc<sup>1</sup>,  
Blanca Gutiérrez-Díaz, BSc<sup>1</sup>, Desiree De La Cruz-Sigüenza, MSc<sup>1</sup>,  
Lucía Taja-Chayeb, PhD<sup>1</sup>, Mauricio González-Ballesteros, BSc<sup>1</sup>,  
Patricia García-López, PhD<sup>1</sup>, José Chanona MD<sup>1</sup>,  
and Alfonso Dueñas-González, PhD<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background.** Cell-free DNA circulates in cancer patients and induces *in vivo* cell transformation and cancer progression in susceptible cells. Based on this, we hypothesized that depletion of circulating DNA with DNase I and a protease mix could have antitumor effects. **Study design.** The study aimed to demonstrate that DNase I and a protease mix can degrade *in vitro* DNA and proteins from the serum of healthy individuals and cancer patients, and *in vivo* in serum of Wistar rats. Moreover, the antitumor effect of the systemically administered enzyme mix treatment was evaluated in nude mice subcutaneously grafted with the human colon cancer cell line SW480. **Results.** The serum DNA of cancer patients or healthy individuals was almost completely degraded *in vitro* by the enzymatic treatment, but no degradation was found with the enzymes given separately. The intravenous administration of the enzymes led to significant decreases in DNA and proteins from rat serum. No antitumor effect was observed in immunodeficient mice treated with the enzymes given separately. In contrast, the animals that received both enzymes exhibited a marked growth inhibition of tumors, 40% of them having pathological complete response. **Conclusion.** This study demonstrated that systemic treatment with DNase I and a protease mix in rats decreases DNA and proteins from serum and that this treatment has antitumor effects. Our results support the hypothesis that circulating DNA could have a role in tumor progression, which can be offset by depleting it. Further studies are needed to prove this concept.

## Keywords

antitumor enzymatic treatment, DNase I, proteases mix, trypsin, chymotrypsin, papain

Submitted Date: 19 April 2015; Revised Date: January 11 2016; Acceptance Date: 16 January 2016

## Introduction

The current model for developing new cancer drugs is based on targeting specific molecular alterations in tumors. In general, this approach has yielded modest improvements in survival<sup>1-3</sup>; therefore, it is clear that although efforts must continue in this direction, new paradigms of cancer treatment are needed. So far, most research in malignant tumors is directed toward understanding how cancer cells grow and metastasize, though most recently, the tumor microenvironment, which comprises immune cells, vascular cells, lymphatic endothelial cells, and cancer-associated fibroblastic cells, is also the focus of intense research.<sup>4,5</sup> Beyond tumor cells and the microenvironment, we suggest the presence of a so-called malignant circulome, which may serve as a source of systemic circulating molecules that could modulate tumor growth. However, it is yet uncharacterized because of the

absence of experimental models accounting for the systemic nature and complexity of the phenomenon.

The current paradigm in cancer progression is that it occurs via vertical gene transfer; this means that the offspring of an initiating tumor cell inherit the genetic and epigenetic alterations leading to tumor progression. This model, however, ignores that horizontal or lateral transfer

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Cancerología, México City, Mexico

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM/Instituto Nacional de Cancerología, México City, Mexico

### Corresponding Author:

Alfonso Dueñas-González, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM/Primer Piso, Edificio de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando 22, Tlalpan. CP 14080, México City, Mexico.  
Email: alfonso\_duenasg@yahoo.com



Creative Commons CC-BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the

work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access page (<http://www.uk.sagepub.com/aboutus/openaccess.htm>).

of DNA, which is carried out by almost all cell types, including tumor cells, may potentially act as an endocrine or paracrine messenger, able to affect the functionality of recipient cells.<sup>6</sup> Increasing evidence suggests a key role for these messengers, which have been characterized as exosomes, microvesicles, apoptotic bodies, and virtosomes.<sup>7-9</sup> Regardless of how extracellular DNA is present in circulation, it has been proposed that circulating DNA could participate in the development of metastases via passive transfection-like uptake of such nucleic acids by susceptible cells.<sup>10</sup> In 1994, Anker et al<sup>11</sup> first demonstrated that the supernatant of cultured human colon cancer cell line SW480 was able to transform recipient immortal murine NIH3T3 cells, which acquire human mutated *K-ras*. Transformation of these recipient cells by plasma of colon cancer patients has been reported as well.<sup>12</sup> Our research group has confirmed that the supernatant of malignant cells and serum of patients with cancer transform immortalized murine cells and that this process is associated with transfer of DNA. Interestingly, we demonstrated that the depletion of DNA in either supernatant or serum requires the concomitant use of DNase I and proteases because the circulating DNA is protected from DNase for its association with lipoproteins in virtosomes<sup>9</sup> and that its depletion offset its transforming ability *in vitro*. In addition, we have demonstrated tumor progression in immunocompetent rats xenografted with human colon cancer cells as a source of circulating DNA, which were pretreated with the carcinogen dimethylhydrazine. Furthermore, there was a suggestion that systemic treatment with DNase I and proteases prevents tumor progression in these rats.<sup>13</sup> Here, we demonstrate that the systemic treatment with DNase I and proteases has an antitumor effect in a model of nude mice grafted with a human malignant cell line.

## Material and Methods

### *Serum Collection and Preparation From Healthy Women and Breast Cancer Patients*

Sera were extracted from the blood of 4 women with breast cancer aged 40, 43, 45, and 49 years and 4 healthy women aged 38, 42, 47, and 38 years. Blood was obtained from a peripheral vein in 2 vacutainer tubes (Becton Dickinson, 368162) containing clot-activation additive and a barrier gel to isolate serum. The blood was kept at 4°C, processed within 2 hours, and centrifuged at 400g for 20 minutes (Biofuge primo R, Heraeus) at room temperature; serum was collected and passed through a 0.45- $\mu$ m filter (Sartorius, 16555) to remove cells. The samples were stored at -80°C for subsequent assays. Blood samples were obtained with written consent from source patients and healthy donors.

### *In Vivo Experiments in Rats*

Male Wistar rats weighing 250 to 300 g (HSD: Wistar, Harlan Laboratories) were divided into 2 groups of 4 animals each. Group 1 was inoculated (in each flank) subcutaneously with  $2 \times 10^6$  C6 cells (C6 rat glioma cell line from ATCC) resuspended in 100  $\mu$ L of serum-free culture medium (DMEM-F12). Group 2 corresponded to the control group, which was not inoculated with cells. Sizes of tumors were measured with an electronic caliper, and tumor volume was calculated using the following formula:  $V$  ( $\text{mm}^3$ ) =  $a \times b^2 \times (\pi/6)$ , where  $V$  is the volume,  $a$  the major diameter, and  $b$  the minor diameter. Extraction of serum of rats was performed by bloodletting from the tail caudal vein cannulation. Immediately, 500  $\mu$ L of whole blood was taken (in tubes without anticoagulants [Terumo]), and the enzyme treatment was subsequently administered as described below. After treatment, 500  $\mu$ L of whole blood were taken at increasing times: 7.5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 60 minutes, and 6 hours. For blood samples taken at 24, 48, 72, and 96 hours, we used the retro-orbital under light anesthesia. All blood samples were incubated at 4°C for 2 hours and then centrifuged at 4°C at 1000g for 20 minutes. Serum was collected and filtered with a 0.45- $\mu$ m filter. The samples were stored at -80°C for subsequent assays.

### *Enzymatic Treatment of Serum In Vitro*

We first determined the concentration of total protein in serum using the bicinchoninic acid assay,<sup>14</sup> and then, serum was digested with the protease mix. Briefly, 100  $\mu$ L of serum was incubated first with a mixture of papain (31.25  $\mu$ g/100  $\mu$ L; Sigma) + chymotrypsin (12.5  $\mu$ g/100  $\mu$ L; Sigma) + trypsin (12.5  $\mu$ g/100  $\mu$ L; Sigma) at 37°C for 1 hour, then inactivated at 56°C for 30 minutes. Then, the sample was incubated with DNase I (Sigma) at a concentration of 143.75  $\mu$ g/100  $\mu$ L for 1 hour and immediately inactivated at 65°C for 30 minutes. The integrity of the proteins present in the serum at the end of the protein degradation assay was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis at 7.5% or 12.5% concentration; then, gels were stained with Coomassie blue and photographed.

For the analysis of serum DNA, its concentration was determined using the modified technique of Goldshtein et al<sup>15</sup> to measure DNA directly in serum with SYBR Gold. Briefly, samples were diluted to 40% with PBS and were measured in a fluorometer (excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 535 nm). In addition, serum DNA was extracted by SDS/proteinase K digestion followed by phenol/chloroform extraction as described by Anker et al.<sup>11</sup> Briefly, 500  $\mu$ L of serum was mixed with 500  $\mu$ L of a solution of SDS/proteinase K (Invitrogen) and incubated overnight at 55°C. An equal volume of phenol/chloroform (1:1 v/v) was added, vortexed briefly, and centrifuged

at 800g for 10 minutes (Biofuge primo R, Heraeus). The aqueous phase was recovered and mixed with an equal volume of chloroform and centrifuged at 800g (Biofuge primo R, Heraeus) for 5 minutes. The aqueous phase was precipitated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$  with 1/10 volume of 7.5M ammonium acetate, 1  $\mu\text{L}$  of glycogen, and 2.5 volumes of 100% ethanol and then centrifuged at 1200g (Biofuge primo R, Heraeus) for 45 minutes. The DNA pellet was washed with 70% ethanol, air dried, and resuspended in nuclease-free water. Extracted undigested and digested serum DNA was electrophoresed in 1.5% agarose gel stained with GelRed (Biotium Inc) for visualization.

### Treatment In Vivo With DNase I and Proteases

Rats with and without tumor were treated with the enzyme mix at doses previously reported<sup>13</sup>: papain (25 mg/kg) + trypsin (10 mg/kg) + chymotrypsin (10 mg/kg) + DNaseI (2.3 mg/kg). The mean tumor volumes of tumor-bearing rats were  $1421 \pm 812 \text{ mm}^3$  (left tumor) and  $1665.06 \pm 673.34 \text{ mm}^3$  (right tumor). Enzymes were administered once through a stent in the tail vein, and blood samples from all animals were obtained before treatment and at 7.5, 15, 30, and 60 minutes after treatment.

### Antitumor Effect of Enzymes in Nude Mice

Athymic BALB/c mice (*nu/nu*) females (Harlan Laboratories) of 6 weeks of age were divided into 4 groups. Each group consisted of 6 animals injected subcutaneously with  $1 \times 10^6$  SW480 cells (human colon cancer cell line, American Type Culture Collection) suspended in 100  $\mu\text{L}$  of serum-free culture medium. The groups were as follows: (1) SW480 cells injection as positive control; (2) SW480 cell injection plus treatment with a protease mix (trypsin, chymotrypsin, and papain: 5, 5, and 12.5 mg/kg, respectively)<sup>16</sup>; (3) SW480 cell injection plus treatment with DNase I (2.3 mg/kg)<sup>17</sup>; and (4) SW480 cell injection plus treatment with proteases mix plus DNase I.<sup>13</sup> Treatment with DNase I was intramuscular, whereas the mixture of proteases was administered via the intraperitoneal route. All enzymes were diluted with saline solution. The enzymes were administered daily for 8 weeks starting at day 21 after tumor implantation. Clinical signs, weight, and tumor size were registered weekly. The size of the tumors was measured with an electronic caliper and size-volume was estimated using the following formula:  $V (\text{mm}^3) = a \times b^2 \times (\pi/6)$ , where  $V$  is the volume,  $a$  the major diameter, and  $b$  the minor diameter. At the end of the treatment period, mice were killed humanely, and tumors were removed; in the absence of tumor, the entire site of implantation was sectioned (at least 3 tissue sections) and processed for routine histopathological analysis with hematoxylin and eosin stain. Pathological complete response was defined as the absence of viable tumor cells. An identical experiment using the

same number and groups of animals was repeated to confirm the findings. The tumor growth curve includes the 12 animals by group because the results of the 2 experiments were quite similar. Ethical approvals were obtained from the Institutional Research Ethics Board for blood human samples and the Animal Care Committee.

## Results

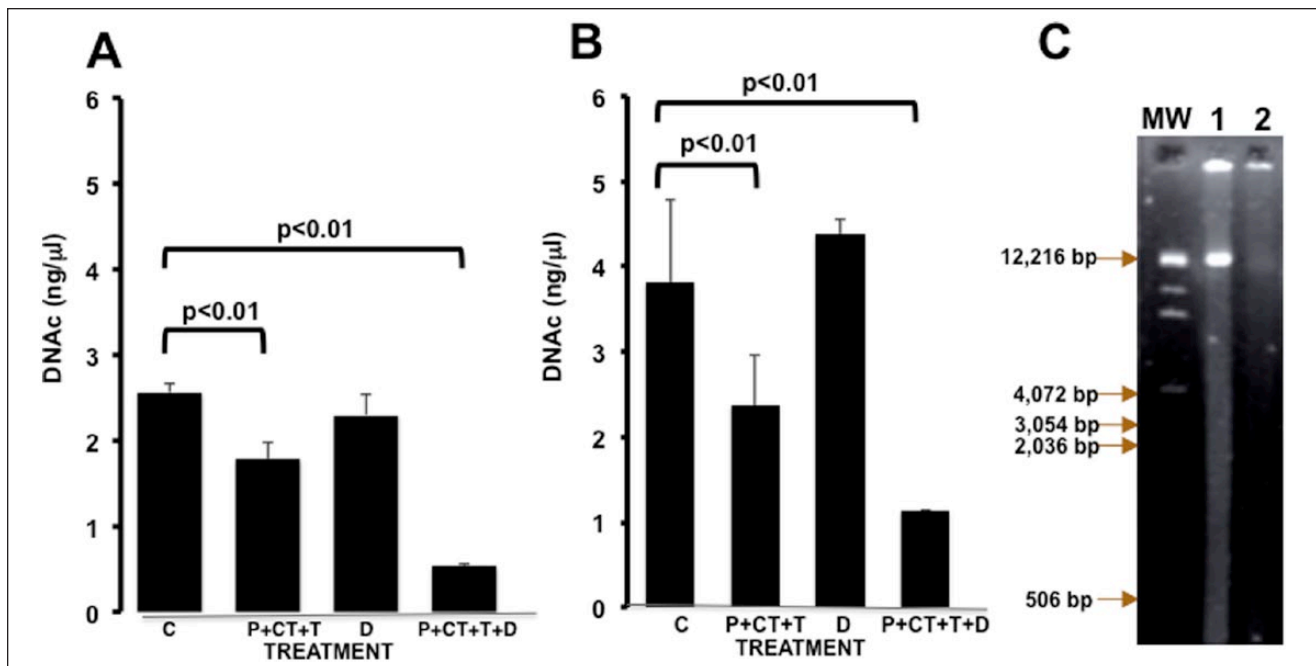
### In Vitro Degradation of DNA and Proteins in Serum From Healthy Individuals and Cancer Patients

Previous studies have shown that supernatant DNA can be degraded by *in vitro* treatment with a combination of DNase I and proteases. Figure 1A confirms that serum DNA of healthy individuals is almost completely degraded by combining DNase I and proteases ( $P < 0.001$ ), whereas DNase I alone induces no or minimal degradation. Interestingly, the proteases mix alone also induced degradation, which was inferior to that achieved by both types of enzyme but still statistically significant ( $P < 0.001$ ). A very similar picture was observed when the serum of breast cancer patients was digested as above, indicating that DNA degradation occurs to the same degree, whether the serum comes from healthy individuals or cancer patients. It can be observed that the basal concentration of DNA in cancer patients was higher as compared with healthy individuals ( $P < 0.005$ ; Figure 1B). To corroborate these findings, DNA was extracted from digested and undigested serum and run in agarose gels. As can be seen in Figure 1C, lane 1 shows that most DNA was degraded, as compared with undigested serum in lane 2.

The protease mix also degrades serum protein as could be expected, and Figure 2A demonstrates that serum proteins from healthy individuals showed a significant decrease ( $P < 0.01$ ), as measured by the bicinchoninic method (similar results observed in the serum of cancer patients, Figure 2B). The decrease was corroborated in acrylamide gels, which showed the pattern of degradation in healthy individuals and in cancer patients (Figures 2C and 2D). Interestingly, the effect is most noticeable in the electrophoretic analysis, which shows almost complete degradation, whereas the measurement by the bicinchoninic method in both healthy individuals and cancer patients shows only about half the degree of reduction.

### In Vivo Degradation of DNA and Proteins in Serum of Rats With and Without Tumors

As we have hypothesized that the circulating DNA *in vivo* is responsible for tumor progression in the rat model,<sup>13</sup> we wanted to determine whether the systemic treatment of rats with both DNase I and the protease mix (papain, chymotrypsin, and trypsin) administered by the intravenous route is active



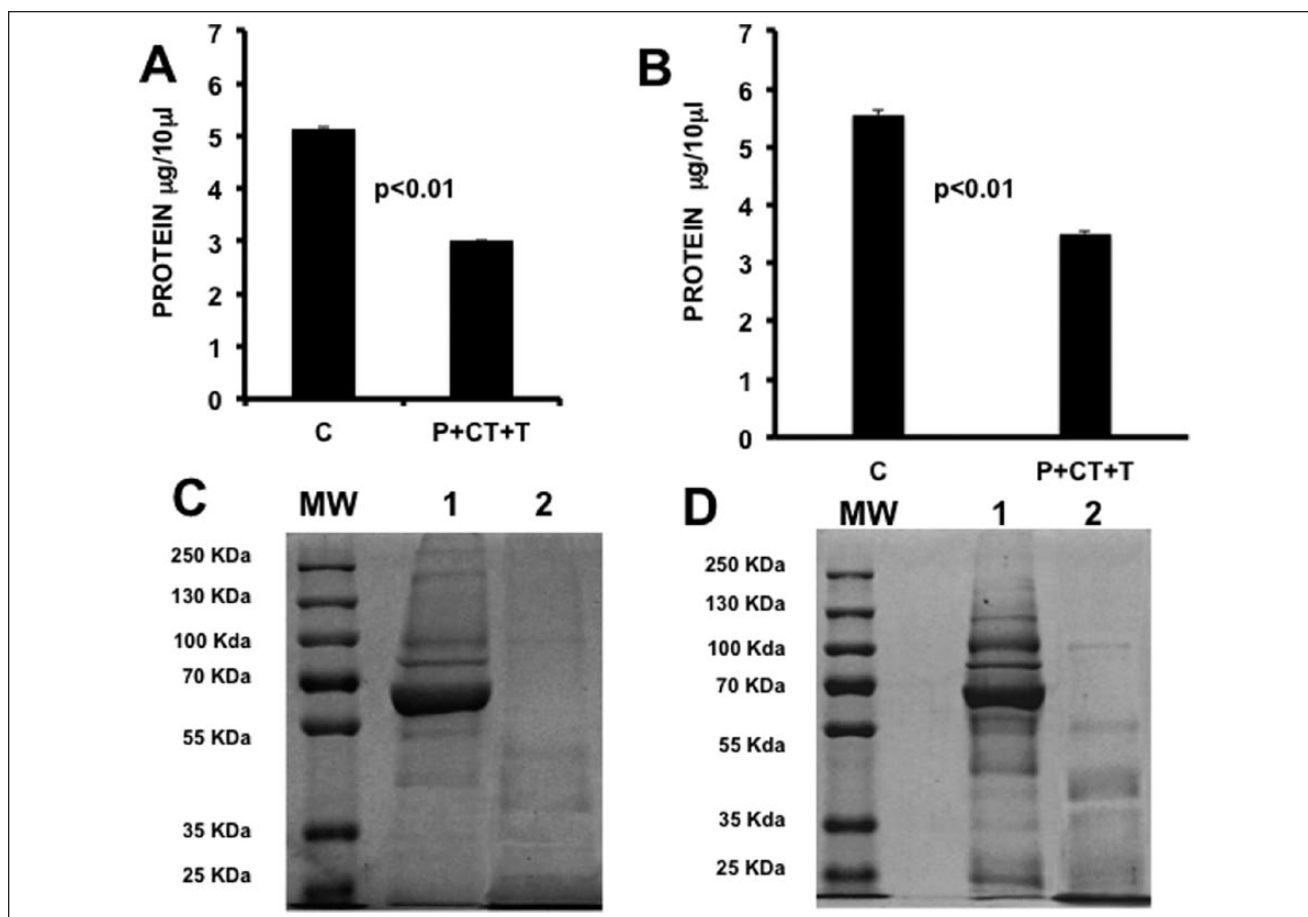
**Figure 1.** A. DNA concentration in serum of healthy subjects (DNAC), treated *in vitro* with the enzyme mix. Control serum without enzymatic treatment (C); C + papain (31.25 mg/100 mL; P) + chymotrypsin (12.5 mg/100 mL; CT) + trypsin (12.5 mg/100 mL; T); C + DNase I (143.75 mg/100 mL; D); Dunnett's test. B. As in Figure 1A but in the serum of the breast cancer patients (Dunnett's test). C. Agarose gel electrophoresis of purified DNAC from the serum of a breast cancer patient. The serum from a breast cancer patient was treated *in vitro* with the enzyme mix and then purified and gel electrophoresed. Abbreviations: MW, molecular weight marker; 1, serum of patient with breast cancer; 2, serum of patient with breast cancer, treated with papain (31.25 mg/100 mL) + chymotrypsin (12.5 mg/100 mL) + trypsin (12.5 mg/100 mL) + DNase I (143.75 mg/100 mL).

in reducing circulating DNA and proteins from serum. As shown in Figure 3A, the treatment led to a mild but statistically significant reduction starting at 7.5 minutes, which further decreased almost to half the concentration at 15 minutes, and then reaching almost basal levels at 30 and 60 minutes. As observed in the *in vitro* digestion of serum (Figures 1A and 1B), *in vivo* treatment also statistically significantly reduced serum DNA in the rats bearing C6 glioma tumors. In this case, the maximum decrease was observed at 7.5 minutes. It should also be noted that basal serum DNA was higher in the tumor-bearing rats as compared with normal rats ( $P > 0.2$ ; Figure 3B).

The effect of the enzymatic treatment on serum proteins was also evaluated in rats. As shown in Figure 4A, when protein concentration was measured by bicinchoninic acid there was a decrease starting at 7.5 minutes, reaching an almost one-third reduction at 15 minutes, and then restoring to close-to-basal levels; all these differences were statistically significant. These changes were well correlated when proteins were analyzed by gel electrophoresis (Figure 4B) at these time points. Similar effects on proteins were shown in the rats bearing the C6 xenograft (not shown). These data clearly demonstrated that the enzyme combination of DNase I and the protease mix administered systemically decrease circulating serum DNA and serum proteins.

### Antitumor Effect of the Enzymatic Treatment in Nude Mice

To demonstrate whether the enzyme combination could have antitumor effects, *nu/nu* mice injected with human colon cancer cells were treated with the enzyme combination systemically. All mice developed measurable tumors. Figure 5 shows that whereas no difference in tumor growth was observed with DNase I alone or the protease mix alone as compared with controls, the animals that received both DNase I and proteases exhibited a marked growth inhibition of tumors starting at day 21 of treatment ( $P = 0.011$ ). In fact, 40% (5 out of 12 mice) had a pathological complete response as evaluated with 3 tissue sections. Under these conditions of evaluation, no viable tumor cells and only minimal fibrosis were found. All tumors showed epithelioid histology, and in those treated with the protease mix and DNase I that did not have complete pathological response, the percentage of necrosis varied between 80% and 90%, and there were scattered viable tumor cells surrounded by stromal atypia and lymphoid infiltrate. Tumors from the protease mix alone exhibited a necrosis percentage between 10% and 30%, whereas in those treated with DNase I alone, the percentages varied between 5% and 20%, and no changes in stroma were observed.



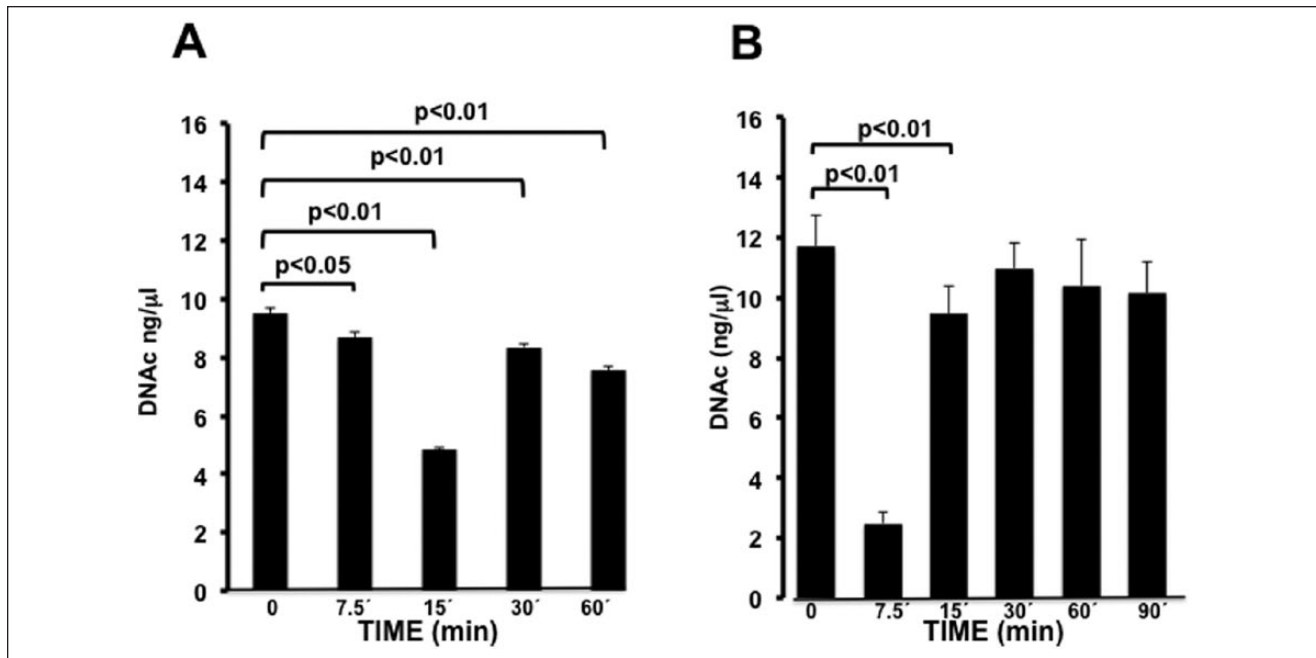
**Figure 2.** A. Protein concentration in serum of subjects treated *in vitro* with the enzyme mix. C: serum from healthy subjects; P+CT+C: control serum treated with papain (31.25 mg/100 mL; P) + chymotrypsin (12.5 mg/100 mL; CT) + trypsin (12.5 mg/100 mL; T); Dunnett's test. B. As in Figure 1A but in the serum of breast cancer patients (Dunnett's test). C. Polyacrylamide gel electrophoresis of the serum samples treated *in vitro* with the enzyme mix; serum from healthy subjects. D. Polyacrylamide gel electrophoresis of the serum samples treated *in vitro* with the enzyme mix; serum from breast cancer patient. Abbreviations: MW, molecular weight marker; 1, untreated serum; 2, serum treated with papain (31.25 mg/100 mL) + chymotrypsin (12.5 mg/100 mL) + trypsin (12.5 mg/100 mL).

No differences in weight were observed among the groups. Basal and final weights from untreated tumor-bearing mice were  $27.73 \pm 2.20$  g and  $28.2 \pm 2.97$  g, whereas these were  $26.82 \pm 2.99$  g and  $26.36 \pm 2.29$  g in mice treated with the enzyme combination. It is important to note that this experiment was done twice under identical conditions, and because the results were very similar, the tumor growth curve is shown in a single figure.

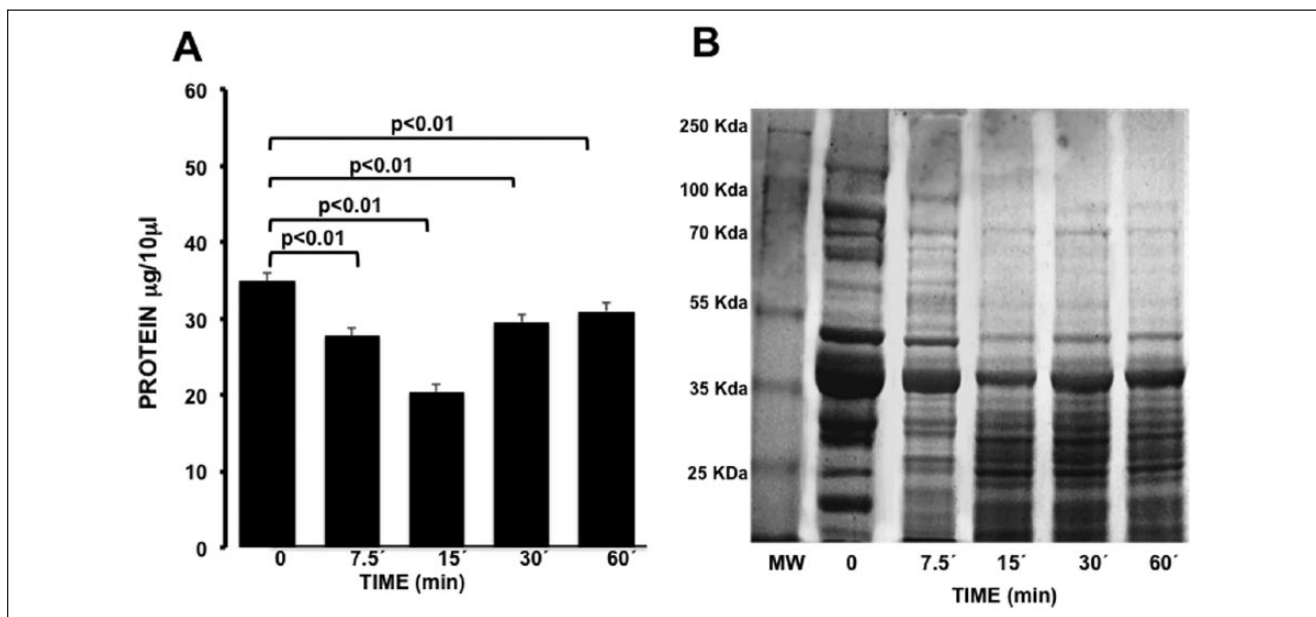
## Discussion

The results of this study show that the systemic administration of DNase I and a protease mix containing trypsin, chymotrypsin, and papain decreases the levels of DNA and proteins in rats and that the enzymes have antitumor effects in nude mice xenografted with a human colon cancer cell line.

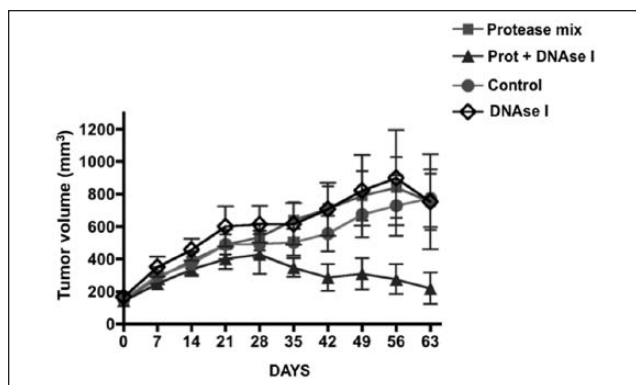
The rationale for use of the enzyme combination (protease mix and DNase I) was supported by our results *in vitro* and *in vivo*. As shown in Figures 1A, 1B, and 1C, the results clearly suggest the more effective degradation of serum DNA with the combination as compared with either proteases or DNase I alone, supporting the view that circulating DNA is protected from DNase for its association with lipoproteins in virtosomes.<sup>9</sup> The results in serum DNA depletion in both healthy and tumor-bearing rats, as shown in Figure 3, indicate that the enzyme combination is active *in vivo*, though it is important to undertake pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of both DNase I and proteases *in vivo* to better understand the kinetics of reduction in DNA in normal and tumor-bearing hosts. This would help explain why there is an apparent difference in the kinetics of DNA reduction (maximum decrease at 15 minutes in healthy and 7.5 minutes in tumor-bearing rats).



**Figure 3.** A. DNA concentration in serum of Wistar rats treated with the enzyme mix (papain: 25 mg/kg + trypsin: 10/kg + chymotrypsin: 10 mg/kg + DNase I: 2.3 mg/kg). Blood samples were taken at 4 different time intervals after treatment. B. DNA concentration in serum of Wistar rats with tumor treated with the enzyme mix (papain: 25 mg/kg + trypsin: 10 mg/kg + chymotrypsin: 10 mg/kg + DNase I: 2.3 mg/kg). Blood samples were taken at 5 different time intervals after treatment. Abbreviation: 0, untreated control serum (Dunnett's test).



**Figure 4.** A. Protein concentration in serum of Wistar rats treated with the enzyme mix (papain: 25 mg/kg + trypsin: 10 mg/kg + chymotrypsin: 10 mg/kg + DNase I: 2.3 mg/kg). Blood samples were taken at 4 different time intervals after applying the treatment. B. Polyacrylamide gel at 12.5% from Wistar rats that were treated with the enzyme mix (papain: 25 mg/kg + trypsin: 10 mg/kg + chymotrypsin: 10 mg/kg + DNase I: 2.3 mg/kg) showing serum protein degradation. Blood samples were taken at 4 different time intervals after applying the treatment. Abbreviation: 0, untreated control serum (Dunnett's test); MW, molecular weight marker.



**Figure 5.** Antitumor effect of the enzymatic treatment in athymic mice. The graph shows the effect on the tumor size in tumor-bearing mice treated with the enzyme mix (papain: 12.5 mg/kg + trypsin: 5 mg/kg + chymotrypsin: 5 mg/kg + DNase I: 2.3 mg/kg). Statistically significant differences were found between the untreated group versus the protease mix plus DNase I mix ( $P = 0.011$ ) group but not against the groups treated with either DNase I alone or protease mix alone (Student's *t* test).

On the other hand, the biological meaning of serum protein reduction in rats after the enzyme treatment is unknown. Nevertheless, the fact that these enzymes degrade DNA and proteins *in vitro* and *in vivo* suggest that the antitumor effect could be related to depletion of circulating DNA. The fact that treatment of mice with proteases only did not exhibit antitumor effects further suggests that circulating DNA could be mostly responsible for the phenomenon. Nevertheless, our findings are solely hypothesis generating because no experimental data are provided to demonstrate that, indeed, the depletion of circulating DNA led to tumor reduction.

A number of studies have demonstrated the ability of extracellular DNA from cell culture supernatant, serum/plasma, or apoptotic bodies to horizontally drive transformation and tumorigenesis. Using supernatant of cultured SW480 cells Anker et al<sup>11</sup> showed NIH3T3 transformation associated with mutant *K-Ras* transfer. García-Olmo et al<sup>12</sup> observed cell transformation and tumorigenesis of NIH3T3 “passively” transfected with human plasma from colon cancer patients. In addition, they showed that plasma from healthy individuals was unable to do so. Similar results have been obtained using apoptotic bodies as a source of exogenous DNA. Bergsmedh et al<sup>17</sup> used *H-ras*/human *c-myc*-transfected rat fibroblasts as donor and mouse embryonic fibroblasts as recipient cells, whereas Gaiffe et al<sup>18</sup> demonstrated cell transformation using human papillomavirus-positive cervical cancer cells and human mesenchymal cells as source and recipient cells, respectively. Taken together, these data suggest that depleting the oncogenic DNA from circulation could have antitumor effects.

To our knowledge, this is the first study evaluating the systemic administration of this enzymatic combination under the rationale that depleting circulating DNA could have antitumor effects. Very early reports exist on the use of intravenous bovine crystalline pancreatic desoxyribonuclease for treating patients with meningeal and pulmonary tuberculosis, lung abscesses, and other bacterial suppurative conditions. Of note, treatment was well tolerated, even using doses ranging in millions of units.<sup>19,20</sup> More recently, recombinant DNase I (rhDNase) has also been tested. Patients received rhDNase at 25 or 125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of rhDNase or placebo in a schedule comprising a single intravenous dose followed by 10 subcutaneous doses. No adverse events were registered, and serum concentrations of rhDNase (between 40 and 100 ng/mL) that have enzymatic activity were achieved by substantial time periods; nevertheless, no direct measurements of extracellular DNA were performed in either of these studies.<sup>21</sup> Systemic DNase has also been evaluated in a number of experimental systems. Alcazar-Leyva et al<sup>22</sup> showed that DNase inhibits cell proliferation *in vitro*, whereas *in vivo*, its systemic administration slows the course of lymphatic leukemia in AKR mice<sup>23</sup> and also prevents liver metastases in cutaneously transplanted tumor cells in mice.<sup>24</sup>

Patutina et al<sup>25</sup> reported that daily administration of RNase and DNase, either alone or in combination, reduces the pathologically increased level of extracellular DNA and increased nuclease activity of the blood plasma of tumor-bearing mice back to the level of healthy animals. This decrease in circulating DNA, which was increased in tumor-bearing animals, was associated with reduced formation of metastases in 2 murine models using Lewis lung carcinoma and HA-1 hepatoma xenografted in the thighs as well as in a model of intravenously injected Lewis lung carcinoma cells. The clinical use of proteases, specifically pancreatic enzymes, has been pursued for many years. Between 1900 and 1910, at least 13 publications reported on the efficacy of this treatment in a number of solid tumors.<sup>26</sup> Currently, active trypsin, chymotrypsin, and other proteases are also components of the commercially available enzyme mixtures Wobe-Mugos E and Phlogenzym (Mucos Pharma GmbH, Geretsried, Germany), which have been tested by the oral route in cancer patients for relief of chemotherapy- and radiation-related symptoms. There are no studies evaluating possible therapeutic activities of proteases by intravenous administration; however, it has been shown that the subcutaneous administration of an enzyme mixture containing trypsinogen, amylase, chymotrypsinogen, and traces of the active chymotrypsin leads to a remarkable increase in survival rate of female C57B16 mice injected subcutaneously with B16F10 cells.<sup>27</sup> Likewise, a mixture of amylase and trypsinogen led to significantly slow growth of methylcholantrene-induced tumors in mice.<sup>28</sup> The protease mix used in our work—trypsin, chymotrypsin, and papain—was



given by intrarectal administration, demonstrating growth inhibition at the primary tumor, antimetastatic effect, and an increase in survival in C57B16 mice with subcutaneous implantation of B16F10 cells.<sup>25,27,28</sup> In this regard, our results in the mice are noticeable because 40% of them had complete, histopathologically evaluated eradication of the tumor at the expense of no toxicity, as clinically and pathologically observed, suggesting that this treatment can be feasible; but of course, much more work is needed before the treatment can be clinically tested.

All together, our results support previous findings on the antitumor effects of the combination of DNase I and mix of proteases; however, it is to be noted that in our model, neither DNase I nor the protease mix alone exhibited growth inhibition, despite the fact that the doses of DNase I and proteases used were similar to that in previous work.<sup>25,27,28</sup> This result may be related to the experimental model itself (nude mice injected with human cancer cells), which is different from that used in previous reports, or alternatively, because of the administration route we used: where possible, the plasma concentrations achieved in our model were higher.

Regarding circulating DNA, although it seems clear that tumor cells in cancer patients shed DNA into the circulation and that this correlates with the extent of disease,<sup>29</sup> and this circulating DNA has neoplastic characteristics<sup>30</sup> and carries the genetic alterations found in the primary tumor,<sup>31</sup> the biological meaning of circulating DNA is yet to be understood. On this basis, more studies are needed to confirm that tumor-shed DNA indeed drives tumor progression in patients. In addition, it is important to understand how DNA travels in the circulation to achieve its efficient depletion by pharmacological or other means. On the other hand, the use of proteases as cancer treatment seems counterintuitive to current knowledge that metalloproteinases and other proteases are overexpressed in cancer and seem to be critical for tumor invasion and metastases.<sup>32</sup> However, this may not hold true in general because phase III clinical trials of matrix metalloproteinase inhibitors marimastat, prinomastat, and batimastat administered alone or in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers (lung, prostate, pancreas, brain, gastrointestinal tract) failed to show clinical efficacy.<sup>33</sup> In fact, the expression of certain matrix metalloproteinases, either at the primary or the metastatic site, provides a beneficial and protective effect in multiple stages of cancer progression.<sup>34</sup> In this sense, it has been hypothesized that trypsin may have tumor suppressive effects because it is silenced by promoter methylation,<sup>35</sup> and several studies showed that high-grade tumors express trypsinogen, whereas low-grade tumors harbor lower expression.<sup>36-38</sup> Furthermore, other cysteine proteases, fastuosain and bromelain, were shown to have antitumor effects in a B16F10 model of murine melanoma,<sup>39</sup> and other works demonstrate that *in vitro* treatment of several human cancer cell lines with pancreatic enzymes suppresses the epithelial-mesenchymal transition and promotes cell differentiation.<sup>40</sup>

The field of the biological meaning of circulating DNA as a therapeutic target is not new. However, studies on it are very scarce, and the results of this work must be seen with caution because we did not demonstrate that the treated mice had a decrease in circulating DNA or changes in serum protein levels. Nevertheless, that reduction occurred can be suggested by the results obtained in rats, which showed a decrease in both parameters. Again, the major weakness of the study is that it is not mechanistic; hence, at this time, we still do not know how the antitumor effect occurs. In summary, our results further support the concept that depleting the circulating DNA by the use of DNase I and a protease mix containing trypsin, chymotrypsin, and papain, which are needed to help DNase I digest DNA, may have a role in cancer treatment. Nevertheless, it is necessary first to understand how circulating DNA drives tumor progression and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enzymatic combination resulting in serum DNA depletion. To further complicate the picture, the effects of systemic proteases most likely heavily influence tumor biology by altering the balance between protumoral and antitumoral cytokines, chemokines, growth factors, and other proteins.

#### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by CONACyT Grants 34649-M, 50699 and from PAPIIT UNAM IN214902. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### References

1. Seruga B, Hertz PC, Wang L, et al. Absolute benefits of medical therapies in phase III clinical trials for breast and colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2010;21:1411-1418.
2. Vera-Badillo FE, Al Mubarak M, Templeton AJ, Amir E. Benefit and harms of new anti-cancer drugs. *Curr Oncol Rep*. 2013;15:270-275.
3. Seruga B, Pond GR, Hertz PC, Amir E, Ocana A, Tannock IF. Comparison of absolute benefits of anticancer therapies determined by snapshot and area methods. *Ann Oncol*. 2012;23:2977-2982.
4. Klemm F, Joyce JA. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol*. 2015;25:198-213.
5. Chen F, Zhuang X, Lin L, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med*. 2015;13:278.
6. Sleator RD. Phylogenetics. *Arch Microbiol*. 2011;193:235-239.
7. Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*. 2011;81:1171-1182.

8. Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2014;20:385-393.
9. Gahan PB, Stroun M. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct.* 2010;28:529-538.
10. García-Olmo DC, García-Olmo D. Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomestasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18:153-161.
11. Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M. Transformation of NIH/3T3 cells and SW480 cells displaying K-ras mutation [in French]. *C R Acad Sci III.* 1994;317:869-874.
12. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 2010;70:560-567.
13. Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Taja-Chayeb L, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivomodel. *PLoS One.* 2012;7:e52754.
14. Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
15. Goldshtein H, Hausmann M, Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem.* 2009;46:488-494.
16. Wald M, Olejar T, Sebkova V, Zadinova M, Boubelik M, Pouckova P. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;47(suppl):S16-S22.
17. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6407-6411.
18. Gaiffe E, Pretet JL, Launay S, et al. Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties. *PLoS One.* 2012;7:e36766.
19. Ayvazian JH, Ayvazian LF. Effect of intravenous administration of crystalline pancreatic deoxyribonuclease in patients with gout. *N Engl J Med.* 1960;263:999-1002.
20. Johnson AJ, Goger PR, Tillett WS. The intravenous injection of bovine crystalline pancreatic deoxyribonuclease into patients. *J Clin Invest.* 1954;33:1670-1686.
21. Davis JC Jr, Manzi S, Yarboro C, et al. Recombinant human DNase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 1999;8:68-76.
22. Alcázar-Leyva S, Cerón E, Masso F, Montaña LF, Gorocica P, Alvarado-Vásquez N. Incubation with DNase I inhibits cell proliferation. *Med Sci Monit.* 2009;15:CR51-55.
23. Salganik RI, Martynova RP, Matienko NA, Ronichevskaya GM. Effect of deoxyribonuclease on the course of lymphatic leukaemia in AKR mice. *Nature.* 1967; 214(5083):100-102.
24. Sugihara S, Yamamoto T, Tanaka H. Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice. *Br J Cancer.* 1993;67:66-70.
25. Patutina O, Mironova N, Ryabchikova E, et al. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie.* 2011;93:689-696.
26. Novak JF, Trnka F. Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res.* 2005;25:1157-1178.
27. Wald M, Olejar T, Pouckova P, Zadinova M. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sci.* 1998;63:237-243.
28. Wald M, Zavadova E, Pouckova P, Zadinova M, Boubelik M. Polyzyme preparation Wobe-Mugos inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Life Sci.* 1998;62:43-48.
29. Figg WD II, Reid J. Monitor tumor burden with circulating tumor DNA. *Cancer Biol Ther.* 2013;14:697-698.
30. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46:318-322.
31. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32:579-586.
32. Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors: a novel class of anticancer agents. *Adv Enzyme Regul.* 1995;35:293-301.
33. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene.* 2000;19:6642-6650.
34. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:717-724.
35. Yamashita K, Mimori K, Inoue H, Mori M, Sidransky D. A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression. *Cancer Res.* 2003;63:6575-6578.
36. Hirahara F, Miyagi Y, Miyagi E, et al. Trypsinogen expression in human ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 1995;63:176-181.
37. Ohta T, Terada T, Nagakawa T, et al. Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. *Br J Cancer.* 1994;69:152-156.
38. Kato Y, Nagashima Y, Koshikawa N, Miyagi Y, Yasumitsu H, Miyazaki K. Production of trypsins by human gastric cancer cells correlates with their malignant phenotype. *Eur J Cancer.* 1998;34:1117-1123.
39. Guimarães-Ferreira CA, Rodrigues EG, Mortara RA, et al. Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia.* 2007;9:723-733.
40. Perán M, Marchal JA, Garcia MA, Kenyon J, Tosh D. In vitro treatment of carcinoma cell lines with pancreatic (pro) enzymes suppresses the EMT programme and promotes cell differentiation. *Cell Oncol (Dordr).* 2013;36:289-301.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alcázar-Leyva, S. et al. 2009. "Incubation with DNase I Inhibits Tumor Cell Proliferation." *Med Sci Monit* 15(2):5–15.
- American Cancer Society. 2015a. "A Guide to Cancer Surgery." *American Cancer Society Web Page*. Retrieved May 27, 2015 (<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/surgery/index#>).
- American Cancer Society. 2015b. "Chemotherapy." *American Cancer Society Web Page*. Retrieved May 25, 2015 (<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/index>).
- American Cancer Society. 2015c. "Radiation Therapy." *American Cancer Society Web Page*. Retrieved May 27, 2015 (<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/radiation/index>).
- American Cancer Society. 2015d. "Targeted Cancer Therapy." *American Cancer Society Web Page*. Retrieved May 27, 2015 (<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/targetedtherapy/index>).
- American Cancer Society. 2015e. "What Is Cancer?" *American Cancer Society Web Page*. Retrieved May 25, 2015 (<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).
- Anker, P., J. Lyautey, F. Lefort, C. Lederrey, and M. Stroun. 1994. "Transformation of NIH/3T3 Cells and SW480 Cells Displaying a K-Ras Mutation." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la vie*. 317(10):869–74.
- Anker, P., H. Mulcahy, and M. Stroun. 2003. "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum as a Noninvasive Investigation for Cancer: Time for Large-Scale Clinical Studies?" *International journal of cancer. Journal international du cancer* 103(2):149–52.
- Ayvazian, JH. and LF. Ayvazian. 1960. "Effect of Intravenous Administration of Crystalline Pancreatic Desoxyribonuclease in Patients with Gout." *The New England journal of medicine* 263:999–1002. Retrieved March 24, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13685390>).
- Balkwill, FR., M. Capasso, and T. Hagemann. 2012. "The Tumor Microenvironment at a Glance." *Journal of cell science* 125(Pt 23):5591–96. Retrieved November 5, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420197>).
- Benda, P., K. Someda, J. Messer, and WH. Sweet. 1971. "Morphological and Immunochemical Studies of Rat Glial Tumors and Clonal Strains Propagated in Culture." *Journal of neurosurgery* 34(3):310–23. Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4323142>).

- Berger-Achituv, S. et al. 2013. "A Proposed Role for Neutrophil Extracellular Traps in Cancer Immunoediting." *Frontiers in immunology* 4:48. Retrieved March 24, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3589747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Bergsmedh, A. et al. 2001. "Horizontal Transfer of Oncogenes by Uptake of Apoptotic Bodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11):6407–11.
- Beuth, J. et al. 2001. "Impact of Complementary Oral Enzyme Application on the Postoperative Treatment Results of Breast Cancer Patients--Results of an Epidemiological Multicentre Retrospective Cohort Study." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 47 Suppl:S45–54.
- Beuth, J. 2008. "Proteolytic Enzyme Therapy in Evidence-Based Complementary Oncology: Fact or Fiction?" *Integ Cancer Ther* 7(4):311–16.
- Boveri, T. 1929. *The Origin of Malignant Tumors*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bradford, MM. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical biochemistry* 72:248–54.
- Cai, J. et al. 2014. "Transferred BCR/ABL DNA from K562 Extracellular Vesicles Causes Chronic Myeloid Leukemia in Immunodeficient Mice." *PLoS ONE* 9(8):1–11.
- Cai, Jin et al. 2013. "Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Donor Genomic DNA to Recipient Cells Is a Novel Mechanism for Genetic Influence between Cells." *Journal of Molecular Cell Biology* 5(4):227–38.
- Cherepanova, AV., SN. Tamkovich, OE. Bryzgunova, VV. Vlassov, and PP. Laktionov. 2008. "Deoxyribonuclease Activity and Circulating DNA Concentration in Blood Plasma of Patients with Prostate Tumors." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:218–21.
- Cools-Lartigue, J. and J. Spicer. 2013. "Neutrophil Extracellular Traps Sequester Circulating Tumor Cells and Promote Metastasis." *The Journal of clinical ...* 123(8):3446–58. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726160/>).
- Cools-Lartigue, J., J. Spicer, S. Najmeh, and L. Ferri. 2014. "Neutrophil Extracellular Traps in Cancer Progression." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(21):4179–94.
- Davis, JC. et al. 1999. "Recombinant Human Dnase I (rhDNase) in Patients with Lupus Nephritis." *Lupus* 8(1):68–76.
- Dayan, AD. 1994. "Pharmacological-Toxicological (Expert Report on Recombinant Human Deoxyribonuclease I (rhDNase; Pulmozyme™)." *Human & Experimental Toxicology* 13(1 suppl):S2–42.
- Demers, M. et al. 2012. "Cancers Predispose Neutrophils to Release Extracellular DNA Traps That Contribute to Cancer-Associated Thrombosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(32):13076–81.

- Retrieved March 25, 2016  
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3420209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Desser, L. et al. 2001. "Oral Therapy with Proteolytic Enzymes Decreases Excessive TGF- $\beta$  Levels in Human Blood." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 47 Suppl:S10–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11561866>).
- Desser, L., A. Sakalová, E. Zavadová, D. Holomanova, and T. Mohr. 1997. "Concentrations of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors,  $\beta$ 2-Microglobulin, IL-6 and TNF in Serum of Multiple Myeloma Patients after Chemotherapy and after Combined Enzyme-Chemotherapy." *International journal of immunotherapy* 13(3-4):121–30. Retrieved February 5, 2016  
(<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2130176>).
- Diehl, F. et al. 2008. "Circulating Mutant DNA to Assess Tumor Dynamics." *Nature medicine* 14(9):985–90.
- DiMasi, JA., RW. Hansen, and HG. Grabowski. 2003. "The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs." *Journal of Health Economics* 22:151–85. Retrieved March 26, 2016 ([http://www.fda.gov/oc/03\\_drug\\_development.php](http://www.fda.gov/oc/03_drug_development.php)).
- Elzer, KL., DA. Heitzman, MI. Chernin, and JF. Novak. 2008. "Differential Effects of Serine Proteases on the Migration of Normal and Tumor Cells: Implications for Tumor Microenvironment." *Integr Cancer Ther* 7:282–94. Retrieved (<http://ict.sagepub.com/content/7/4/282.abstract>).
- Fernández, CS. et al. 2011. *Perfil Epidemiológico de Los Tumores Malignos En México*. Retrieved ([http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Perfil+epidemiol?gic+de+los+tumores+malignos+en+M?xico.#1\http://2010/PDFS/PUBLICACIONES/MONOGRA-FIAS/00\\_PEPID\\_TUMORES\\_MALIGNOS\\_MEX\\_2010\\_POR-TADA.pdf](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Perfil+epidemiol?gic+de+los+tumores+malignos+en+M?xico.#1\http://2010/PDFS/PUBLICACIONES/MONOGRA-FIAS/00_PEPID_TUMORES_MALIGNOS_MEX_2010_POR-TADA.pdf)).
- Fridlender, ZG. et al. 2009. "Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : 'N1' versus 'N2' TAN." *Cancer cell* 16(3):183–94. Retrieved November 24, 2015  
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2754404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Gahan, PB. 2010. "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: Diagnosis and Prognosis in Cancer." *The EPMA Journal* 1(3):503–12.
- Gahan, PB. and M. Stroun. 2010. "The Virtsosome-a Novel Cytosolic Informative Entity and Intercellular Messenger." *Cell Biochemistry and Function* 28(7):529–38.
- García-Olmo, D. 1999. "Tumor DNA Circulating in the Plasma Might Play a Role in Metastasis. The Hypothesis of the Genometastasis." *Histology and Histopathology* 14(1 999):1159–64.
- García-Olmo, D. et al. 2010. "Cell-Free Nucleic Acids Circulating in the Plasma of Colorectal Cancer Patients Induce the Oncogenic Transformation of Susceptible Cultured Cells." *Cancer Research* 70(2):560–67.

- García-Olmo, D. and DC. García-Olmo. 2001. "Functionality of Circulating DNA: The Hypothesis of Genometastasis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 945:265–75.
- García-Olmo, D., DC. García-Olmo, J. Ontañón, and E. Martínez. 2000. "Horizontal Transfer of DNA and The 'genometastasis Hypothesis'." *Blood* 95(2):724–25.
- García-Olmo, DC. et al. 2008. "Release of Cell-Free DNA into the Bloodstream Leads to High Levels of Non-Tumor Plasma DNA during Tumor Progression in Rats." *Cancer Letters* 272(1):133–40.
- Goldshtein, H., MJ. Hausmann, and A. Douvdevani. 2009. "A Rapid Direct Fluorescent Assay for Cell-Free DNA Quantification in Biological Fluids." *Annals of clinical biochemistry* 46(Pt 6):488–94.
- González-Masiá, JA., D. García-Olmo, and DC. García-Olmo. 2011. "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS): Applications in Oncology." *OncoTargets and Therapy* 79–84. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-9382-0>).
- Guadalajara, H. et al. 2008. "The Concentration of Deoxyribonucleic Acid in Plasma from 73 Patients with Colorectal Cancer and Apparent Clinical Correlations." *Cancer Detection and Prevention* 32(1):39–44.
- Guimarães-Ferreira, CA. et al. 2007. "Antitumor Effects in Vitro and in Vivo and Mechanisms of Protection against Melanoma B16F10-Nex2 Cells by Fastuosain, a Cysteine Proteinase from Bromelia Fastuosa." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 9(9):723–33. Retrieved March 25, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1993857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Hanahan, D. and LM. Coussens. 2012. "Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment." *Cancer Cell* 21(3):309–22. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>).
- Hanahan, D. and RA. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100:57–70.
- Hanahan, D. and RA. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5):646–74. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>).
- Hawes, MC., F. Wen, and E. Elquza. 2015. "Extracellular DNA: A Bridge to Cancer." *Cancer Research* 6–11. Retrieved (<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-15-1546>).
- Hazlett, LD. and RS. Berk. 1978. "Heightened Resistance of Athymic, Nude (Nu/nu) Mice to Experimental Pseudomonas Aeruginosa Ocular Infection." *Infection and Immunity* 22(3):926–33.
- Holdenrieder, S., A. Burges, O. Reich, FW. Spelsberg, and P. Stieber. 2008. "DNA Integrity in Plasma and Serum of Patients with Malignant and Benign Diseases." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:162–70.
- Holmgren, L. et al. 1999. "Horizontal Transfer of DNA by the Uptake of Apoptotic Bodies." *Blood* 93(11):3956–63.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2013. "Causas de Defunción; Defunciones Generales Totales Por Principales Causas de Mortalidad." *Página Web del Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Retrieved May 25, 2015 (<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>).
- Jahr, S. et al. 2001. "DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necr." *Cancer research* 61:1659–65.
- Johnson, AJ., PR. Goger, and WS. Tillet. 1954. "The Intravenous Injection of Bovine Crystalline Pancreatic Desoxyribonuclease into Patients." *The Journal of clinical investigation* 33(12):1670–86. Retrieved March 24, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1072599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Kim, J. and JS. Bae. 2016. "Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment." *Mediators of inflammation* 2016:6058147. Retrieved March 24, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4757693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Kjønniksen, I. et al. 1989. "A Human Tumor Lung Metastasis Model in Athymic Nude Rats." *Cancer Res* 49:5148–52.
- Klemm, F. and JA. Joyce. 2015. "Microenvironmental Regulation of Therapeutic Response in Cancer." *Trends in Cell Biology* 25(4):198–213. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.006>).
- Kolac, C., P. Streichhan, and CM. Lehr. 1996. "Oral Bioavailability of Proteolytic Enzymes." *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 42(4):222–32. Retrieved March 24, 2016 (<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3191444>).
- Kopreski, MS. et al. 1997. "Detection of Mutant K-Ras DNA in Plasma or Serum of Patients with Colorectal Cancer." *British journal of cancer* 76(10):1293–99.
- Lackner, MR., TR. Wilson, and J. Settleman. 2012. "Mechanisms of Acquired Resistance to Targeted Cancer Therapies." *Future oncology (London, England)* 8(8):999–1014. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894672>).
- Laktionov, PP. et al. 1999. "Characterisation of Membrane Oligonucleotide-Binding Proteins and Oligonucleotide Uptake in Keratinocytes." *Nucleic acids research* 27(11):2315–24. Retrieved March 27, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- De Lamirande, G. 1961. "Action of Deoxyribonuclease and Ribonuclease on the Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice." *Nature* 192(Oct 7):52–54.
- Lauer, D. et al. 2001. "Modulation of Growth Factor Binding Properties of alpha2-Macroglobulin by Enzyme Therapy." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 47(Suppl):S4–9.

- Leon, SA., B. Shapiro, DM. Sklaroff, and MJ. Yaros. 1977. "Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy." *Cancer Res* 37:646–50.
- Li, CN. et al. 2003. "Cell-Free DNA Is Released from Tumor Cells upon Cell Death: A Study of Tissue Cultures of Tumor Cell Lines." *J Clin Lab Anal.* 17(4):103–7.
- Mandel, P. and P. Metais. 1948. "Les Acides Nucléiques Du Plasma Sanguin Chez L'homme." *C.R. Acad. Sci. Paris* 142:241–43.
- Minciocchi, VR., MR. Freeman, and D. Di Vizio. 2015. "Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 1–11. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115000373>).
- Mitra, I. 2015. "Circulating Nucleic Acids: A New Class of Physiological Mobile Genetic Elements." *F1000Research* 4:924.
- Monkhouse, FC. 1955. "An Investigation of the Coagulation Defect Brought about in Rabbits and Dogs by the Intravenous Injection of Papain." *Canadian journal of biochemistry and physiology* 33(2):112–21.
- National Cancer Institute. 2009. "What Is Cancer?" *National Cancer Institute Web Page*. Retrieved May 20, 2015 (<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>).
- National Cancer Institute. 2014. "Precision Medicine and Targeted Therapy." *National Cancer Institute Web Page*. Retrieved May 27, 2015 (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>).
- National Cancer Institute. 2015a. "Chemotherapy." *National Cancer Institute Web Page*. Retrieved January 1, 2015 (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>).
- National Cancer Institute. 2015b. "Radiation Therapy." *National Cancer Institute Web Page*. Retrieved May 27, 2015 (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>).
- National Cancer Institute. 2015c. "Surgery." *National Cancer Institute Web Page*. Retrieved May 27, 2015 (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery>).
- Novak, JF. and F. Trnka. 2005. "Proenzyme Therapy of Cancer." *Anticancer Research* 25(2 A):1157–77.
- Ocaña, A. et al. 2016. "Circulating DNA and Survival in Solid Tumors." *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 25(2):399–406. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604269>).
- Patutina, O. et al. 2011. "Inhibition of Metastasis Development by Daily Administration of Ultralow Doses of RNase A and DNase I." *Biochimie* 93(January):689–96. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.011>).
- Patutina, OA. et al. 2010. "Tumoricidal Activity of RNase A and DNase I." *Acta naturae* 2(1):88–94. Retrieved



(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Popiela, T., J. Kulig, J. Hanisch, and PR. Bock. 2001. "Influence of a Complementary Treatment with Oral Enzymes on Patients with Colorectal Cancers--an Epidemiological Retrolective Cohort Study." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 47 Suppl:S55–63.
- Quail, DF. and JA. Joyce. 2013. "Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis." *Nature Medicine* 19(11):1423–37. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3394>\n<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.3394>).
- Roché, H. and LT. Vahdat. 2011. "Treatment of Metastatic Breast Cancer: Second Line and Beyond." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22(5):1000–1010. Retrieved March 30, 2016 (<http://annonc.oxfordjournals.org/content/22/5/1000>).
- Rothenberg, Mace, Amy Nelson, and Kenneth Hande. 1999. "New Drugs on the Horizon: Matrix Metalloproteinase Inhibitors." *Stem Cells* 17(4):237–40.
- Rykova, EY. et al. 2012. "Cell-Free and Cell-Bound Circulating Nucleic Acid Complexes: Mechanisms of Generation, Concentration and Content." *Expert Opinion on Biological Therapy* 12(S1):S141–53.
- Sakalová, A. et al. 2001. "Retrolective Cohort Study of an Additive Therapy with an Oral Enzyme Preparation in Patients with Multiple Myeloma." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 47 Suppl:S38–44.
- Salganik, RI., RP. Martynova, NA. Matienko, and GM. Ronichevskaya. 1967. "Effect of Deoxyribonuclease on the Course of Lymphatic Leukaemia in AKR Mice." *Nature* 214(5083):100–102.
- Samos, J., DC. García-Olmo, MG. Picazo, A. Rubio-Vitaller, and D. García-Olmo. 2006. "Circulating Nucleic Acids in Plasma/serum and Tumor Progression: Are Apoptotic Bodies Involved? An Experimental Study in a Rat Cancer Model." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075:165–73.
- Schwarzenbach, H., DSB. Hoon, and K. Pantel. 2011. "Cell-Free Nucleic Acids as Biomarkers in Cancer Patients." *Nature reviews. Cancer* 11(6):426–37. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3066>).
- Seruga, B. et al. 2010. "Absolute Benefits of Medical Therapies in Phase III Clinical Trials for Breast and Colorectal Cancer." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21(7):1411–18. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951955>).
- Shklyayeva, OA. et al. 2007. "Cancer-Suppressive Effect of RNase A and DNase I." *Doklady. Biochemistry and biophysics* 420(1):134–38.
- Smyth, E. 2003. "The Trouble with Inhibitors." *Signalling Scissors, Horizon Symposia* (October):1–4. Retrieved (<http://www.student.city.ac.uk/~ew277/hor/proteases/background/hor011.pdf>).

- Sorenson, G. D. et al. 1994. "Soluble Normal and Mutated Dna-Sequences From Single-Copy Genes in Human Blood." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 3(February):67–71.
- Soto, AM. and C. Sonnenschein. 2011. "The Tissue Organization Field Theory of Cancer: A Testable Replacement for the Somatic Mutation Theory." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33(5):332–40.
- Sparano, JA. et al. 2004. "Randomized Phase III Trial of Marimastat Versus Placebo in Patients With Metastatic Breast Cancer Who Have Responding or Stable Disease After First-Line Chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2196." *Journal of Clinical Oncology* 22(23):4683–90.
- Steffen, C. and J. Menzel. 1985. "[Basic Studies on Enzyme Therapy of Immune Complex Diseases]." *Wiener klinische Wochenschrift* 97(8):376–85. Retrieved March 24, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3158122>).
- Sugihara, S. et al. 1990. "Serine Protease-Induced Enhancement of Blood-Borne Metastasis of Rat Ascites Tumour Cells and Its Prevention with Deoxyribonuclease." *British journal of cancer* 62(4):607–13.
- Sugihara, S. et al. 1993. "Deoxyribonuclease Treatment Prevents Blood-Borne Liver Metastasis of Cutaneously Transplanted Tumour Cells in Mice." *British journal of cancer* 67(1):66–70.
- Swiss Institute of Bioinformatics. 2016. "ExpASy - PeptideCutter." Retrieved May 16, 2016 ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)).
- Tamkovich, SN. et al. 2006. "Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075:191–96.
- Trejo-Becerril, C. et al. 2012. "Cancer Progression Mediated by Horizontal Gene Transfer in an In Vivo Model." *PLoS ONE* 7(12):1–12.
- Trejo-Becerril, C. 2014. "El DNA Libre En Circulacion Y Su Papel En La Transformacion Celular." Universidad Nacional Autónoma de México.
- Trejo-Becerril, C. et al. 2015. "Antitumour Effects of Systemic DNase I and Proteases in an in Vivo Model." *Integrative Cancer Therapies*.
- Uribe-Querol, E. and C. Rosales. 2015. "Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin." *Journal of immunology research* 2015:983698. Retrieved February 1, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4706937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Vasioukhin, V. et al. 1994. "Point Mutations of the N-Ras Gene in the Blood Plasma DNA of Patients with Myelodysplastic Syndrome or Acute Myelogenous Leukaemia." *British journal of haematology* 86(4):774–79.
- Vellard, M. 2003. "The Enzyme as Drug: Application of Enzymes as Pharmaceuticals." *Current Opinion in Biotechnology* 14(4):444–50.
- Vera-Badillo, FE., M. Al-Mubarak, AJ. Templeton, and E. Amir. 2013. "Benefit and Harms of New Anti-Cancer Drugs." *Current Oncology Reports* 15(3):270–75.

- Vlassov, VV., PP. Laktionov, and EY. Rykova. 2007. "Extracellular Nucleic Acids." *BioEssays* 29(7):654–67.
- Wagener, JS. and O. Kupfer. 2012. "Dornase Alfa (Pulmozyme)." *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 18(6):609–14.
- Wald, M. et al. 2001. "Mixture of Trypsin, Chymotrypsin and Papain Reduces Formation of Metastases and Extends Survival Time of C57Bl6 Mice with Syngeneic Melanoma B16." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 47 Suppl:S16–22.
- Wald, M. 2008. "Exogenous Proteases Confer a Significant Chemopreventive Effect in Experimental Tumor Models." *Integr Cancer Ther* 7(4):295–310.
- Wald, M., T. Olejár, P. Poucková, and M. Zadinová. 1998. "Proteinases Reduce Metastatic Dissemination and Increase Survival Time in C57Bl6 Mice with the Lewis Lung Carcinoma." *Pharmacology Letters* 63(17):237–43.
- Wald, M., P. Poucková, D. Hlousková, M. Alternová, and T. Olejár. 1999. "The Influence of Trypsin, Chymotrypsin and Papain on the Growth of Human Pancreatic Adenocarcinoma Transplanted to Nu/nu Mice." *European Journal of Cancer* 35(Supplement 4):4.
- Wald, M., E. Zavadová, P. Poucková, M. Zadinová, and M. Boubelik. 1998. "Polyenzyme Preparation Wobe-Mugos Inhibits Growth of Solid Tumors and Development of Experimental Metastases in Mice." *Pharmacology Letters* 62(3):43–48.
- Wen, Fushi, Alex Shen, Andrew Choi, Eugene W. Gerner, and Jiaqi Shi. 2013. "Extracellular DNA in Pancreatic Cancer Promotes Cell Invasion and Metastasis." *Cancer Research* 73(14):4256–66.
- World Health Organization. 2012. "GLOBOCAN - Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012." *World Health Organization Web Page*. Retrieved May 20, 2015 ([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)).
- World Health Organization. 2014a. *Noncommunicable Diseases Country Profiles 2014*.
- World Health Organization. 2014b. *World Cancer Report*. edited by Bernard Stewart and Christopher Wild. IARC Nonserial Publication.
- World Health Organization. 2015. "Cancer." *World Health Organization Web Page*. Retrieved May 25, 2015 (<http://www.who.int/topics/cancer/en/>).
- World Medical Association. 2013. "World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects." *JAMA* 310:2191–94. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141714>).
- Yamashita, K., K. Mimori, H. Inoue, M. Mori, and D. Sidransky. 2003. "A Tumor-Suppressive Role for Trypsin in Human Cancer Progression." *Cancer research* 63(20):6575–78. Retrieved March 25, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583448>).
- Zavadová, E., L. Desser, and T. Mohr. 1995. "Stimulation of Reactive Oxygen Species Production and Cytotoxicity in Human Neutrophils in Vitro and after Oral Administration of a Polyenzyme Preparation." *Cancer biotherapy* 10(2):147–52.

Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)95852-W](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049(95)95852-W)).

Zavadová, E., CA. Savary, S. Templin, CF. Verschraegen, and RS. Freedman. 2001.  
“Maturation of Dendritic Cells from Ovarian Cancer Patients.” *Cancer Chemother  
Pharmacol* 48(4):289–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710629>).

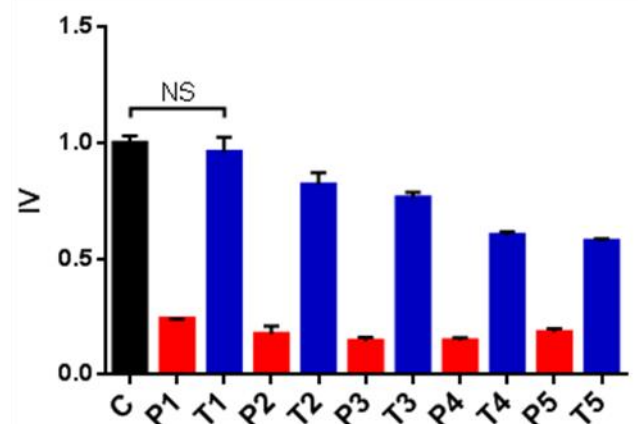
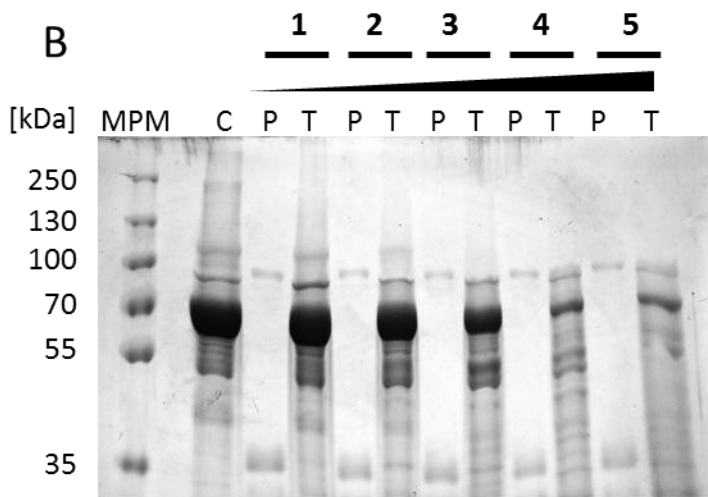
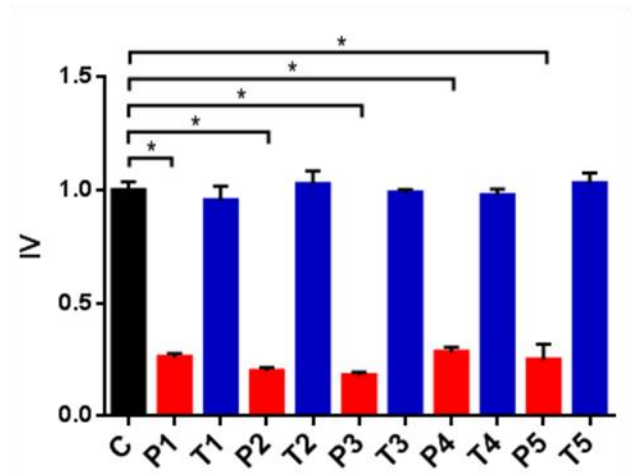
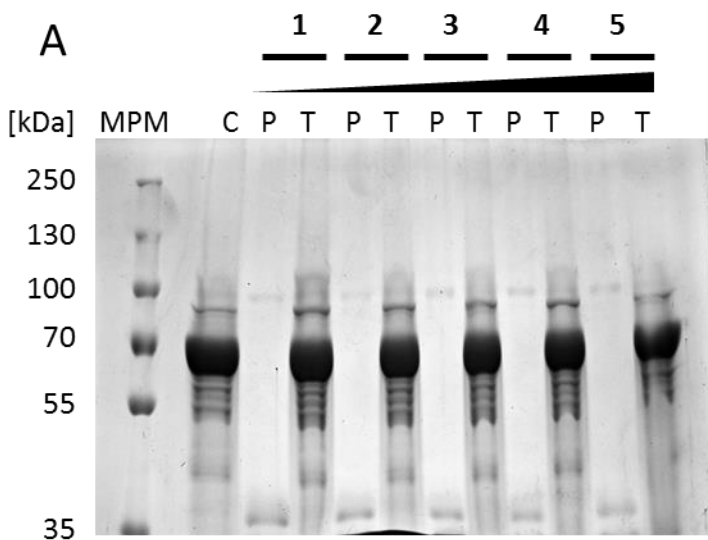
## ANEXO

### ANEXO 1. Sitios de corte de Papaína, Quimiotripsina y Tripsina.

	P3	P2	P1	↓	P'1	P'2
Papaína	Xaa	A/V/L/I/F/W/Y	R/K		no V	Xaa
	Xaa	Xaa	F/L/Y		no P	Xaa
Quimiotripsina	Xaa	Xaa	W		no M/P	Xaa
	Xaa	Xaa	M		no P/Y	Xaa
	Xaa	Xaa	H		no D/M/P/W	Xaa
	Xaa	Xaa	K/R		no P	Xaa
Tripsina	Xaa	W	K		P	Xaa
	Xaa	M	R		P	Xaa

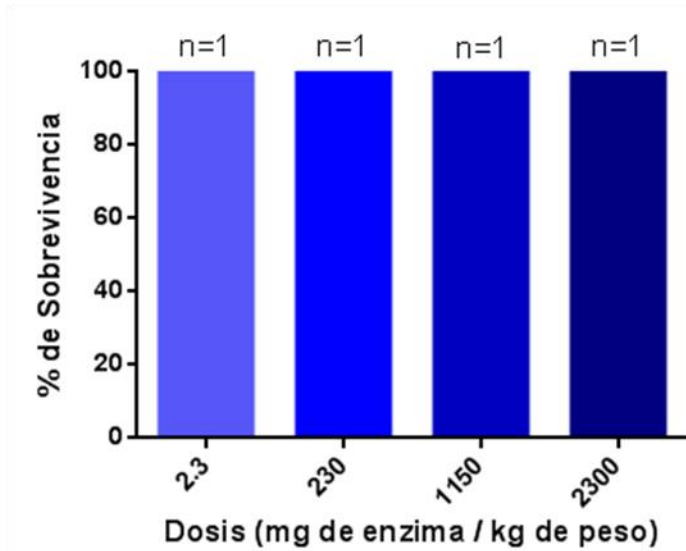
Xaa = Cualquier residuo

↓ = Sitio de corte

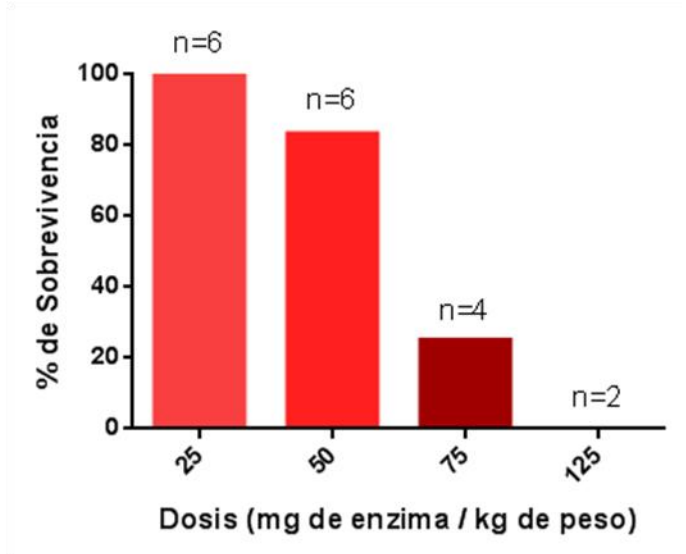


**ANEXO 2. Inhibición en la actividad de Tripsina por componentes séricos.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) correspondientes de suero control (A) e inactivado mediante calor (B), tratados posteriormente *in vitro* con concentraciones crecientes de papaína o tripsina. Concentraciones: 1) 0.125 mg/mL, 2) 0.183 mg/mL, 3) 0.214 mg/mL, 4) 0.293 mg/mL, 5) 0.31 mg/mL, \* $p < 0.0005$

A



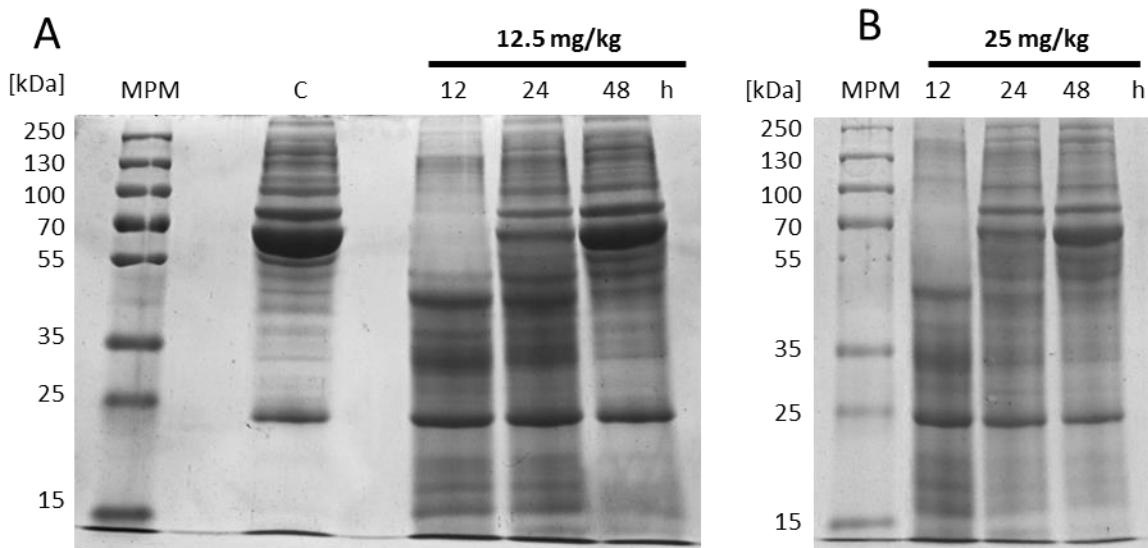
B



**ANEXO 3. Dosis máxima tolerada.** Se utilizaron ratones BALB/c machos a los cuales se les administró una dosis intraperitoneal única de DNasa I (A) o papaína (B). Para DNasa I se hicieron 4 grupos, en los cuales se administró 2.3, 230, 1150 y 2300 mg de enzima por kg de peso del animal (mg/kg). Para papaína se hicieron también cuatro grupos, en los que se emplearon las dosis de 25, 50, 75 y 125 mg/kg.

	Control	3 Min	30 Min	1 Hr	18 Hrs	24 Hrs
TT	15.25 s	+ 300 s	+ 300 s	+ 300 s	+ 300 s	18 s
TTPA	19.3 s	+ 300 s	+ 300 s	+ 300 s	+ 300 s	20.5 s
TP	-	-	-	-	-	-

**ANEXO 4. Aumento en los tiempos de coagulación posteriores a la administración de papaína.** Se utilizaron once ratones BALB/c, los cuales fueron administrados vía intraperitoneal con papaína (25 mg/kg) y sacrificados a diferentes tiempos para obtener sangre. Los sueros se llevaron al laboratorio clínico del Instituto Nacional de Cancerología y en un analizador de coagulación (Sysmex CA-1500) se evaluaron los tiempos de protrombina (TP), tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPA) y tiempo de trombina (TT). Por ratón se utilizaron 500 µL de suero se para evaluar los tres parámetros.



**ANEXO 5. Degradación de proteínas de suero de ratones BALB/c por acción de papaína.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de suero de ratones administrados intraperitonealmente con papaína; (A) 12.5 y (B) 25 mg/kg. Las muestras de suero fueron obtenidas 12, 24 y 48 h posterior a la administración.



## ANEXO 6. Resultados de la prueba ANOVA-Tukey [Concentración DNA]

### Sujetos Sanos

#### Resumen ANOVA

F	73.64
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.9485

#### Comparación Múltiple Tukey

	P Valor Ajustado	¿Significativo?
C vs. PQT	0.0010	Sí
C vs. D	0.3277	No
C vs. PQTD	< 0.0001	Sí
PQT vs. D	0.0203	Sí
PQT vs. PQTD	< 0.0001	Sí
D vs. PQTD	< 0.0001	Sí

### Pacientes con Cáncer de Mama

#### Resumen ANOVA

F	67.90
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.9444

#### Comparación Múltiple Tukey

	P Valor Ajustado	Significativo?
C vs. PQT	0.0005	Sí
C vs. D	0.1679	No
C vs. PQTD	< 0.0001	Sí
PQT vs. D	< 0.0001	Sí
PQT vs. PQTD	0.0017	Sí
D vs. PQTD	< 0.0001	Sí

## ANEXO 7. Resultados de la prueba ANOVA-Tukey [Integridad proteínas]

### Sujetos Sanos

#### Resumen ANOVA

F	21.86
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.8644

#### Comparación Múltiple Tukey

	P Valor Ajustado	¿Significativo?
C vs. P	< 0.0001	Sí
C vs. Q	0.9993	No
C vs. T	0.9991	No
C vs. PQ	0.0003	Sí
C vs. PT	0.0002	Sí
C vs. TQ	0.9987	No
C vs. PQT	< 0.0001	Sí
P vs. Q	< 0.0001	Sí
P vs. T	< 0.0001	Sí
P vs. PQ	0.7584	No
P vs. PT	0.8154	No
P vs. TQ	< 0.0001	Sí
P vs. PQT	0.9999	No
Q vs. T	> 0.9999	No
Q vs. PQ	0.0011	Sí
Q vs. PT	0.0008	Sí
Q vs. TQ	0.9437	No
Q vs. PQT	< 0.0001	Sí
T vs. PQ	0.0011	Sí
T vs. PT	0.0009	Sí
T vs. TQ	0.9383	No
T vs. PQT	< 0.0001	Sí
PQ vs. PT	> 0.9999	No
PQ vs. TQ	< 0.0001	Sí
PQ vs. PQT	0.9340	No
PT vs. TQ	< 0.0001	Sí
PT vs. PQT	0.9596	No
TQ vs. PQT	< 0.0001	Sí

### Pacientes con Cáncer de Mama

#### Resumen ANOVA

F	31.05
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.8717

#### Comparación Múltiple Tukey

	P Valor Ajustado	¿Significativo?
C vs. P	< 0.0001	Sí
C vs. Q	0.9562	No
C vs. T	0.9969	No
C vs. PQ	< 0.0001	Sí
C vs. PT	< 0.0001	Sí
C vs. TQ	0.9940	No
C vs. PQT	< 0.0001	Sí
P vs. Q	< 0.0001	Sí
P vs. T	< 0.0001	Sí
P vs. PQ	0.9976	No
P vs. PT	0.9972	No
P vs. TQ	< 0.0001	Sí
P vs. PQT	0.9986	No
Q vs. T	> 0.9999	No
Q vs. PQ	< 0.0001	Sí
Q vs. PT	< 0.0001	Sí
Q vs. TQ	0.5971	No
Q vs. PQT	< 0.0001	Sí
T vs. PQ	< 0.0001	Sí
T vs. PT	< 0.0001	Sí
T vs. TQ	0.8298	No
T vs. PQT	< 0.0001	Sí
PQ vs. PT	> 0.9999	No
PQ vs. TQ	< 0.0001	Sí
PQ vs. PQT	0.9059	No
PT vs. TQ	< 0.0001	Sí
PT vs. PQT	0.9001	No
TQ vs. PQT	< 0.0001	Sí

## ANEXO 8. Resultados de la prueba ANOVA-Dunnett [Concentración DNA]

### Ratas Sanas

Resumen ANOVA	
F	24.94
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.9089

Comparación Múltiple Dunnet		
	P Valor Ajustado	Significativo?
0 vs. 7.5	0.2930	No
0 vs. 15	< 0.0001	Sí
0 vs. 30	0.0497	Sí
0 vs. 60	0.0074	Sí

### Ratas Tumor

Resumen ANOVA	
F	104.0
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.9765

Comparación Múltiple Dunnet		
	P Valor Ajustado	Significativo?
0 vs. 7.5	< 0.0001	Sí
0 vs. 15	0.0056	Sí
0 vs. 30	0.4973	No
0 vs. 60	0.0996	No

## ANEXO 9. Resultados de la prueba ANOVA-Dunnett [Integridad Proteínas]

### Ratas Sanas

Resumen ANOVA	
F	67.82
P valor	< 0.0001
Las diferencias entre los promedios son estadísticamente significativas? (P < 0.05)	Sí
R <sup>2</sup>	0.9644

Comparación Múltiple Dunnet		
	P Valor Ajustado	¿Significativo?
0 vs. 7.5	< 0.0001	Sí
0 vs. 15	< 0.0001	Sí
0 vs. 30	< 0.0001	Sí
0 vs. 60	< 0.0001	Sí

**ANEXO 10. Resultados de la prueba t Student [Crecimiento Tumoral]**

<b>Control vs PQT</b>	
P valor	< 0.0001
¿Significativamente diferente? (P < 0.05)	No
P valor de una o dos colas	Dos colas
t, df	t=0.08885 df=22

<b>Control vs D</b>	
P valor	0.9499
¿Significativamente diferente? (P < 0.05)	No
P valor de una o dos colas	Dos colas
t, df	t=0.06352 df=22

<b>Control vs PQTD</b>	
P valor	0.0118
¿Significativamente diferente? (P < 0.05)	Sí
P valor de una o dos colas	Dos colas
t, df	t=2.746 df=22