



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

POTENCIAL PARTICIPACIÓN DEL DNA CIRCULANTE EN EL PROCESO DE
CARCINOGENESIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.B.P. CATALINA COBOS URIBE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ELIZABETH LANGLEY MCCARRON
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

DR. MARCO A. VELASCO VELÁZQUEZ
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Marzo, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

De nuevo, doy gracias a la vida por permitirme concluir otro objetivo. Estoy feliz de lograrlo y de haber conocido a tantas personas, que me han enseñado e inspirado a hacer y ser mucho más.

A mis sinodales,

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dr. Greco Hernández Ramírez

Dra. Ana María Salazar Martínez

Dra. Verónica Rocío Vásquez Garzón

Dra. Marcela Lizano Soberón

Por su interés y tiempo brindado, su guía y consejos proporcionados; no solo en lo referente a mi tesis, sino también en mi desarrollo profesional.

¡Muchas gracias!

A mi comité tutorial,

Dr. Alfonso Dueñas González

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Por su gran apoyo y guía a lo largo de mi proyecto de maestría.

Al personal de apoyo del Posgrado de Ciencias Bioquímicas, especialmente a Leticia García; será su trabajo, pero me consta que lo hace excelentemente bien, siempre con una sonrisa en su rostro.

Estoy profundamente agradecida con las personas que tuve la oportunidad de conocer en el Cinvestav, me apoyaron enormemente en este proyecto; no solo me guiaron, me aceptaron en su laboratorio sin ninguna restricción. Agradezco principalmente al Dr. Saúl Villa Treviño, que sin ser su alumna, me trató como a una. A Samia Fattel (Samy), que hoy no está con nosotros, por su gran amistad y por siempre tener un consejo y sonrisa esperándome; me apoyó enormemente en este proyecto. Espero que donde quiera que este siga con esa sonrisa y ganas de ver a un mundo feliz.

Otro agradecimiento especial a la Dra. Verónica Vásquez Garzón, quien aunque no pude ser parte oficial de mi comité tutorial, me apoyó incondicionalmente, me apuró cuando fue necesario, me guió; todo esto incluso cuando estaba muy lejos. Me sorprendió mucho este apoyo y lo agradezco enormemente ¡Gracias, Vero!

Del INCan estoy muy contenta y agradecida por hacer contado con el apoyo incondicional de la Dra. Catalina Trejo Becerril, es una de las personas más lindas que he conocido, y una gran “tutora”, ¡Muchas gracias, Caty!

Al Dr. Enrique Pérez Cárdenas , por su gran apoyo y aún más grandes enseñanzas en el bioterio y el laboratorio. Por sus porras “sutiles” para lograr titularme y por demostrar que enseñar y ayudar a los demás no le quita nada a nadie.

A la Dra. Lucía Taja Chayeb y la Dra. Alma Chávez, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Epigenética, ¡Aprendí mucho de ustedes!

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por sus porras, sus puntos de vista y ayuda a lo largo de esta maestría, principalmente a Mau, Blanca y Dessy.

A los amigos que no veo, que quiero y adoro. Estamos bien y así seguiremos.

Y finalmente, a mis papás y hermanos, que me echan porras sin saberlo, que son mi roca, mi inspiración y a veces hasta mi fuerza.

¡¡Muchas gracias a todos!!

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología y en el Laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del Cinvestav, bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González y la colaboración de la Dra. Verónica Rocío Vásquez Garzón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. RESUMEN	2
2. MARCO TEÓRICO	3
3. ANTECEDENTES	10
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. HIPÓTESIS.....	12
6. OBJETIVO PRINCIPAL.....	13
7. OBJETIVOS PARTICULARES	13
8. MATERIALES Y MÉTODOS	14
9. RESULTADOS	24
10. DISCUSIÓN.....	32
11. CONCLUSIÓN.....	39
12. BIBLIOGRAFÍA	41

ABREVIATURAS

2-AAF	2-acetil amino fluoreno
DEN	Dietilnitrosamina
DMH	Dimetilhidrazina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAcir	DNA circulante
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
HP	Hepatectomía parcial
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
min	Minutos
MHR	Modelo del hepatocito resistente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SFB	Suero fetal bovino
THG	Transferencia horizontal de genes

1. RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas en el mundo. Cada año diferentes grupos de investigación reportan potenciales tratamientos contra el cáncer; sin embargo, sigue siendo un problema de salud pública, por lo que el continuo estudio de esta enfermedad es necesario para su mejor entendimiento y así poder en un futuro disminuir su avance en contra de la salud de la población mundial.

En este sentido, en los últimos años se ha estudiado la presencia de ácidos nucleicos circulantes, entre ellos el DNA circulante, en el plasma de pacientes con cáncer y su uso como potencial biomarcador de esta enfermedad. Además, se ha reportado su capacidad para transformar células en experimentos *in vitro* y de promover la tumorigénesis en modelos *in vivo*; incluso se ha encontrado que este DNA es captado por células susceptibles e integrado a su genoma. Y aunque se sospecha su participación en la carcinogénesis, esta aún no ha sido demostrada.

El objetivo de este trabajo fue determinar la etapa del proceso de carcinogénesis en la cual participa el DNA circulante. Para esto se emplearon dos modelos murinos de carcinoma hepatocelular, en los cuales es posible evaluar las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis mediante la detección y cuantificación de la expresión de la enzima gamma glutamil transpeptidasa en el tejido hepático. Se inocularon células humanas SW480 en las ratas sometidas a los modelos de hepatocarcinogénesis como fuente de DNA circulante, y la transferencia horizontal de genes de origen humano se demostró mediante una PCR específica para las secuencias repetitivas humanas *Alu* y el gen mutado de K-ras específico de la línea celular SW480. Es así como se evidenció la participación del DNA circulante como un agente promotor en el desarrollo del cáncer.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades del cáncer

“Cáncer” es el término empleado para englobar a un amplio y complejo grupo de enfermedades, las cuales pueden presentarse en cualquier órgano del cuerpo y afectan tanto a hombres como mujeres de distintas edades. Es una de las enfermedades más estudiadas en el mundo, figura dentro de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes asociadas en el año 2012 (1).

El cáncer se caracteriza por la presencia de células anormales, las cuales exhiben una división celular descontrolada y la capacidad de invadir tejidos cercanos, formando una masa denominada, tumor primario. Además, las células pertenecientes a este tumor pueden circular a través del torrente sanguíneo o linfático y desplazarse así a diferentes órganos distantes del cuerpo; a este fenómeno se le conoce como metástasis (2-4).

El desarrollo del cáncer consta de varias etapas durante las cuales las células van adquiriendo modificaciones genéticas y epigenéticas, lo que les confiere características propias de una célula cancerosa; tales como una proliferación celular descontrolada, resistencia a la muerte celular, inducción de angiogénesis, evasión de la respuesta inmune y la capacidad de invasión y metástasis. A estas modificaciones genéticas se les conoce como mutaciones, y pueden ser heredadas (5% de los casos) o adquiridas (95% de los casos) al estar en contacto con ciertos agentes ambientales que dañan el DNA celular; a estos agentes se les conoce como carcinógenos (5-9).

Hoy en día, el modelo más aceptado para explicar el desarrollo del cáncer es el de la carcinogénesis, el cual describe la transformación de una célula normal a una población de células neoplásicas (10,11) .

2.2. Carcinogénesis

La carcinogénesis es el término que describe al proceso dinámico mediante el cual se desarrolla el cáncer. Abarca el tiempo que transcurre desde la primera exposición a un carcinógeno, hasta la aparición de lesiones neoplásicas visibles. Consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Fig.1); cada una se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos que conllevan alteraciones genéticas y epigenéticas (12-14).

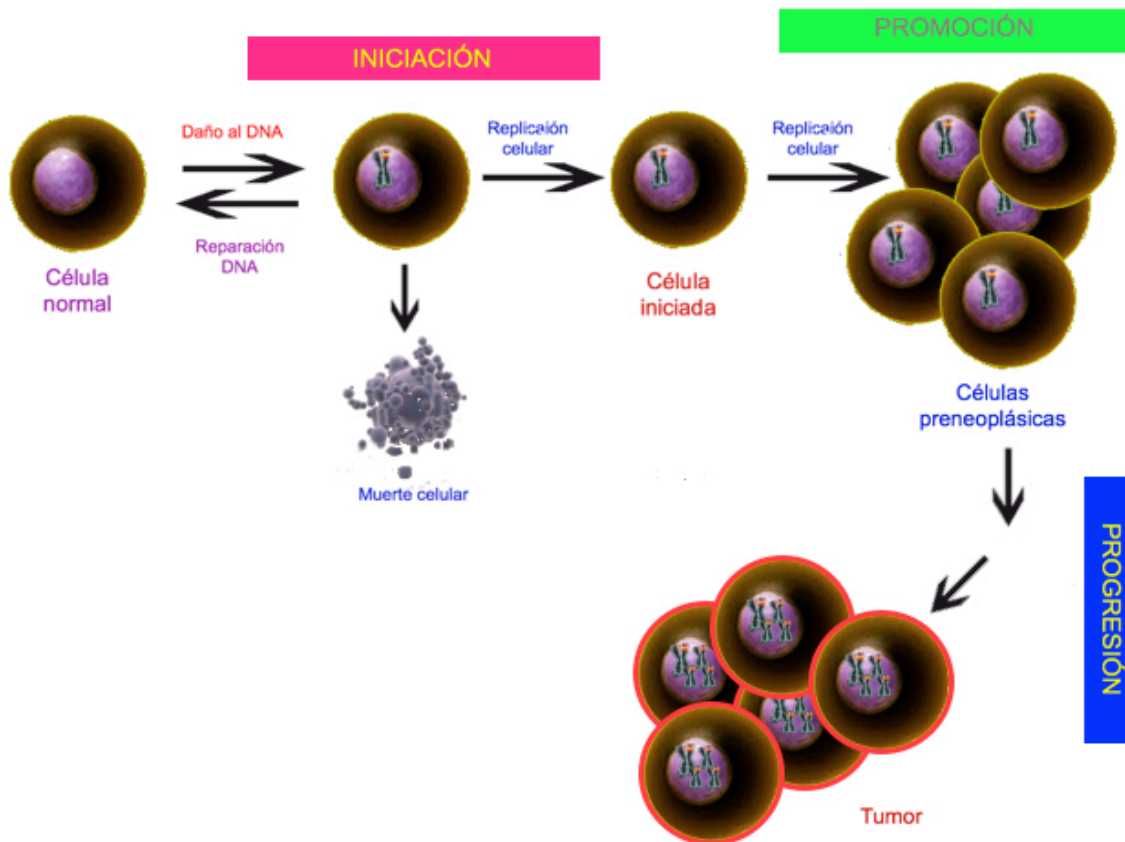


Figura 1. Esquema representativo de las tres etapas del proceso de carcinogénesis (Modificado de Oliveira *et al.*, 2007).

El proceso de carcinogénesis se puede presentar de forma natural o puede ser inducido por agentes químicos, físicos o biológicos denominados carcinógenos (Tabla 1). Existe una gran variedad de carcinógenos y estos pueden participar en cualquier etapa de la carcinogénesis (13).

Tabla 1. Clasificación y ejemplos de carcinógenos en base a su naturaleza (Modificado de Pitot y Dragan, 1991 (13)).

Carcinógeno	Ejemplos
Físico	Radiación ionizante (Rayos X, Rayos gamma) y Radiación UV.
Biológico	Virus (Virus del papiloma humano), bacterias (<i>Helicobacter pylori</i>), parásitos (<i>Schistosoma mansoni</i>).
Químico	Hidrocarburos policíclicos, aminas aromáticas, hormonas, metales.

En la Fig. 1 se representa el proceso carcinogénesis; en donde una célula normal al presentar daño en su DNA, ya sea debido a una mutación espontánea o al estar expuesta a un carcinógeno, activa sus mecanismos de reparación para así mantenerse como una célula normal; sin embargo, cuando la célula se encuentra en estado proliferativo, el daño al DNA no alcanza a ser reparado y por lo tanto se fija; a esto se le conoce como *iniciación*, es la primera etapa de la carcinogénesis, se caracteriza por ser rápida, irreversible y permanente. Una célula iniciada presenta una respuesta alterada a su microambiente y puede mantenerse en este estado latente por años; puede incluso, jamás progresar hacia una neoplasia. Durante la *promoción*, la célula iniciada al entrar en contacto con un agente promotor experimenta una expansión clonal que da lugar a un conjunto de células preneoplásicas; esta expansión clonal es selectiva, es decir, únicamente las células iniciadas pueden proliferar en presencia de un promotor. Las células normales no experimentan este proceso, ya que carecen de la ventaja fenotípica que proporciona la iniciación. La promoción es la única etapa reversible de la carcinogénesis y es modulada por una variedad de factores, incluyendo la frecuencia con la que es administrado el promotor, la edad y la dieta. Finalmente, durante la *progresión* las células preneoplásicas continúan replicándose y

adquiriendo un mayor número de mutaciones, las cuales les confiere las características malignas de una célula neoplásica, el conjunto de dichas células formara el tumor (8,13-16).

La naturaleza multietapa del proceso de carcinogénesis ha sido demostrada en diferentes órganos de mamíferos, principalmente en el hígado de ratas y en la epidermis de ratones; los roedores, por su corto periodo de vida y su alta capacidad reproductora, son empleados comúnmente para investigar enfermedades como el cáncer (17).

En la actualidad, existen diversos modelos *in vivo* para el estudio del proceso de carcinogénesis. Estos modelos contribuyen enormemente a la obtención de nuevo conocimiento sobre la fisiopatología del cáncer, también son fundamentales para determinar la capacidad carcinogénica de diferentes compuestos, al igual que el potencial de nuevas moléculas como agentes terapéuticos (18).

Los modelos murinos de hepatocarcinogénesis, por ejemplo, permiten una mejor cuantificación bioquímica de las lesiones neoplásicas (17). Para evaluar el desarrollo neoplásico se emplean técnicas como histoquímicas, tinciones histológicas y de PCR (8,19-23).

Entre los modelos de hepatocarcinogénesis, están el Modelo del Hepatocito Resistente (MHR) (24) y el Modelo de Yoshiji (19); y aunque los componentes de ambos modelos son diferentes, su función es prácticamente la misma. El agente iniciador, en ambos modelos, es la Dietilnitrosamina (DEN); este es un carcinógeno químico, cuya actividad carcinogénica es ejercida de dos formas: una genotóxica, en donde alquila al DNA celular, lo daña y lleva a una degeneración celular y una que induce la formación de especies reactivas de oxígeno a través de la activación del citocromo P450 en los hepatocitos (18,25,26). Todo esto da lugar a células iniciadas que presentan una ventaja fenotípica, de la cual carecen las células normales.

En el MHR el promotor es el 2- Acetil amino fluoreno (2-AAF) acompañado de una hepatectomía parcial (HP). El 2-AAF posee un efecto mitoinhibitorio sobre las células normales, con lo cual bloquea la replicación de su DNA; las células iniciadas poseen una ventaja fenotípica que las protege del efecto tóxico del 2-AAF. La HP es un estímulo proliferativo que junto con el 2-AAF permite la proliferación selectiva de las células iniciadas dando lugar a la formación de lesiones preneoplásicas, las cuales posteriormente serán neoplásicas (27).

En el modelo de Yoshiji, después de la iniciación con la DEN se administra el agente promotor, que en este caso es el fenobarbital (FB); aún no se conoce como es que el FB ejerce su actividad promotora, diversos estudios han reportado esta actividad en roedores. En este modelo el FB, al igual que el 2-AAF, inhibe a las células normales, lo cual permite el desarrollo de las células iniciadas (28).

En cualquier modelo es importante poder evaluar el desarrollo de las lesiones preneoplásicas; por lo que generalmente se buscan marcadores específicos de este tipo de lesiones. En el MHR y en el Modelo de Yoshiji se determina la expresión de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (GGT) (24). La GGT es una glicoproteína de membrana celular que participa en el metabolismo del glutatión y sus conjugados, detoxificando a las células de xenobióticos; por lo que se sugiere que esta enzima provee una ventaja de crecimiento a las células focales durante la carcinogénesis, debido a la resistencia que confiere contra la toxicidad de los carcinógenos. En lesiones preneoplásicas en modelos de hepatocarcinogénesis murinos, la enzima GGT es inducida a altos niveles; por lo cual se utiliza como marcador de lesiones pre- y neoplásicas. Es posible evidenciar su actividad por medio de una histoquímica enzimática en cortes de tejido hepático. Como resultado de esta prueba se observan lesiones cuantificables de color rojo y bordes regulares (19,29-34).

2.3. DNA circulante en cáncer

“*DNA circulante (DNACir)*” es el nombre que se le ha dado a las moléculas de DNA que se encuentran en el espacio extracelular, en los fluidos fisiológicos circulantes (35,36). Es posible detectar DNACir en la sangre de personas sanas y en la de pacientes cursando con diferentes patologías; como lupus eritematoso, infarto al miocardio, quemaduras, colitis, trasplante de órganos, entre otros; incluyendo el cáncer, siendo éste el tema central del presente trabajo (37-44).

El primer reporte que se tiene del DNACir es el de Mendel y Metais en 1948. Ellos detectaron DNA en la sangre de pacientes con cáncer y observaron que la concentración de DNACir en la sangre de pacientes con cáncer era mayor (5-1500 ng/mL) que en la de personas sanas (1-5 ng/mL) (35,45,46). Posteriormente, se reportó que el DNACir presenta las mismas alteraciones genéticas y epigenéticas que el DNA genómico de las células tumorales, por lo que se determinó que el origen del DNACir en pacientes con cáncer es tumoral. Esta característica hace del DNACir un biomarcador ideal, así lo demuestra un gran número de estudios sobre el uso del DNACir en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del cáncer. La detección de esta molécula en la sangre y otros fluidos corporales ofrece dos grandes ventajas: una invasión mínima al paciente y una gran accesibilidad a muestra biológica; a este tipo de estudio se le denomina “biopsia líquida” (35,47,48).

En cuanto a la biología propia del DNACir en cáncer, aún falta mucho por dilucidar; ya que aunque se conoce el origen tumoral de esta molécula, poco se sabe acerca de los mecanismos de su liberación al medio extracelular. Los reportes mencionan que el DNACir puede ser liberado por células apoptóticas, o necróticas, o bien por secreción activa; lo más probable es que esta molécula este sienta liberada por estas tres vías de manera simultánea. Otro aspecto importante, es la forma en la que el DNA se encuentra en circulación; ya que a pesar de las nucleasas en nuestro organismo capaces de degradar los ácidos nucleicos extracelulares, es posible detectar altas concentraciones de esta molécula en la sangre de pacientes

con cáncer. Existen reportes que mencionan que en circulación el DNACir se encuentra en forma de nucleosomas, dentro de exosomas o acoplado a un complejo lipoproteico llamado virtosoma. Todas estas estructuras podrían estar protegiendo al DNACir de la degradación enzimática (35,36,49-52).

En cuanto a su función biológica, existen estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, que reportan la capacidad transformante del DNACir; por ejemplo Anker *et al.* en 1994 y García-Olmo *et al.* 2010, observaron que tanto el sobrenadante de células cancerosas como el plasma de pacientes con cáncer contienen DNACir y que este puede ser captado por células susceptibles y así transformarlas a un fenotipo maligno (53,54). En base a estas observaciones se postuló la teoría de la genometástasis (Fig. 2), la cual postula que las células de un tumor primario en un paciente con cáncer secretan DNACir, y este al llegar al torrente sanguíneo es transportado, ya sea acoplado a proteínas o dentro de exosomas o en el virtosoma, a órganos lejanos y captado por células susceptibles, transformándolas y generando metástasis (55).

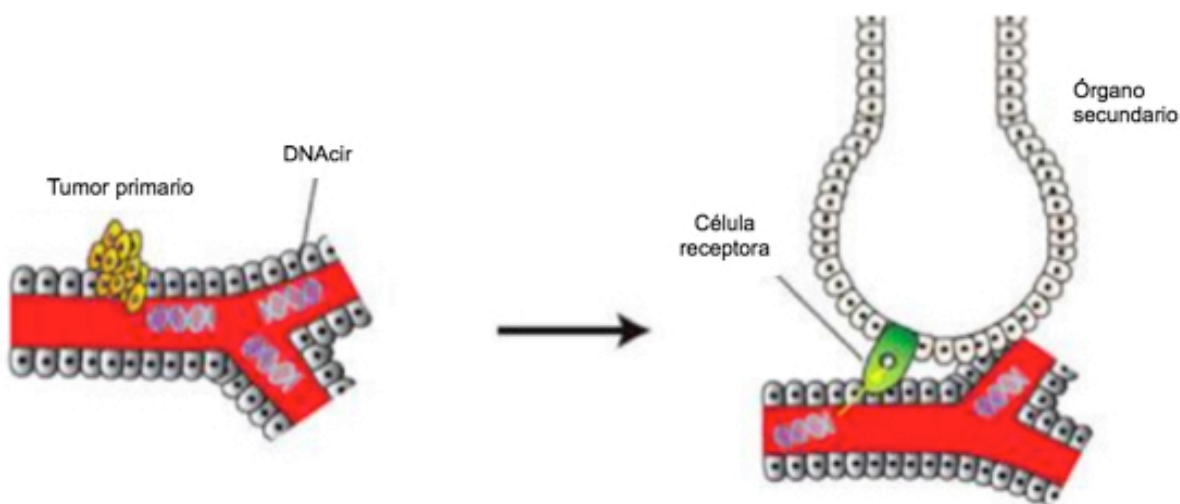


Figura 2. Esquema representativo de la teoría de la genometástasis (56)

En la actualidad, aunque se conozcan diferentes formas del DNACir, se ha sugerido la capacidad transformante al virtosoma, el complejo lipoproteico secretado por células viables y compuesto por DNA, RNA, fosfolípidos y polimerasas de DNA y RNA dependientes de DNA (52).

3. ANTECEDENTES

En varios experimentos *in vitro* se han observado que al exponer fibroblastos NIH3T3 de ratón al sobrenadante de células humanas de adenocarcinoma de colon SW480 o al plasma de pacientes con cáncer de colon, estas se transforman y adquieren secuencias humanas, lo que confirma la transferencia horizontal de genes (THG) provenientes del DNACir presente en el sobrenadante o plasma y su capacidad para transformar células susceptibles (53,54). Esta transformación celular no se observó en experimentos con fibroblastos humanos provenientes de un cultivo primario normal, lo cual sugiere que el DNACir no induce la transformación de células sin un daño previo (57). En otro reporte, realizado en el laboratorio de Epigenética del INCan, se observó que al tratar ratas Wistar con únicamente células SW480 como fuente de DNACir, no se presentó daño en ningún órgano de todos los animales incluidos en el estudio; lo cual confirma lo observado *in vitro*, es decir, que el DNACir no es capaz de inducir transformación en células totalmente normales. Además, el grupo Trejo-Becerril *et al.* (2012) demostró la participación de la THG en la progresión del cáncer. Para ello se empleó un modelo murino de cáncer de colon, donde la dimetilhidrazina (DMH) se utilizó como un inductor de la carcinogénesis. Al inocular células SW480 como fuente de DNACir, se observó un aumento en el número de tumores en el colon de las ratas tratadas y metástasis en diversos órganos. Al analizar el material genético de las células de estos tumores por PCR y secuenciación, se encontraron secuencias humanas (*Alu*, *K-ras*, *GRB2*, *CADH8* y *Rab30*) provenientes de las células SW480, con lo cual se demuestra la THG provenientes del DNACir secretado por las células SW480 y su participación en la progresión del cáncer (57).

Mittra *et al.* (2015), postularon que el DNACir captado por células susceptibles es reconocido por la célula receptora como un rompimiento de la doble cadena del DNA, por lo cual se activan los mecanismos de reparación para este tipo de daño,

integrando así el DNACir al genoma de la célula receptora, e iniciando así el proceso de carcinogénesis (58).

Estos reportes sugieren fuertemente la participación del DNACir como agente promotor en el proceso de carcinogénesis, por lo que el objetivo del presente trabajo fue demostrar en un modelo murino de hepatocarcinogénesis bien establecido, el papel promotor del DNACir.

4. JUSTIFICACIÓN

Siendo el cáncer uno de los mayores problemas que padece la población mundial, y con el creciente número de casos nuevos, el continuo estudio de esta enfermedad y su tratamiento se vuelve imperativo. Por lo que al demostrar la participación del DNAcir como promotor en el proceso de carcinogénesis, se propone un nuevo blanco para futuras terapias contra el cáncer, así como un mayor entendimiento de esta enfermedad.

5. HIPÓTESIS

El DNAcir secretado por células cancerosas, tendrá un papel promotor en un modelo de hepatocarcinogénesis.

6. OBJETIVO PRINCIPAL

Demostrar el papel promotor del DNACir, secretado de células cancerosas, en el proceso de carcinogénesis, empleando dos modelos murinos de hepatocarcinogénesis.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el papel promotor del DNA circulante en el proceso de carcinogénesis mediante la detección y cuantificación de nódulos con actividad de GGT en el tejido hepático y su comparación entre los diferentes grupos experimentales.

- Demostrar la transferencia horizontal de secuencias humanas mediante ensayos de PCR.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon dos modelos murinos de hepatocarcinogénesis (Fig. 4 y 5), donde además de los carcinógenos, se inocularon células humanas SW480 como fuente de DNAcir. Al finalizar el modelo de carcinogénesis se colectó el hígado, el cual fue procesado para la detección de la enzima GGT por medio de una tinción histoquímica y finalmente se realizó una PCR del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales con el fin de demostrar la transferencia horizontal genes humanos (Fig. 3).

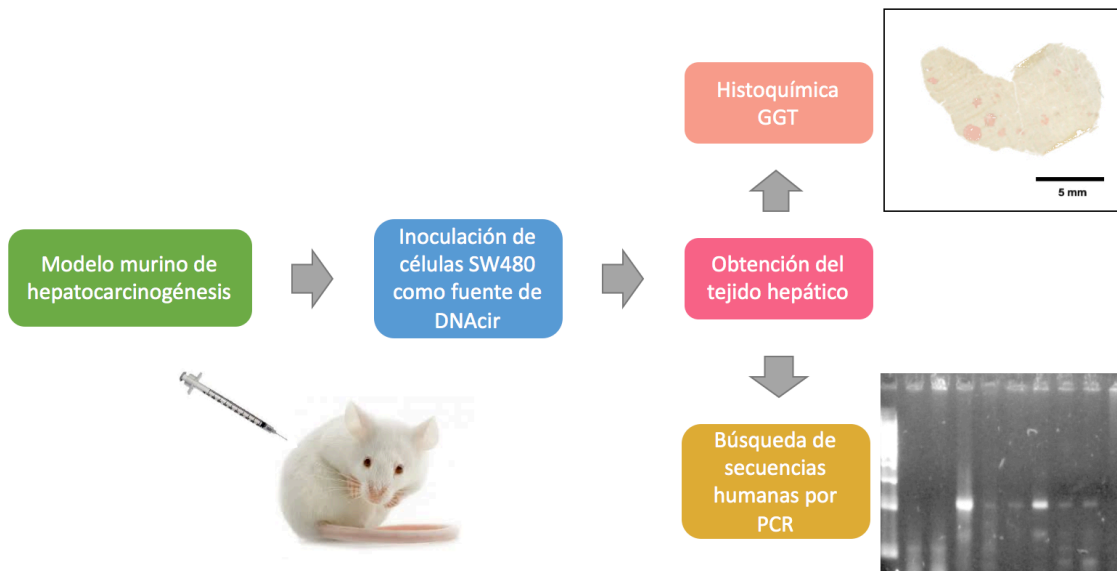


Figura 3. Esquema general de trabajo.

8.1. Material biológico

- a) Ratas macho, cepa Fischer 344 (F344).
- b) Ratas hembra, cepa Sprague-Dawley (SD)
- c) Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano SW480.
- d) Cultivo primario de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica.
- e) Cultivo primario de células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana (HUVEC).

8.2. Métodos

8.2.1. Cultivo celular

Las células SW480 se crecieron en monocapa, en cajas de cultivo de 175 cm² (Corning, EUA), conteniendo una mezcla de medio DMEM-F12 (Caisson Labs, EUA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2 % (Corning, EUA). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, y al observarse una confluencia del 80 % se realizó el subcultivo celular (1:2); para lo cual se utilizó tripsina al 0.125 % en PBS-EDTA para despegar y dispersar las células. Posteriormente, se centrifugó la suspensión celular a 1200 rpm durante 6 min, se decantó el sobrenadante y se hicieron dos lavados con PBS 1X (Apéndice I), seguidos de una centrifugación a 1200 rpm por 6 min; finalmente el botón celular se resuspendió en medio de cultivo fresco.

Los linfocitos humanos se aislaron a partir de sangre periférica de donadores sanos, la cual fue proporcionada por el Banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología.

La sangre se colectó en tubos estériles de 50 mL de capacidad y se centrifugó a 1 500 rpm durante 10 min para separar y luego desechar el plasma. Posteriormente se adicionó un volumen de medio de cultivo RPM1-1640 (Caisson Labs, EUA) y se volvió a centrifugar a 1500 rpm/10 min a 20 °C, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se adicionó a tubos estériles con Ficoll-Paque

(Sigma-Aldrich, EUA) a una proporción 2:1 (Sangre:Ficoll), lo anterior para formar el gradiente de densidad necesario para separar las células mononucleares, los tubos se centrifugaron a 1200 rpm/30 min a 20 °C. La región correspondiente a los mononucleares se colectó y lavó 2 veces con PBS 1X (Sigma-Aldrich, EUA) a 1500 rpm/10 min para eliminar plaquetas y el exceso de Ficoll-Paque. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en 5 mL de solución amortiguadora de amonio, cloro y potasio (ACK) para lisar eritrocitos (Apéndice I), se mezcló por inversión durante 15 minutos, se adicionaron 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 y se centrifugó a 1500 rpm/10 min. Este proceso se repitió hasta eliminar por completo los eritrocitos. Finalmente, los mononucleares se incubaron toda la noche, en cajas de cultivo de 175 cm², con medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10 %, a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Al siguiente día se colectaron las células no adheridas, que corresponden a los linfocitos, y se cultivaron en medio fresco hasta su uso, ese mismo día.

Las células HUVEC fueron donadas por el Dr. Ernesto Alfaro Moreno del Instituto Nacional de Cancerología.

8.2.2. Animales de experimentación

Para el modelo del hepatocito resistente (MHR) se utilizaron ratas macho Fischer 344 de 180-200 g de peso (24). Obtenidas de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav.

En el segundo modelo de hepatocarcinogénesis, denominado a partir de ahora Modelo de Yoshiji, se emplearon ratas hembra SD con un peso de 180-200 g (19). Estos animales fueron adquiridos de BIOINVERT y mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Cancerología durante el periodo que duró el experimento.

Los animales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 h y temperatura controlada (22 °C); con alimento y agua *ad libitum*.

8.2.3. Modelo del hepatocito resistente

Las ratas Fischer-344 fueron sometidas a un protocolo de hepatocarcinogénesis empleando el MHR modificado (24). Los animales se iniciaron con una dosis única de DEN (200 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente se administró el agente promotor, 2-AAF (25 mg/kg, i.g.) (Sigma-Aldrich, EUA) por tres días consecutivos, empezando el día 7 después de la iniciación con DEN. Finalmente, el día diez, se realizó una hepatectomía parcial (70%) (Fig. 4). Las ratas fueron sacrificadas 30 días después de la administración de la DEN, tiempo en el cual se observan lesiones preneoplásicas en el tejido hepático.



Figura 4. Esquema general del Modelo del Hepatocito Resistente. *DEN*: Dietilnitrosamina. *2-AAF*: 2-Acetil Amino Fluoreno. *HP*: Hepatectomía parcial.

8.2.4. Modelo de Yoshiji

En este modelo (Fig. 5), las ratas SD fueron iniciadas con una dosis única de DEN (180 mg/Kg, i.p.). Dos semanas después, fueron sometidas a un tratamiento con FB al 0.05 %, el cual se administró como agente promotor en el agua durante 6 semanas. Los animales fueron sacrificados 8 semanas después de la administración de DEN (19).



Figura 5. Esquema general del Modelo de hepatocarcinogénesis. *DEN*: Dietilnitrosamina. *FB*: Fenobarbital.

8.2.5. Evaluación de la participación del DNACir en el proceso de carcinogénesis en dos modelos murinos

Con el fin de evaluar el papel del DNACir en la etapa de promoción de la carcinogénesis, se inocularon células SW480 como fuente de DNACir; empleando linfocitos y células HUVEC como control de células sanas.

Las células SW480 y HUVEC fueron tripsinizadas y lavadas dos veces con PBS 1X; los linfocitos no fueron tripsinizados, pero si lavados con PBS. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en PBS para realizar el conteo de células con la técnica de azul tripano y así poder hacer los cálculos necesarios para finalmente, obtener una suspensión de 1×10^7 células en $500 \mu\text{L}$ de PBS. Inmediatamente después de resuspender las células se procedió a realizar la inoculación.

Los días 7 y 14 después de la iniciación con DEN en el MHR se inoculó una suspensión de $500 \mu\text{L}$ con 1×10^7 células SW480 vía subcutánea; $250 \mu\text{L}$ de la suspensión en cada flanco del lomo de la rata. Las células HUVEC se administraron únicamente el día 7 después de la iniciación.

Los diferentes grupos experimentales, de acuerdo al esquema de tratamiento, se muestran en la Fig. 6. El grupo A corresponde al control del MHR, con el se

comparan los dos grupos restantes; el grupo B sigue el esquema del MHR y además se le inoculan células SW480 como fuente de DNACir proveniente de células malignas; y finalmente, al grupo C también sigue el esquema del MHR y además se le inoculan células HUVEC como fuente de DNACir proveniente de células sanas humanas.

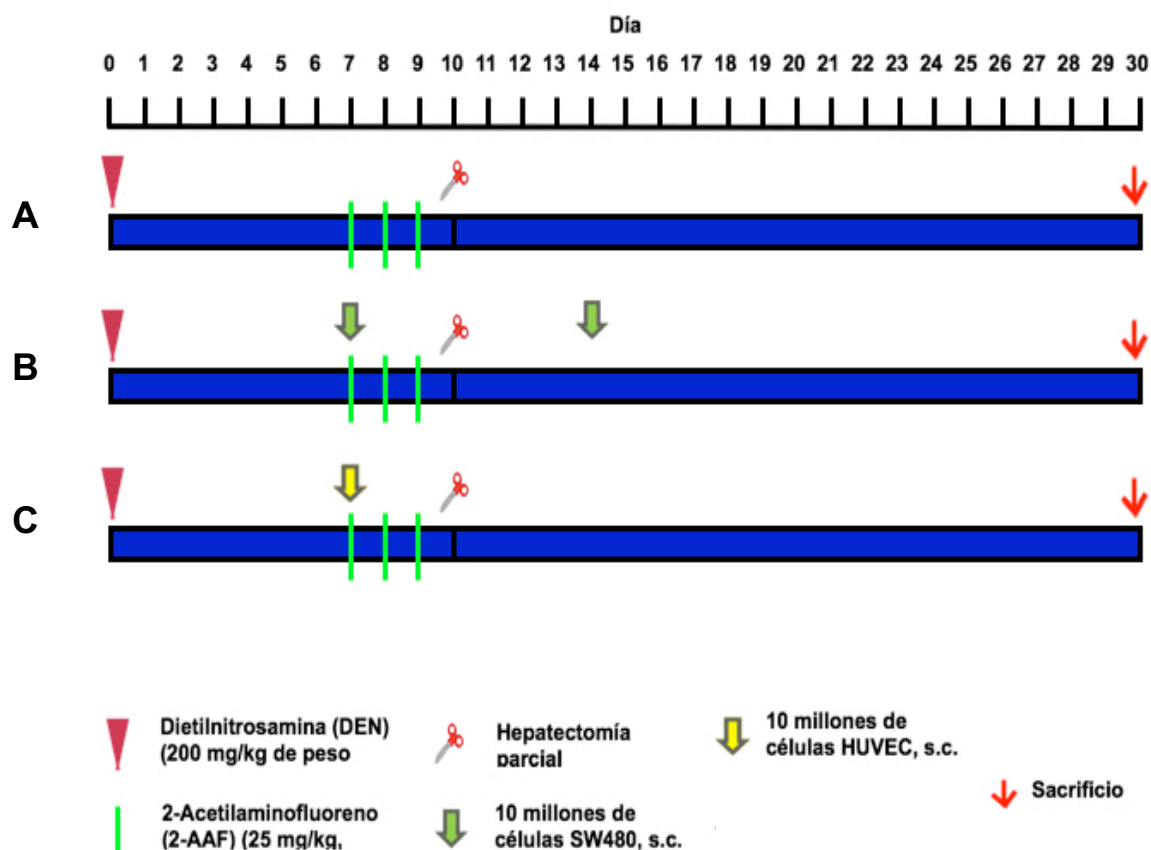


Figura 6. Grupos experimentales del modelo del hepatocito resistente.

En el Modelo de Yoshiji, se inoculó una suspensión de 500 μ L con 1×10^7 células, SW480 o linfocitos humanos, una vez a la semana por dos o cuatro semanas desde el inicio del tratamiento con FB (grupos B, C, D y E); el grupo F es un grupo control de SW480, en donde no se administró ningún carcinógeno; en el grupo G, se inocularon células SW480, pero se eliminó la administración del agente iniciador (DEN); mientras que en el grupo H, se inocularon células SW480, pero se

eliminó la administración del agente promotor (FB). El control del modelo corresponde al grupo A, aquí únicamente se administraron los carcinógenos DEN y FB (Fig. 7).

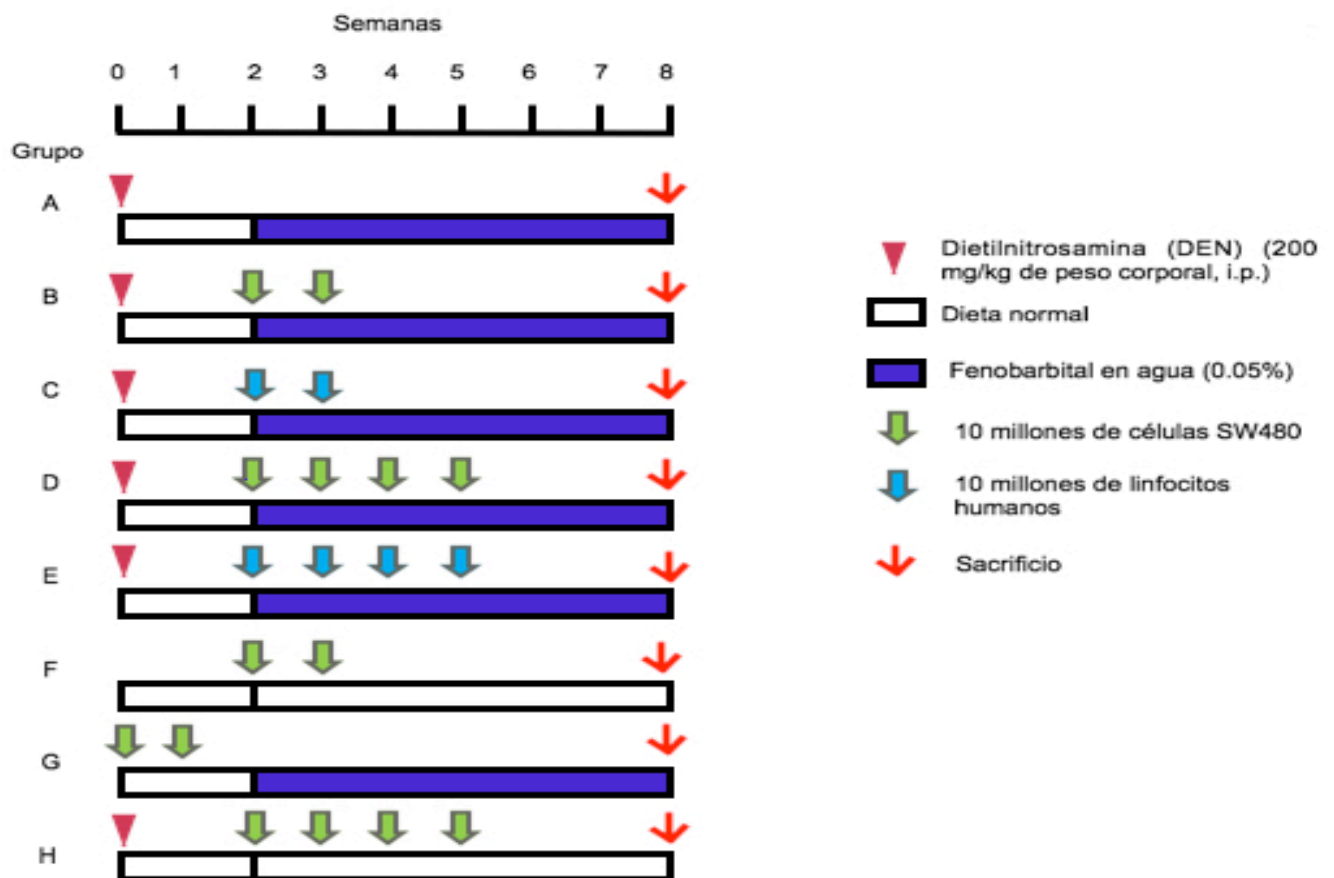


Figura 7. Grupos experimentales del Modelo de Yoshiji.

8.2.6. Obtención y procesamiento del tejido hepático

El día del sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (Baxter, Puerto Rico) y desangradas por punción cardiaca. El hígado fue escindido, lavado con PBS 1X y fraccionado. Las porciones de tejido hepático fueron congeladas con hielo seco en presencia de 2-metil-butano (Sigma-Aldrich, EUA) y adheridas a piezas de corcho con Tissue-tek, para la obtención de cortes histológicos en el crióstato.

8.2.7. Histoquímica de la GGT

La actividad de la GGT se determinó en cortes histológicos hepáticos de 10 μm de grosor, obtenidos en un crióstato (Leica) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y montados en portaobjetos gelatinizados (Apéndice II).

De acuerdo a lo reportado por Rutenburg *et al.* (1969), los cortes de tejido se fijaron con etanol absoluto por 5 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente los cortes fijados se incubaron durante 20 min con una solución que contiene: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de γ -glutamyl 1-4-metoxi-2-naftilamida (GMNA) (Sigma, EUA), 0.5 mg/mL de glicil-glicina (Sigma, EUA) y 0.5 mg/mL de Fast-Blue (Sigma, EUA) en Tris 100 mM (31). La actividad de la GGT se evidenció con la aparición de precipitados rojos en el tejido hepático. Posteriormente, las laminillas con los tejidos fueron lavadas con agua por 5 segundos y secadas con toallitas absorbentes.

8.2.8. Cuantificación de lesiones nodulares GGT positivas.

La imagen de los cortes histológicos con actividad GGT positiva fue capturada con una cámara digital de alta resolución acoplada a un microscopio estereoscópico. Las imágenes fueron analizadas con un software especializado para el análisis de imagen (ImageJ); para esto, primero se calibró el software con la cámara de Neubauer. Posteriormente se midió el área total de los cortes histológicos a analizar y se cuantificó el número y área de las lesiones preneoplásicas, usando un tamaño de exclusión de 0.01 mm de diámetro. Con estos datos se hicieron

cálculos en Excel para obtener el número de lesiones GGT (+)/cm² y el porcentaje de área GGT (+).

Por rata se analizaron tres cortes histológicos representativos al azar.

8.2.9. Extracción de DNA genómico a partir del tejido hepático murino

Para la purificación del DNA genómico hepático, se utilizó un método de extracción con cloroformo que se describe brevemente a continuación: 20 mg de tejido fueron incubados con buffer de extracción (Apéndice I) y proteinasa K (133.3 μ g/mL) a 55 °C durante toda la noche. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo (Sigma-Aldrich, EUA), esta solución se agitó por inversión hasta formarse una emulsión, la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se colectó en un tubo nuevo y se le adicionó un volumen de isopropanol y NaCl 5 M a una concentración final de 0.2 M, se agitó por inversión y se dejó precipitar por 2 h a -20 °C. Luego se centrifugó a 11000 rpm/15 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Al botón resultante, se le adicionó etanol al 70%, se centrifugó a 11000 rpm/15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón resultante se secó a 80 °C. Una vez que se eliminó el etanol del botón de DNA, este se resuspendió en 100 μ L de agua destilada estéril para hidratarlo.

8.2.10. Extracción de DNAcir a partir de plasma murino

El DNAcir fue purificado con la técnica modificada de fenol-cloroformo, a partir de 500 μ L del plasma obtenido al momento del sacrificio. Al plasma se le adicionó un volumen de buffer de extracción y proteinasa K a una concentración final de 100 μ g/mL; esta mezcla se incubó a 55 °C durante toda la noche. Enseguida, se adicionó un volumen de fenol-cloroformo (v/v) (Sigma-Aldrich, EUA) y se agitó hasta formar una emulsión, la cual se centrifugó a 3000 rpm/10 min a temperatura ambiente (20 °C). La fase superior se recuperó en un tubo nuevo y se le adicionó un volumen de cloroformo, se agitó hasta observar la formación de una emulsión, y se centrifugó a 3000 rpm/10 min a 20 °C. La fase acuosa se recuperó y se procedió a precipitar el DNA, para lo cual se adicionó 1 μ L de glucógeno

(Invitrogen, EUA), acetato de amonio 7.5 M en una proporción 1:10 v/v y dos volúmenes de etanol al 100 %, esta mezcla se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 11000 rpm por 60 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón de DNA con 1 mL de etanol al 70 %, se centrifugó a 11000 rpm durante 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el botón se secó a 80 °C. Finalmente, el DNA se solubilizó en 50 μ L de agua destilada estéril.

8.2.11. Cuantificación de DNA genómico y circulante

Para la cuantificación del DNA genómico y circulante extraído, se empleó el reactivo fluorescente Quanti-iT™ PicoGreen (Invitrogen, EUA). Este reactivo se une al DNA de doble cadena y permite la liberación de una señal fluorescente que es posible cuantificar en un lector de fluorescencia Tecan Infinite™ M200 (Tecan, Austria). Para esto se emplearon microplacas de 96 pozos, fondo plano, de poliestireno negro (Corning Costar, EUA). En cada pozo se agregaron 50 μ L de muestra (1 ó 2 μ L de muestra más 49 ó 48 μ L de TE 1X) y 50 μ L del reactivo PicoGreen diluído 1:200 en TE 1X. El PicoGreen se maneja en oscuridad a temperatura ambiente. La microplaca se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se realizó la lectura de fluorescencia en el lector, con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 535 nm.

8.2.12. Análisis de la presencia de secuencias humanas específicas por PCR

Para demostrar la transferencia de secuencias humanas al tejido hepático y en el plasma de ratas inoculadas con células SW480, se realizó una PCR para secuencias repetitivas *Alu*, las cuales son específicas del humano; y para el gen mutado de K-ras humano específico de la línea celular SW480.

El tamaño de los amplicones y la secuencia de los primers empleados para el PCR de cada secuencia fueron: 200 pb para *Alu-YD6* (5'-gagatcgagaccacggtgaaa-

3' y 3'-ttgctctgaggcagagttt-5'); y 107 pb para *K-ras* (5'-gactgaatataaacttggttagt-3' y 3'-ggacgaatatgatccaacaatag-5'). La amplificación por PCR se realizó en volúmenes de 20 μ L, con 100 ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8.3), 100 μ M de dNTPs, 1 μ M de cada uno de los primers; y 5 mM de MgCl₂ para Alu, 1.5 mM para *K-ras*.

Después de una desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de amplificación y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los ciclos incluyeron la desnaturalización a 94 °C por 30 seg, 30 seg de alineamiento a 61 °C para *Alu* y 59 °C para *K-ras*; y 30 seg de extensión a 72 °C.

Para visualizar el amplificado de la PCR, se realizó un gel en agarosa al 2.5 %. Para esto se diluyó la agarosa en 12 mL de la solución amortiguadora TE 0.5 X, y se agregó 1 μ L de GelRed para teñir el DNA y poder observarlo en un transiluminador.

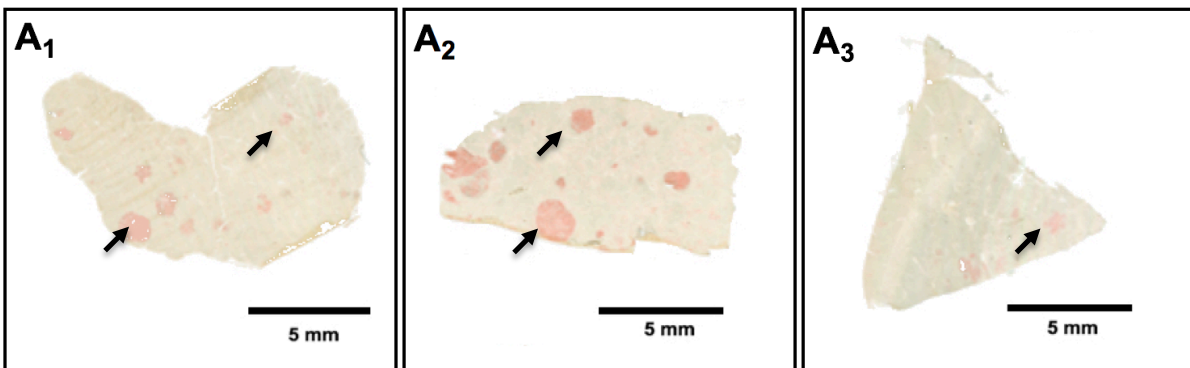
Como control de la PCR se usó agua estéril y como control negativo se utilizó DNA genómico de rata F344 o SD, dependiendo del modelo empleado.

9. RESULTADOS

Modelo del Hepatocito Resistente

En la Fig. 8 se muestran los resultados de la histoquímica de la GGT. En los cortes del tejido hepático (Fig. 8A) se observó un mayor número de nódulos y de mayor tamaño en el grupo MHR + SW480 que en el grupo control (MHR) y el MHR + HUVEC. Al realizar el análisis de imagen para cuantificar las lesiones nodulares (Fig. 8B) se detectó un mayor número de nódulos y porcentaje de área GGT positiva en el grupo MHR + SW480, 29 y 8.27 % respectivamente, en comparación con el grupo control (21 y 6.61 %). Estos resultados de la expresión de la GGT aunque muestran una tendencia, no son estadísticamente significativos ($P = 0.1153$ y $P = 0.1291$ respectivamente).

En el caso del grupo MHR + HUVEC se observó una disminución estadísticamente significativa del número de nódulos y del porcentaje de área GGT positiva (7 y 1.75 % respectivamente) al comparar con el grupo control ($P = 0.0275$) (Fig. 8B). Lo cual se observó claramente en la tinción histoquímica de los cortes de tejido hepático (Fig. 8A).



B

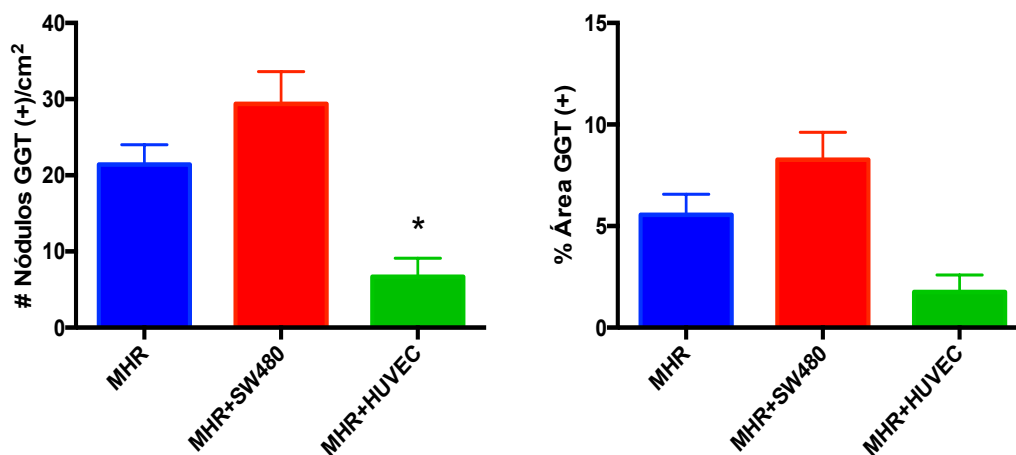


Figura 8. Efecto de la inoculación de células malignas de origen humano en la expresión de la GGT. **(A)** Histoquímica de GGT en cortes de tejido hepático: **(A1)** Grupo control (MHR), **(A2)** Grupo MHR + SW480, **(A3)** Grupo MHR + HUVEC. **(B)** Efecto de la inoculación de células humanas en el número de nódulos/cm² y en el porcentaje de área GGT positiva. Las diferencias entre el número de nódulos y área de estos grupos se obtuvieron al comparar con el grupo control (MHR). MHR (n = 8), MHR+SW480 (n = 6), MHR + HUVEC (n = 2). * P < 0.05 por *t de student*.

Se procedió a demostrar la transferencia horizontal de genes provenientes de las células de origen humano al tejido hepático murino. La Fig. 9 es una imagen representativa de diferentes ensayos que muestra los resultados obtenidos de la PCR para la secuencia repetitiva humana *Alu* en el tejido hepático de los grupos control y MHR + SW480; en ninguno de ellos se pudo detectar la señal para *Alu*, la única señal positiva fue la del control positivo que corresponde a DNA genómico de la línea celular SW480.

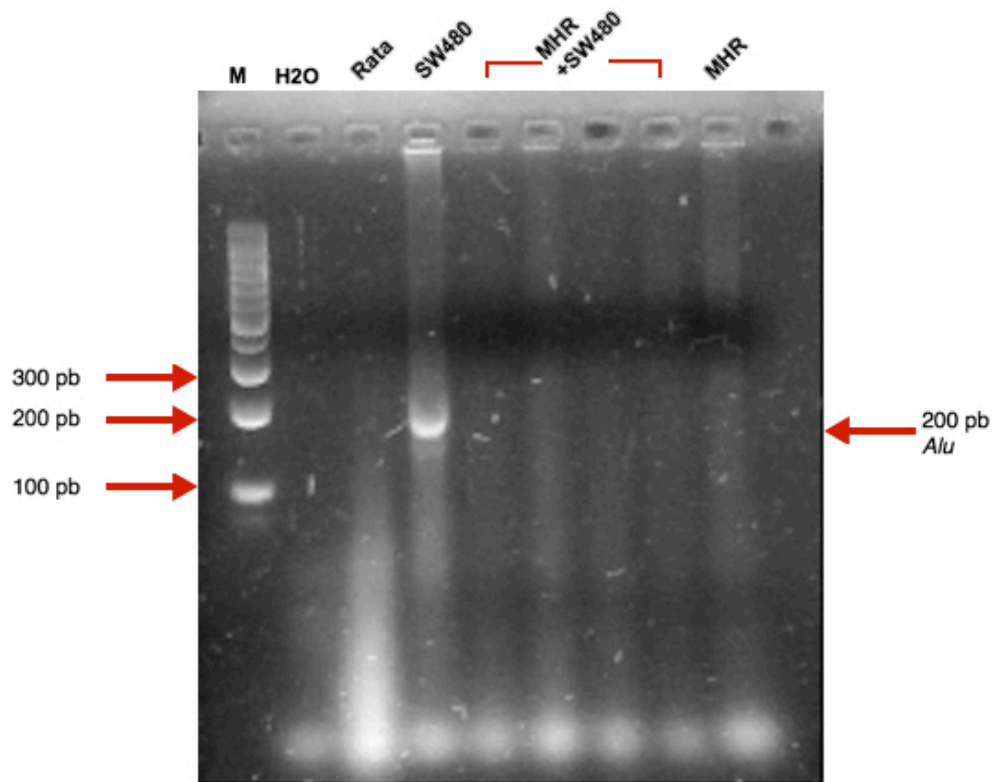


Figura 9. Detección por PCR de la secuencia repetitiva humana Alu-Yd6. La secuencia específica humana (*Alu*) se buscó en el tejido hepático de las ratas del grupo control y del grupo MHR + SW480 (M: Marcador de 100 pb, Rata: DNA genómico de rata Fischer-344, SW480: DNA genómico de esta línea celular humana).

Modelo de Yoshiji

La Fig. 10 muestra la expresión de la GGT en los cortes de tejido hepático. Se observó un aumento en el número y tamaño de los nódulos en el grupo DEN + FB + SW 2x (Fig. 10B) al comparar con el grupo control (Fig. 10A). Mientras que el grupo DEN + FB + Lc 2x (Fig. 10C) mostró una expresión de la GGT similar a la del grupo control. Esta observación se corroboró al cuantificar las lesiones nodulares GGT positivas; ya que como se muestra en la Fig. 11, se detectó un aumento en el número de nódulos y en el porcentaje de área GGT positiva en el

grupo DEN + FB + SW 2x (12 y 0.4 % respectivamente) al compararlo con el grupo control (8 y 0.25 % respectivamente); este aumento no fue significativo estadísticamente ($P = 0.2029$ y $P = 0.1108$ respectivamente). El grupo DEN + FB + Lc 2x mostró una expresión de la GGT similar al grupo control, 7 nódulos/cm² y un porcentaje de área de 0.2 % (Fig. 11).

Con el objetivo de evaluar si un mayor número de inoculaciones celulares aumentaría en mayor proporción la expresión de la GGT, se añadieron los siguientes grupos experimentales: DEN + FB + SW 4x y DEN + FB + Lc 4x. Como se observa en la Fig. 10D, no hubo un aumento en el número de nódulos ni en su tamaño al comparar con el grupo control (Fig. 10A); lo que se confirmó con el análisis cuantitativo (Fig. 11), que muestra que un mayor número de inoculaciones no aumenta ni el número ni el porcentaje de área de nódulos GGT positivos (11 y 0.33 % respectivamente) al hacer la comparación con el grupo control y con el grupo DEN + FB + SW 2X. En cambio, el grupo DEN + FB + Lc 4x presentó un aumento considerable ($P < 0.05$) en el número de nódulos y en el porcentaje de área GGT positiva, 21 y 3.62 % respectivamente (Fig. 10E y 11).

En los últimos tres grupos experimentales se variaron los componentes del Modelo de Yoshiji, se eliminó ya sea el iniciador (DEN) o el promotor (FB) y en su lugar se inocularon células humanas con el fin de demostrar la participación del DNACir en el proceso de carcinogénesis. En el grupo tratado únicamente con células SW480 (SW) y en el grupo SW + FB no se detectó la expresión de la GGT (Fig. 10F y 10G), ambos presentaron 0 nódulos/cm² y un porcentaje de área del 0 % (Fig. 11). Mientras que en el grupo DEN + SW se detectó una expresión de la GGT similar a la del grupo control (Fig. 10H), con 10 nódulos/cm² y un porcentaje de área del 0.29 % (Fig. 11).

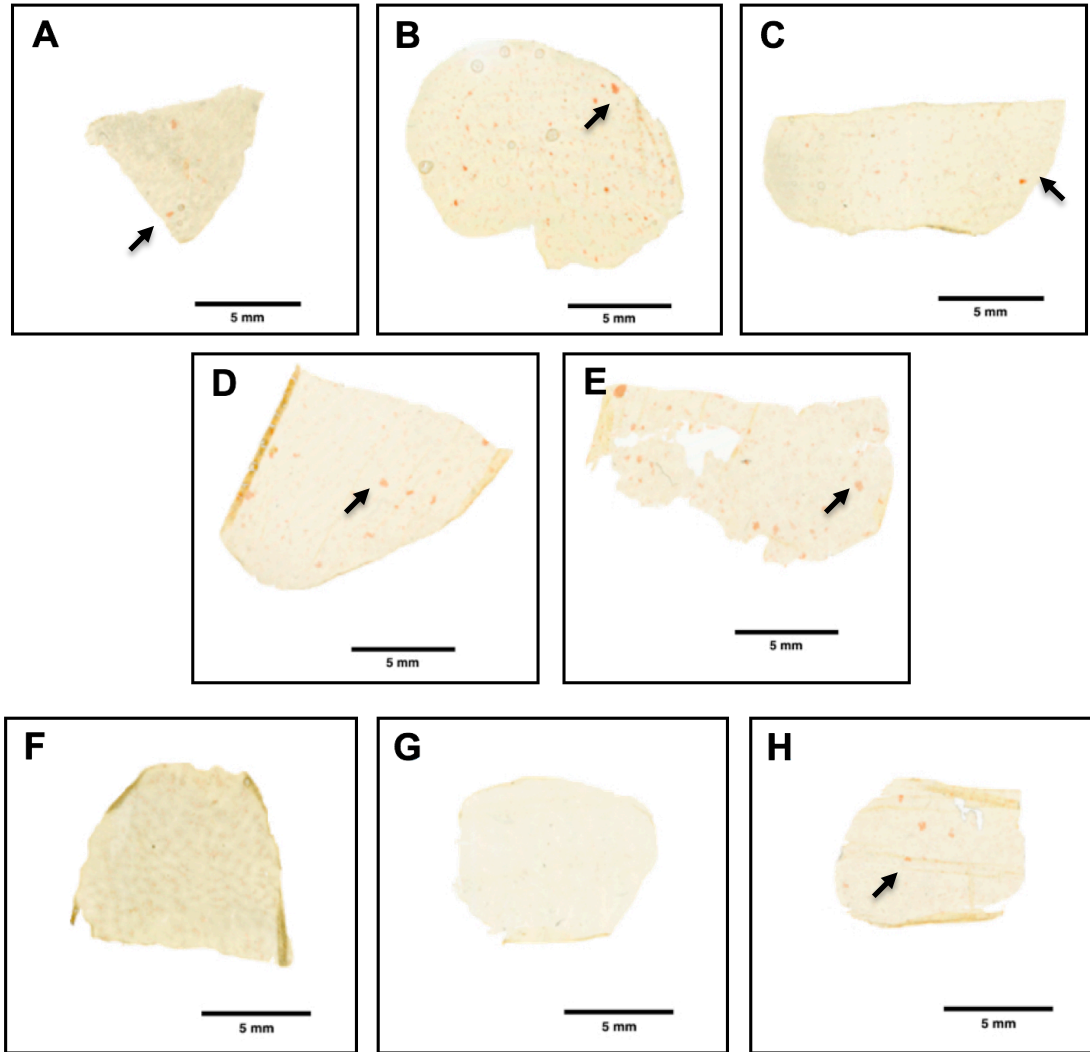


Figura 10. Detección histoquímica de nódulos de hepatocitos a las 8 semanas. **A:** Grupo control (DEN + FB); **B:** DEN + FB + SW480 2x; **C:** DEN + FB + Lc 2x; **D:** DEN + FB + SW480 4x; **E:** DEN + FB + Lc 4x; **F:** Control de SW480 2x; **G:** SW480 2x + FB; **H:** DEN + SW480 4x.

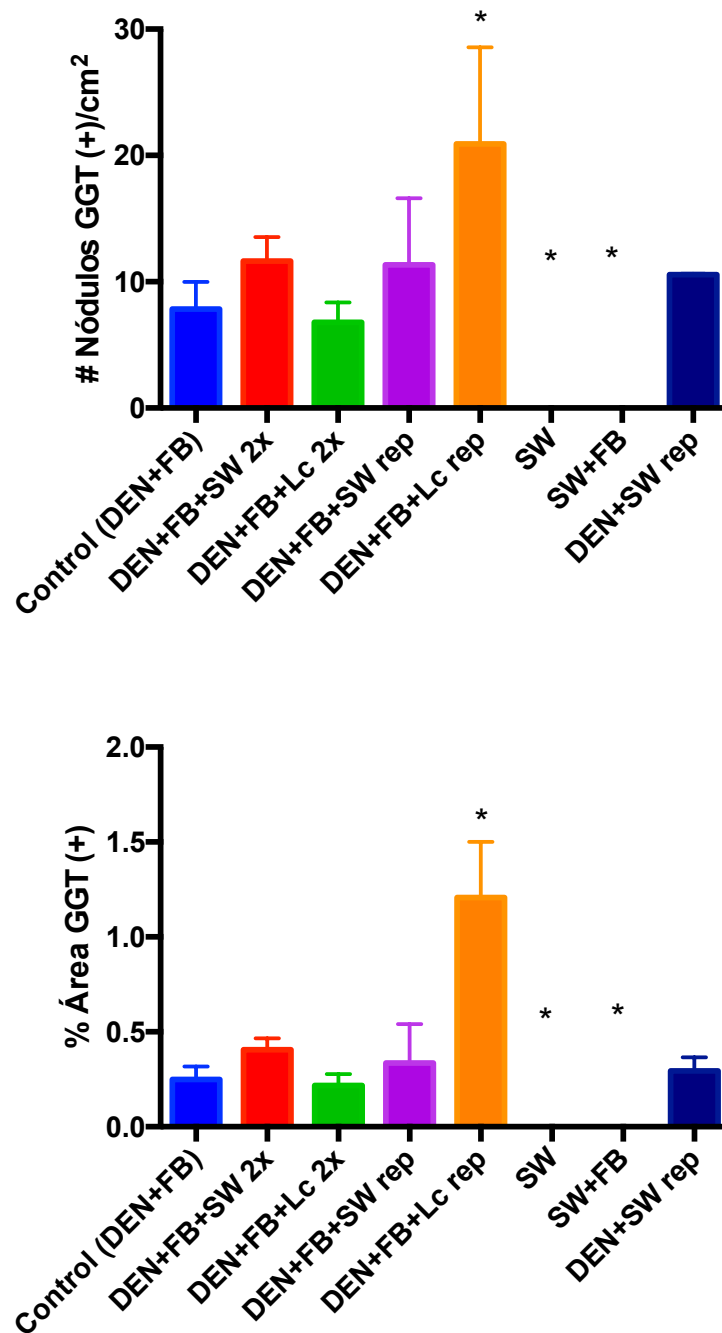


Figura 11. Efecto de la inoculación de células malignas de origen humano en la expresión de la GGT; en el número de nódulos/cm² y en el porcentaje de área GGT positiva. Las diferencias entre el número de nódulos y área de estos grupos se obtuvieron al comparar con el grupo control. Control (n = 8), DEN + FB + SW 2x (n = 9), DEN + FB + Lc 2x (n = 6), DEN + FB + SW 4x (n = 2), DEN + FB + Lc 4x (n = 3), SW (n = 4), SW + FB (n = 4), DEN + SW 4x (n = 2). * P < 0.05 por *t de student*.

Al igual que en el modelo anterior, se buscó demostrar la presencia de secuencias humanas mediante PCR. La Fig. 12 muestra la señal positiva para secuencias repetitivas *Alu* en el tejido hepático y en el plasma de las ratas tratadas con DEN + SW 4x; además, en el plasma de las ratas de los grupos SW + FB, DEN + FB + Lc 4x, DEN + FB + SW 4x también detectaron secuencias repetitivas *Alu*.

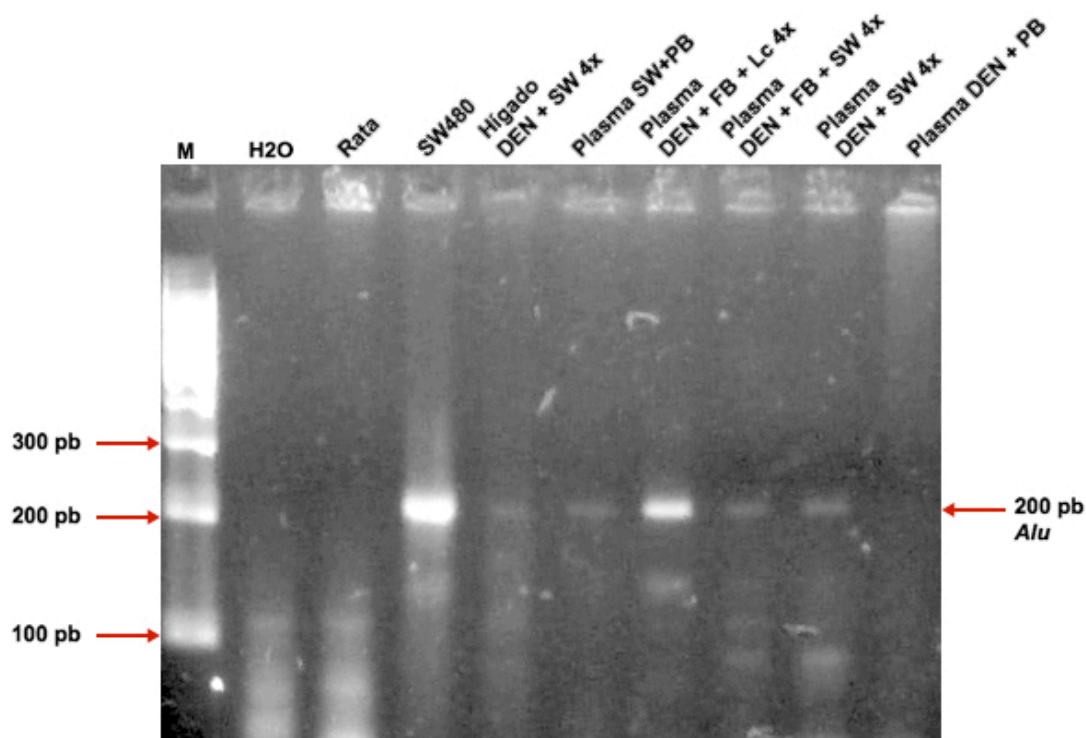


Figura 12. Detección por PCR de la secuencia repetitiva humana *Alu*-Yd6 en el tejido hepático y plasma de ratas SD (M: Marcador de 100 pb, Rata: DNA genómico de hígado de rata SD).

En este modelo también se buscó la presencia de la secuencia *K-ras* mutada, que corresponde a una secuencia específica de la línea celular humana SW480. Se encontró señal positiva para *K-ras* en el tejido hepático y en el plasma de ratas tratadas con DEN + SW 4x (Fig. 13).

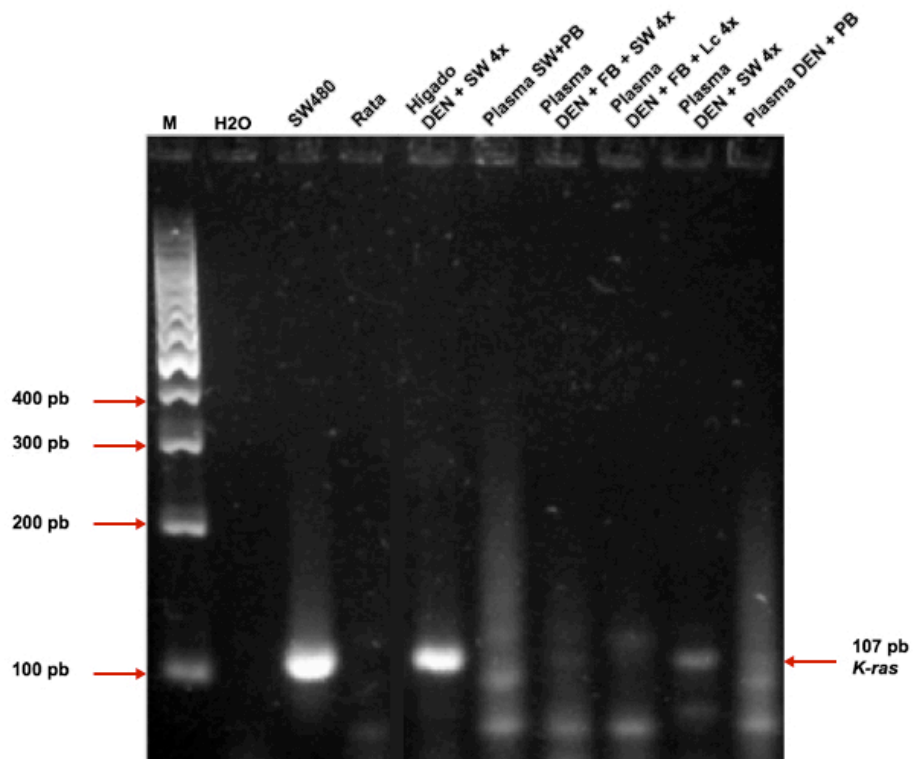


Figura 13. Detección por PCR del gen humano *K-ras* mutado en el tejido hepático y plasma de ratas SD (M: Marcador de 100 pb, Rata: DNA genómico de hígado de rata SD).

10. DISCUSIÓN

La actividad transformante del DNACir y su participación en la tumorigénesis ha sido reportada y estudiada por diferentes grupos de investigación; sin embargo, aunque se ha demostrado su participación en la tumorigénesis y metástasis en algunos modelos, aún no se ha determinado realmente su papel en el proceso de carcinogénesis (53,54,57); tampoco se tiene claro su modo de acción como carcinógeno. Existe la teoría de la captación de oncogenes por medio de la transferencia del DNACir, lo que le confiere a la célula susceptible los genes necesarios para su transformación (55). En otro reporte Mittra *et al.* (2015), demostraron que el DNACir no sólo es captado por las células susceptibles, sino que también es integrado al DNA genómico de la célula receptora por medio de los mecanismos de reparación del rompimiento de la doble cadena, generando así un daño o mutación en el DNA celular que promueve la transformación de una célula sana a una cancerosa (58).

Para demostrar la capacidad transformativa del DNACir y su participación en el proceso de carcinogénesis, se decidió utilizar dos modelos murinos de hepatocarcinogénesis.

En el primer modelo que se empleó (MHR), aunque sí se detectó un aumento en la expresión de la GGT en las ratas inoculadas dos veces con células SW480 (Fig. 8), este aumento no fue estadísticamente significativo y al realizar los ensayos de PCR (Fig. 9) no fue posible encontrar secuencias humanas en el tejido hepático de este grupo experimental, por lo cual se consideraron dos posibles explicaciones: la THG de origen humano a células murinas no está sucediendo, o el número de inoculaciones de células SW480 no fue suficiente; siendo esto último lo más probable. Hay reportes de experimentos *in vivo* en donde observaron la presencia de secuencias humanas (*K-ras*) en el plasma de los animales de experimentación, pero en estos casos las células inoculadas como fuente de DNACir en el animal formaron un tumor, el cual se encuentra secretando DNACir de forma continua

(54,57). En nuestro caso, ninguno de los modelos empleados presentó la formación de un tumor debido a que las ratas que empleamos eran inmunocompetentes; es decir, su sistema inmune no permite la formación de un tumor al reconocer a las células humanas como elementos ajenos a él, por lo que las elimina, limitando así la liberación del DNACir. En el trabajo de Trejo-Becerril *et al.* (2012), se colectaron, de los animales que sólo fueron inoculados con la células SW480, las zonas de inoculación y se hicieron cortes y tinciones HE; observándose y demostrándose que las células inoculadas son eliminadas inmediatamente, de tal manera que para el día 7 después de haber sido inoculadas, las células humanas ya han sido completamente eliminadas (59). Debido a estos antecedentes, se decidió incluir un nuevo grupo experimental en donde se aumentó el número de inoculaciones de células SW480, de dos a cuatro, una inoculación por semana. Pero debido a problemas técnicos presentados en la hepatectomía, los que generaron un aumento importante en la mortalidad de los animales, no fue posible seguir con este modelo y se decidió continuar con un nuevo modelo de carcinogénesis, el cual es menos invasivo y agresivo para los animales.

Aún así, se obtuvieron resultados interesantes en el MHR. El grupo experimental al que se le inocularon células HUVEC, las cuales se emplearon como control de células normales, arrojó un resultado diferente al esperado; para este grupo se esperaba que la expresión de la GGT fuera similar a la observada en el grupo control; sin embargo se encontró que tanto el número de nódulos GGT positivos como su área, disminuyeron considerablemente ($P < 0.05$). Hasta hoy, no hay reportes de transformación celular generada por células normales, aunque sí se ha reportado la liberación de DNACir por células no malignas (60,61); más aún, en el plasma de personas sanas la concentración de DNACir es menor que en pacientes que padecen diferentes tipos de cáncer (45), razón por lo cual el resultado esperado para este grupo era similar a lo observado para el grupo control; sin embargo, se observó una disminución importante en la expresión de la GGT en el grupo inoculado con células HUVEC. Con este diseño experimental no es posible

descartar la acción de otros factores circulantes, diferentes al DNA, secretados por las células HUVEC, y no por las células SW480, que tal vez confieran un efecto inhibitorio en el desarrollo del carcinoma hepatocelular. Entonces, sería importante diseñar una nueva estrategia experimental para determinar la participación de factores circulantes secretados por células normales, que eviten el daño por carcinógenos. Recientemente García-Arranz y colaboradores reportaron la protección *in vitro* conferida por el DNACir de origen no tumoral (62), lo cual también podría explicar los resultados observados. Es importante repetir este grupo con un mayor número de animales y además la administración de proteinasas y DNasa I para asegurar que el efecto observado se deba al DNACir, o en su defecto a alguna proteína.

En el Modelo de Yoshiji, también se observó un aumento, en comparación con el control de carcinógenos, en la expresión de la GGT en el grupo inoculado dos veces con células SW480, este aumento no fue estadísticamente significativo; sin embargo, sugiere nuevamente la posible participación del DNACir en el proceso de carcinogénesis.

Por los resultados observados en el MHR y en el Modelo de Yoshiji, se decidió administrar dosis repetidas de las células SW480, por lo que se añadió un grupo en el cual se inocularon 4 dosis de células, una vez a la semana por cuatro semanas. Sorprendentemente, los resultados (Fig. 11) no muestran un aumento en la expresión de la GGT al compararse con el grupo inoculado dos veces con células SW480. El sistema inmune de la rata podría explicar los resultados observados; ya que después de la primera inoculación se activa una respuesta inmune capaz de detectar los antígenos humanos de forma rápida y específica (63), neutralizándolos e impidiendo su llegada al hígado, donde se encuentran las células iniciadas, de tal forma que el DNACir que llega al hígado es probablemente resultado de la primera inoculación, y es el efecto que estamos observando.

En este modelo se inocularon linfocitos aislados de la sangre periférica de donadores sanos como control de células normales. Se decidió linfocitos en lugar de células HUVEC debido a la accesibilidad de este tipo celular. En la Fig. 11 se observa que al inocular linfocitos en dos ocasiones, el número de nódulos GGT positivos y su área se mantiene prácticamente igual a lo observado para el grupo control. Este resultado es lo inicialmente esperado para este grupo experimental, pero difiere del resultado observado en el modelo anterior para las células HUVEC. Existe evidencia de una gran proporción de células madre en las células HUVEC (64); y a este tipo de células se le ha atribuido una capacidad regenerativa, ya que secretan factores solubles que participan en la homeostasis de diferentes tejidos (65), lo cual podría explicar la protección observada en el modelo anterior; algunos ejemplos que refuerzan esta hipótesis, son el trabajo recientemente publicado de Mao *et al.*, quienes reportaron que al inyectar vía intramuscular células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano (hucMSC) a ratas con una cardiomiopatía dilata, observaron una mejora en la función cardíaca, ellos atribuyen este efecto a la regulación mediada por citocinas, aunque aún no saben cuales (66); otro grupo de investigación reportó que las células hucMSC reducen la fibrosis en ratones con daño pulmonar inducido con Bleomicina (67). Es por estos antecedentes que los linfocitos funcionan como un mejor control de células sanas para este diseño experimental, ya que no sólo son más accesibles, sino que al parecer no secretan factores circulantes de protección; aunque el control de células sanas ideal, sería cultivo primario de colon humano sano, ya que estas células pertenecen a la misma estirpe celular que las células SW480.

Al inocular cuatro dosis de linfocitos humanos se observó un fenómeno importante; el número de nódulos GGT positivos y su área fue considerablemente mayor ($P < 0.05$) al comparar con el grupo control; es importante señalar que para el grupo inoculado con dos dosis de linfocitos se hizo un pool de la sangre de tres donadores sanos para la primera inoculación y la sangre de esos mismos tres donadores fue empleada para la segunda inoculación. En cambio, en el grupo de

ratas inoculadas con cuatro dosis de linfocitos, se decidió emplear la sangre obtenida del banco de sangre del INCan, y para cada inoculación se aislaron linfocitos de diferentes donadores lo cual representa una diversidad de antígenos para los que el sistema inmune debe montar una respuesta inmune diferente. Este hecho, podría propiciar la liberación de diferentes citocinas o alguna otra proteína que potencie el daño ocasionado por los carcinógenos; es por ello que se debe considerar trabajar siempre con los mismos donadores para evitar estas variables en el estudio.

Finalmente, para poder determinar si el DNACir participa como iniciador o promotor en el proceso de carcinogénesis, fue necesario evaluar si la inoculación de las células SW480 por sí sola era capaz de desencadenar el proceso de carcinogénesis. Los resultados muestran que no; en los cortes hepáticos no fue posible detectar ni un sólo nódulo GGT positivo, esto concuerda con lo observado por Trejo-Becerril *et al.*, ellos no fueron capaces de transformar *in vitro* fibroblastos provenientes de un cultivo primario con el sobrenadante de células SW480, y en su modelo *in vivo* no se generó ningún tumor en el colon de ratas inoculadas únicamente con estas células (57). En conjunto estos resultados comprueban que el DNACir por sí solo no es capaz de transformar células sin un daño previo, ni desencadenar el proceso de carcinogénesis. Aunque con este resultado no queda descartado el papel iniciador del DNACir, debido a que como bien se sabe, un iniciador por sí solo no es capaz de desencadenar el proceso de carcinogénesis, para esto necesita de un agente promotor (13,14). Por esta razón se inoculó a un grupo de ratas células SW480 como agente iniciador y fenobarbital como agente promotor; los resultados no muestran la formación de lesiones preneoplásicas en ninguno de los cortes hepáticos analizados, lo cual indica que el DNACir no funge como iniciador en el proceso de carcinogénesis. Posteriormente, se evaluó la capacidad promotora del DNACir; para ello se incluyó un grupo en el cual se inició el proceso de carcinogénesis con DEN y como posible promotor se inocularon células SW480 como fuente de DNACir. Se demostró que con este tratamiento es posible detectar una expresión de la GGT similar a la observada en el grupo

control donde el fenobarbital funge como promotor; este hallazgo sugiere fuertemente la participación del DNACir como promotor en el proceso de carcinogénesis.

Para demostrar el objetivo principal de este trabajo, fue necesario realizar ensayos de PCR con el fin de buscar secuencias específicas humanas (*Alu* y *K-ras*), para así apoyar nuestra hipótesis en la cual se establece que la THG del DNACir liberado por las células de origen tumoral humano SW480, tiene un papel promotor en el proceso de carcinogénesis. En la Fig. 12 y 13 se muestra un gel de agarosa con los amplificadores de la PCR positivos para *Alu* y *K-ras*; sólo fue posible encontrar estas secuencias humanas en el tejido de ratas tratadas con dosis repetidas de SW480, esto muestra que aunque un mayor número de inoculaciones no aumenta la expresión de la GGT si permite la detección de la THG, es decir la cantidad de DNACir liberado por dos dosis de células SW480 es muy baja y, o no se lleva a cabo la THG o la cantidad es tan baja que no es posible detectarla mediante una PCR convencional, con lo cual se sugiere el empleo de una técnica más sensible para su detección como la PCR en tiempo real.

En este modelo también realizamos ensayos de PCR en el plasma de las ratas pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, y fue posible detectar secuencias humanas en el plasma de las ratas que fueron inoculadas con células, tanto SW480 como linfocitos. Este resultado indica que probablemente las células que captaron el DNACir ahora se encuentran liberándolo activamente, esto concuerda con la teoría postulada por el grupo de García-Olmo, la teoría de la genometástasis, en la que menciona que el DNACir proveniente de las células de un tumor primario es capaz de llegar a través de la circulación a órganos secundarios donde además puede ser captado por células susceptibles y favorecer su transformación, es decir metástasis (54). Es importante repetir estos ensayos y postergar el sacrificio hasta los 9 o 12 meses de tratamiento, cuando el

hepatocarcinoma se presente, para así poder evaluar la THG y tal vez observar metástasis.

Los resultados obtenidos en este trabajo, principalmente los resultados obtenidos en el Modelo de Yoshiji, proporcionan evidencia que sugiere la participación del DNACir como agente promotor; sin embargo, es necesario emplear un mayor número de animales y ya que las células secretan otros componentes celulares como citocinas y RNA además del DNACir, es necesario adicionar condiciones que apoyen su participación en el proceso de carcinogénesis; para ello sería necesario inocular proteinasas y DNasa I para degradar tanto a las proteínas asociadas y no asociadas al DNACir como el DNACir y así evaluar su efecto en la expresión de la GGT.

11. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo con el Modelo de Yoshiji sugieren fuertemente la participación del DNACir como agente promotor en el proceso de carcinogénesis.

- En el MHR se observó una mayor expresión de la GGT en los animales tratados con DEN + 2AAF +SW480; sin embargo, no se detectó la presencia de secuencias específicas humanas en el tejido hepático de este grupo experimental, por lo que no se pudo demostrar la participación del DNACir en el proceso de carcinogénesis en este modelo, razón por la cual se decidió emplear un segundo modelo de hepatocarcinogénesis.
- En el grupo experimental tratado con células HUVEC en el MHR, se observó una disminución en la expresión de la GGT, lo que sugiere la participación del DNACir de estas células u otros factores circulantes como agentes de protección.

- El Modelo de Yoshiji, en comparación con el MHR resultó ser más sencillo y menos agresivo; lo cual permitió la evaluación de la hipótesis propuesta. Sin embargo, es necesario desarrollar este modelo por un tiempo mayor a dos meses debido a que los nódulos GGT (+) son muy pequeños a este tiempo.
- En el Modelo de Yoshiji, se demostró la participación del DNACir en la promoción de la carcinogénesis; se observó que la inoculación de células SW480 por sí solas no es suficiente para desencadenar el proceso de carcinogénesis, lo mismo se observó al sustituir el DEN en el modelo por células SW480, con lo cual se descarta la participación del DNACir en la etapa de iniciación. Sin embargo, al sustituir el FB (promotor) con células SW480 se observó una expresión similar de la GGT que la del grupo control; lo cual apoya la hipótesis propuesta. Además fue posible encontrar secuencias humanas específicas no sólo en el tejido hepático, sino también el plasma de las ratas tratadas con células de origen humano, lo cual refuerza la teoría de la transferencia horizontal de genes,

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer [Internet]. [cited 2016 Apr 21]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
2. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 1978 Sep;38(9):2651–60.
3. National Cancer Institute Dictionary of cancer terms [Internet]. [cited 2016 Apr 21]. Available from: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?CdrID=45333>
4. OMS | Cáncer. WHO. World Health Organization.
5. Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: An emerging perspective. *Seminars in Cancer Biology.* 2008 Oct;18(5):372–7.
6. NCI: What is cancer? [Internet]. [cited 2016 Sep 17]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#how-cancer-arises>
7. Mechanisms of Carcinogenesis [Internet]. [cited 2016 Aug 1]. Available from: https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008_5.pdf
8. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 1984 Oct;44(10):4217–23.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
10. Moolgavkar SH. Commentary: Fifty years of the multistage model: remarks on a landmark paper. *Int J Epidemiol.* Oxford University Press; 2004 Dec;33(6):1182–3.
11. ARMITAGE P, DOLL R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 1954 Mar;8(1):1–12.
12. Hasegawa R, Futakuchi M, Mizoguchi Y, Yamaguchi T, Shirai T, Ito N, et al. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Letters.* 1998 Jan 30;123(2):185–91.
13. Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* 1991 Jun;5(9):2280–6.
14. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 2007 Dec;79(4):593–616.

15. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):436–40.
16. Loeb LA, Harris CC. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer Res*. 2008 Sep 1;68(17):6863–72.
17. Dragan YP, Pitot HC. The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*. 1992 May;13(5):739–50.
18. De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, Baroni GS, Benedetti A, Brenner D, et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis*. 2013 Jun;45(6):450–9.
19. Yoshiji H, Nakae D, Kinugasa T, Matsuzaki M, Denda A, Tsujii T, et al. Inhibitory effect of dietary iron deficiency on the induction of putative preneoplastic foci in rat liver initiated with diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 1991 Nov;64(5):839–42.
20. Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, et al. A Medium-Term, Rapid Rat Bioassay Model for the Detection of Carcinogenic Potential of Chemicals. *Toxicologic Pathology*. 2010 Feb 22;38(1):182–7.
21. Pérez-Carreón JI, López-García C, Fattel-Fazenda S, Arce-Popoca E, Alemán-Lazarini L, Hernández-García S, et al. Gene Expression Profile Related to the Progression of Preneoplastic Nodules toward Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Neoplasia*. 2006 May;8(5):373–7.
22. Song Y, Jin S-J, Cui L-H, Ji X-J, Yang F-G. Immunomodulatory Effect of *Stichopus japonicus* Acid Mucopolysaccharide on Experimental Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2013 Jun;18(6):7179–93.
23. Olga B-R, Sokol S, Le Berre V, François JM, Villa-Treviño S. An Approach to the Study of Gene Expression in Hepatocarcinogenesis Initiation. *Translational Oncology*. 2010 Apr;3(2):142–8.
24. Pérez-Carreón JI, López-García C, Fattel-Fazenda S, Arce-Popoca E, Alemán-Lazarini L, Hernández-García S, et al. Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats. *Neoplasia*. 2006 May;8(5):373–83.
25. Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D. Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*. 2005 Oct;156(2-3):101–11.

26. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. 1996. pp. 57–81.
27. OHLSON L. Mitoinhibitory effects of the tumor promoter 2-acetylaminofluorene in rat liver: loss of E2F-1 and E2F-3 expression and cdk 2 kinase activity in late G1. *Journal of Hepatology*. 2004 Jun;40(6):957–62.
28. Aydinlik H, Nguyen TD, Moennikes O, Buchmann A, Schwarz M. Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2001 Nov 22;20(53):7812–6.
29. West MB, Hanigan MH. γ -Glutamyl transpeptidase is a heavily N-glycosylated heterodimer in HepG2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010 Dec;504(2):177–81.
30. Komlos A, Volohonsky G, Porat N, Tuby C, Bluvshstein E, Steinberg P, et al. gamma-Glutamyl transpeptidase and glutathione biosynthesis in non-tumorigenic and tumorigenic rat liver oval cell lines. *Carcinogenesis*. 2002 Apr;23(4):671–8.
31. Rutenburg AM, Kim H, Fischbein JW, Hanker JS, Wasserkrug HL, Seligman AM. Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J Histochem Cytochem*. 1969 Aug;17(8):517–26.
32. Hendrich S, Pitot HC. Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1987;6(2):155–78.
33. Gallagher BC, Rudolph DB, Hinton BT, Hanigan MH. Differential induction of gamma-glutamyl transpeptidase in primary cultures of rat and mouse hepatocytes parallels induction during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1998 Jul;19(7):1251–5.
34. Denda A, Ura H, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Eimoto H, Takashima Y, et al. Possible involvement of arachidonic acid metabolism in phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1989 Oct;10(10):1929–35.
35. Thierry AR, Messaoudi El S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*. *Cancer and Metastasis Reviews*; 2016 Sep 18;:1–30.
36. Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Molecular Diagnosis & Therapy*. Springer International Publishing; 2016 May 31;:1–12.

37. Amoura Z, Piette JC, Chabre H, Cacoub P, Papo T, Wechsler B, et al. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum.* 1997 Dec;40(12):2217–25.
38. Lou X, Hou Y, Liang D, Peng L, Chen H, Ma S, et al. A novel Alu-based real-time PCR method for the quantitative detection of plasma circulating cell-free DNA: sensitivity and specificity for the diagnosis of myocardial infarction. *Int J Mol Med.* Spandidos Publications; 2015 Jan;35(1):72–80.
39. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, Shaked G, Bogdanov-Berezovsky A, Silberstein E, et al. Admission Cell Free DNA as a Prognostic Factor in Burns: Quantification by Use of a Direct Rapid Fluorometric Technique. *BioMed Research International.* Hindawi Publishing Corporation; 2014 Jun 22;2014(3):1–5.
40. Rauh P, Rickes S, Fleischhacker M. Microsatellite Alterations in Free-Circulating Serum DNA in Patients with Ulcerative Colitis. *Dig Dis.* Karger Publishers; 2004 Feb 2;21(4):363–6.
41. Hidestrand M, Tomita-Mitchell A, Hidestrand PM, Oliphant A, Goetsch M, Stamm K, et al. Highly sensitive noninvasive cardiac transplant rejection monitoring using targeted quantification of donor-specific cell-free deoxyribonucleic acid. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Apr 1;63(12):1224–6.
42. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry.* Clinical Chemistry; 2015 Jan 1;61(1):112–23.
43. Mitra I, Nair NK, Mishra PK. Nucleic acids in circulation: Are they harmful to the host? *J Biosci.* Springer-Verlag; 2012;37(2):301–12.
44. Nie K, Jia Y, Zhang X. Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol.* Springer Netherlands; 2015;36(1):7–19.
45. MANDEL P, METAIS P. [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb;142(3-4):241–3.
46. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar;37(3):646–50.
47. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology.* Karger Publishers; 1989 Jul 1;46(5):318–22.
48. García-Olmo D, González-Masiá, García-Olmo D. Circulating nucleic acids in

- plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *OTT*. 2013 Jul;:819–14.
49. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1659–65.
 50. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3956–63.
 51. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*. 2001 Nov;313(1-2):139–42.
 52. Gahan PB, Stroun M. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct*. 2010 Oct 12;28(7):529–38.
 53. Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M. [Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation]. *C R Acad Sci III, Sci Vie*. 1994 Oct;317(10):869–74.
 54. Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, 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 Jan 13;70(2):560–7.
 55. García-Olmo DC, García-Olmo D. Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomestasis. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(1-2):153–61.
 56. Hunter KW, Crawford NPS, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*. 4 ed. BioMed Central; 2008;10 Suppl 1(S1):S2.
 57. Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Taja-Chayeb L, Anker P, Herrera-Goepfert R, Medina-Velázquez LA, et al. Cancer Progression Mediated by Horizontal Gene Transfer in an In Vivo Model. Lichty B, editor. *PLoS ONE*. 2012 Dec 28;7(12):e52754–12.
 58. Mitra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci*. 2015 Feb 28;40(1):91–111.
 59. Trejo-Becerril C. El DNA libre en circulación y su papel en la transformación celular. [México]; 2014.
 60. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Res*. 1976 Aug;36(8):2832–

9.

61. Staub M, Antoni F. Excretion of newly synthesized DNA by tonsil lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press; 1978 Aug;5(8):3071–9.
62. Garcia-Arranz M, García-Olmo D, Vega-Clemente L, Stroun M, Gahan PB. Non-dividing Cell Virtosomes Affect In Vitro and In Vivo Tumour Cell Replication. *Adv Exp Med Biol.* Cham: Springer International Publishing; 2016;924(Chapter 9):43–5.
63. Southam CM. Immunologic tolerance to human cancer transplants in rats. *Transplantation.* 1967 May 1;5(3):562.
64. Song RS, Carroll JM, Acevedo L, Wu D, Liu Y, Snyder EY. Generation, Expansion, and Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) Derived From the Umbilical Cords of Newborns. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2014 May 16;29:1C.16.1–13.
65. Pashoutan Sarvar D, Shamsasenjan K, Akbarzadehlaleh P. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: New Opportunity in Cell-Free Therapy. *Adv Pharm Bull.* 2016 Sep;6(3):293–9.
66. Mao C, Hou X, Wang B, Chi J, Jiang Y, Zhang C, et al. Intramuscular injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function in dilated cardiomyopathy rats. *Stem Cell Res Ther. BioMed Central;* 2017 Jan 28;8(1):18.
67. Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, Samuel CS, Tchongue J, Ilancheran S, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Reduce Fibrosis of Bleomycin-Induced Lung Injury. *The American Journal of Pathology.* 2009 Jul;175(1):303–13.

APÉNDICE I: SOLUCIONES

Purificación de linfocitos

Solución amortiguadora de amonio, cloro y potasio (ACK), pH 7.2

Cloruro de amonio	4.145 g
Bicarbonato de potasio	1 g
EDTA sal disódica	37.2 mg
Agua bidestilada	aforar a 500 mL

Es importante filtrar la solución con un filtro de 0.22 μm .

Aislamiento de DNA

Buffer de extracción, pH 7.8

Tris-base	10 mM
EDTA	0.02 M
SDS	0.5 %