



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Reposicionamiento terapéutico en cáncer de colon. Uso de la DNasa I en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Corina Guadalupe Bermúdez Esquivel.

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfonso Dueñas González.
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes.
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Rommel Chacón Salinas.
Instituto Politécnico Nacional

Ciudad de México. Noviembre, 2022



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.



CGEP/PMDCBQ/50
85B3D2-63010A7931EBA
Asunto: Jurado de examen

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **15 de agosto de 2022**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias** del/la estudiante **BERMUDEZ ESQUIVEL CORINA GUADALUPE**, con la tesis **“Reposicionamiento terapéutico en cáncer de colon. Uso de la DNasa I en un modelo in vitro e in vivo.”**, dirigida por el/la Dr(a). **DUEÑAS GONZALEZ ALFONSO**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
ROBLES FLORES MARTHA	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	25 / 08 / 22	
LIZANO SOBERÓN MARCELA	PMDCBQ	SECRETARIO	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	30 / 08 / 22	
OSTROSKY-WEGMAN SHEJET PATRICIA	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	01 / 09 / 22	
TAJA CHAYEB LUCÍA GUADALUPE	NO ACREDITADO	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	05 / 09 / 22	
CATALINA TREJO BECERRIL	NO ACREDITADO	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	12 / 09 / 22	

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de agosto de 2022

Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:

El trabajo de tesis “Reposicionamiento terapéutico en cáncer de colon. Uso de la DNasa I en un modelo *in vitro* e *in vivo*” realizado por Corina Guadalupe Bermúdez Esquivel fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca (CVU: 1082174, N.º de beca 777037) para la realización de los estudios de Maestría en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a los miembros del comité tutor por la asesoría de este trabajo:

Dr. Alfonso Dueñas González.	Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes.	Instituto Nacional de Medicina Genómica.
Dr. Rommel Chacón Salinas.	Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco a la Dra. Rocío Morales Bárcenas, por la ayuda en el manejo del citómetro de flujo para la realización de los ensayos de muerte celular.

Se agradece también a los miembros del jurado por los comentarios y sugerencias propuestos en la revisión de esta tesis:

Presidente:	Dra. Martha Robles Flores.
Secretario:	Dra. Marcela Lizano Soberón.
Vocal:	Dra. Patricia Ostrosky-Wegman Shejet.
Vocal:	Dra. Lucía Guadalupe Taja Chayeb.
Vocal:	Dra. Catalina Trejo Becerril.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cáncer.....	3
1.2 Epidemiología.....	4
1.3 Cáncer de colon.....	4
1.4 DNA circulante extracelular (DNAcir).....	7
1.5 Funciones del DNAcir.....	10
1.6 DNAcir y Cáncer.....	11
1.7 CaCO como modelo de estudio.....	12
1.8 El DNAcir como blanco terapéutico.....	12
1.9 Reposicionamiento terapéutico.....	13
1.10 DNasa I.....	13
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVO GENERAL	22
6. OBJETIVOS PARTICULARES	22
7. METODOLOGÍA	23
7.1 Cultivo de las líneas celulares SW480 y CT26.....	24
7.2 Preparación de la DNasa I.....	24
7.3 Ensayo de viabilidad celular.....	24
7.4 Ensayo de clonogenicidad.....	25
7.5 Citometría de flujo para evaluar apoptosis y necrosis.....	25
7.6 Purificación y cuantificación de DNAex en el medio condicionado.....	26
7.7 Recolección y concentración de DNAex en medios condicionados.....	27
7.8 Evaluación del efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno.....	27
7.9 Efecto de la DNasa I en la viabilidad de células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno.....	28
7.10 Administración de dosis no tóxicas reportadas en humanos a ratones BALB/c.....	28
7.11 Obtención de la dosis equivalente en ratones.....	30
7.12 Inoculación de células CT26 en ratones BALB/c.....	30
7.13 Efecto antitumoral del tratamiento con la DNasa I.....	31
7.14 Cuantificación de los niveles de DNAcir en el suero de ratones BALB/c.....	32
7.15 Análisis estadístico.....	32
8. RESULTADOS	33
8.1 Efecto de la DNasa I en la viabilidad de las líneas celulares CT26 y SW480.....	33
8.2 Evaluación de muerte celular en las líneas celulares SW480 y CT26.....	34

8.3 Efecto de la DNasa I en la clonogenicidad de las líneas celulares CT26 y SW480.	36
8.4 Cuantificación de los niveles de DNAex en el medio condicionado de las líneas celulares CT26 y SW480 con y sin tratamiento de la DNasa I.....	38
8.5 Efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno en las líneas celulares SW480 y CT26.....	40
8.6 Efecto de la DNasa I en la viabilidad de células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno.....	41
8.7 Administración de dosis no tóxicas reportadas en humanos a ratones BALB/c.	43
8.8 Efecto antitumoral de la DNasa I en ratones BALB/c.	44
8.9 Cuantificación de los niveles de DNAcir en el suero de ratones BALB/c con y sin el tratamiento de la DNasa I.....	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	58
ANEXOS	59
BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de carcinogénesis en cáncer de colon.	5
Figura 2. DNA presente en fluidos fisiológicos.	8
Figura 3. Actividad de la DNasa I de bovino.	14
Figura 4. Esquema metodológico del desarrollo experimental.....	23
Figura 5. Ensayo con Cristal Violeta para evaluar el efecto de la DNasa I en la viabilidad de SW480 y CT26.	34
Figura 6. Análisis por citometría de flujo de muerte celular en la línea SW480.	35
Figura 7. Análisis por citometría de flujo de muerte celular en la línea CT26.....	36
Figura 8. Ensayos clonogénicos en las líneas SW480 y CT26.	37
Figura 9. Cuantificación por fluorimetría de la concentración del DNAex en el medio condicionado de SW480.	38
Figura 10. Cuantificación por fluorimetría de la concentración de DNAex en el medio condicionado de CT26.....	39
Figura 11. Efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno sobre la viabilidad celular de las líneas SW480 y CT26.....	41
Figura 12. Efecto de la DNasa I en células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno.....	42

Figura 13. Peso de ratones BALB/c.....	43
Figura 14. Efecto de la DNasa I en el modelo <i>in vivo</i>	45
Figura 15. Concentración de DNAcir en los grupos control.....	46
Figura 16. Concentración de DNAcir en el suero de ratones con tumor.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras asociadas al DNAcir.....	9
Tabla 2. Resumen de los estudios realizados <i>in vivo</i> con la DNasa I.....	20
Tabla 3. Conversión de dosis animal a dosis equivalente humana.	29
Tabla 4. Dosis equivalentes no tóxicas en ratones.	29
Tabla 5. Esquema de tratamiento (Johnson <i>et al.</i> , 1954).	30

ABREVIATURAS:

CaCO	Cáncer de colon.
DNAcir	DNA circulante.
DNAex	DNA extracelular.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
FAP	Poliposis adenomatosa familiar.
H ₂ O _{bd}	Agua bidestilada.
i.m	Inyección intramuscular.
i.p	Inyección intraperitoneal.
i.v	Inyección intravenosa.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima.
LCF	Líquido cefalorraquídeo.
NETs	Trampas de DNA extracelular de neutrófilos.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero.
rpm	Revoluciones por minuto.

RESUMEN

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento desordenado o anormal de las células y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera la principal causa de muerte en el mundo. Uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia tanto en México como a nivel mundial es el cáncer de colon (CaCO). Su diagnóstico temprano se basa en la detección de sangre oculta en heces y en la colonoscopia. Actualmente, las investigaciones se han enfocado en identificar biomarcadores en la llamada biopsia líquida, con utilidad en el pronóstico y diagnóstico. Esta prueba analiza el material derivado de tumores, siendo sus fuentes principales de detección las células tumorales circulantes y los ácidos nucleicos circulantes los cuales, además, están siendo considerados como un blanco terapéutico.

El DNA circulante (DNAcir) es el DNA extracelular que se encuentra en la circulación sanguínea y que se ha demostrado que puede transferir información genética de una célula a otra (transferencia horizontal) y modificarla. En pacientes con cáncer se han detectado concentraciones altas, así como un perfil electroforético más fragmentado; además se ha demostrado que contiene alteraciones genéticas semejantes al del tumor del cual se origina, considerándose así, como un blanco terapéutico prometedor y su degradación con la DNasa I como un posible tratamiento. En particular, la DNasa I bovina ha sido estudiada en diversos modelos, demostrando efectos sobre la viabilidad, clonogenicidad, migración y adhesión de células tumorales, así como también un efecto antimetastásico en modelos murinos.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la DNasa I sobre la viabilidad, clonogenicidad y concentración del DNAex en los medios condicionados de líneas celulares de cáncer de colon humano (SW480) y murino (CT26); así como evaluar la respuesta al tratamiento con la dosis equivalente de humano en ratón de la DNasa I en un modelo de ratones BALB/c con tumores derivados de células CT26.

Para el modelo *in vitro*, las líneas celulares SW480 y CT26 se trataron con seis diferentes dosis de DNasa I (120, 240, 360, 480 y 600 U/mL) durante 72 h y se evaluó la viabilidad, clonogenicidad y muerte celular por apoptosis o necrosis, conjuntamente se cuantificó la concentración de DNAex en los medios condicionados de cada línea celular. Adicionalmente se determinó el efecto de una alta concentración de DNAex exógeno en la viabilidad de las células SW480 y CT26 con y sin el tratamiento con la DNasa I. Para el modelo *in vivo*, ratones BALB/c se inocularon con células CT26, posteriormente se les administró por vía intraperitoneal la dosis equivalente de humanos en ratones de la DNasa I (161,838 U/kg igual a 3,236 U por ratón) en un esquema de 5x2, dónde cinco días continuos recibieron el tratamiento y dos días descansaron, se valoró el desarrollo del volumen tumoral y la concentración de DNAcir en el suero de estos ratones.

Se observó que la DNasa I disminuye la viabilidad y clonogenicidad de las líneas celulares SW480 y CT26 con las dosis más altas de la DNasa I; además, el principal mecanismo de muerte celular por el cual disminuyó la viabilidad fue la apoptosis celular. Sin embargo, estos resultados no correlacionaron con el efecto de la DNasa I sobre las concentraciones del DNAex ya que las líneas celulares evaluadas respondieron de manera distinta al tratamiento sin mostrar un efecto dosis-respuesta. Adicionalmente se observó que una alta concentración de DNAex exógeno en el medio condicionado de estas dos líneas celulares, aumenta su viabilidad, pero el efecto puede ser contrarrestado por el tratamiento con la DNasa I en la línea celular CT26.

En el modelo murino se demostró que el tratamiento con la dosis equivalente de humanos en ratones de la DNasa I, retrasó el desarrollo tumoral; ya que, al concluir el experimento, el volumen tumoral fue 37% menor que en el grupo control. Este efecto correlacionó con la disminución del DNAcir en el suero de estos ratones.

Los resultados obtenidos en este trabajo aunados a los antecedentes de la literatura sugieren que la DNasa I puede utilizarse como un agente antitumoral con potencial en el reposicionamiento terapéutico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer.

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento desordenado o anormal de las células (Roy & Saikia, 2016), evadir mecanismos de muerte celular y transformación de células normales en tumorales que pueden propagarse e invadir otros tejidos para generar metástasis (Fauci *et al.*, 2000).

El inicio y la progresión tumoral son considerados como procesos multifactoriales que involucran alteraciones genéticas, predisposiciones hereditarias y factores ambientales, por ejemplo: carcinógenos ambientales como la radiación, exposición a metales pesados, estilos de vida sedentarios, infecciones virales y bacterianas son considerados factores de riesgo externos que pueden desencadenar alteraciones moleculares en las células. Por otra parte, la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores pueden traer como consecuencia una inadecuada regulación del ciclo celular y daño al DNA que se resume en la acumulación de mutaciones y el desarrollo de un fenotipo maligno (Fauci *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2017).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron seis características del cáncer que buscan explicar su biología; dentro de estas características se encuentra el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis, invasión y metástasis, más tarde agregaron la reprogramación del metabolismo celular y evasión de la destrucción inmune (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan, 2022). Si bien el cáncer es una enfermedad compleja, los hallazgos de las múltiples investigaciones han permitido tener una mejor comprensión del origen y evolución de los diferentes tipos de cáncer.

1.2 Epidemiología.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo; en el año 2020 se reportaron alrededor de 10 millones de defunciones y 19.3 millones de nuevos casos, siendo el cáncer de mama, pulmón, colorrectal y próstata los de mayor incidencia. A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la investigación, la incidencia y mortalidad continúan aumentando, por ejemplo, en México se ha observado un aumento en la tasa de defunciones: de 6.18 en 2010 a 7.17 en 2020, por cada 10,000 personas; por lo que se considera un problema de salud pública (Sung *et al.*, 2021; INEGI, 2022; GLOBOCAN, 2020).

Actualmente en México, el cáncer ocupa la cuarta causa de muerte (8.37%) después de las enfermedades del corazón (20.1%), COVID-19 (18.4%) y diabetes mellitus (13.9%; INEGI, 2021). Entre los tipos de cáncer con mayor incidencia en primer lugar se encuentra el cáncer de mama, seguido por el de próstata, cérvix, colorrectal y tiroides (GLOBOCAN, 2020).

En particular, el cáncer colorrectal en nuestro país ocupa un lugar importante, ya que es considerada la cuarta causa de muerte por cáncer; en hombres, la mayor tasa de defunciones se da entre los 30 y 59 años mientras que en mujeres es después de los 60 años. La edad promedio de diagnóstico es a los 50 años y aunque en general ha sido considerada una neoplasia con mayor incidencia en edades avanzadas, en los últimos años se ha incrementado su detección en personas entre los 20 y 30 años (INEGI, 2022; GLOBOCAN, 2020).

1.3 Cáncer de colon.

En el año de 1990, Fearon y Volgestein propusieron uno de los modelos más aceptados para explicar la progresión del cáncer de colon (CaCO), el cual indica que la alteración genética más temprana ocurre frecuentemente en el gen APC y en un inicio se manifiesta en las glándulas productoras de moco que revisten al colon y es seguido de la aparición y acumulación de mutaciones en genes que

regulan procesos como la proliferación celular y reparación del DNA (Figura 1; Fearon & Vogelstein, 1990).

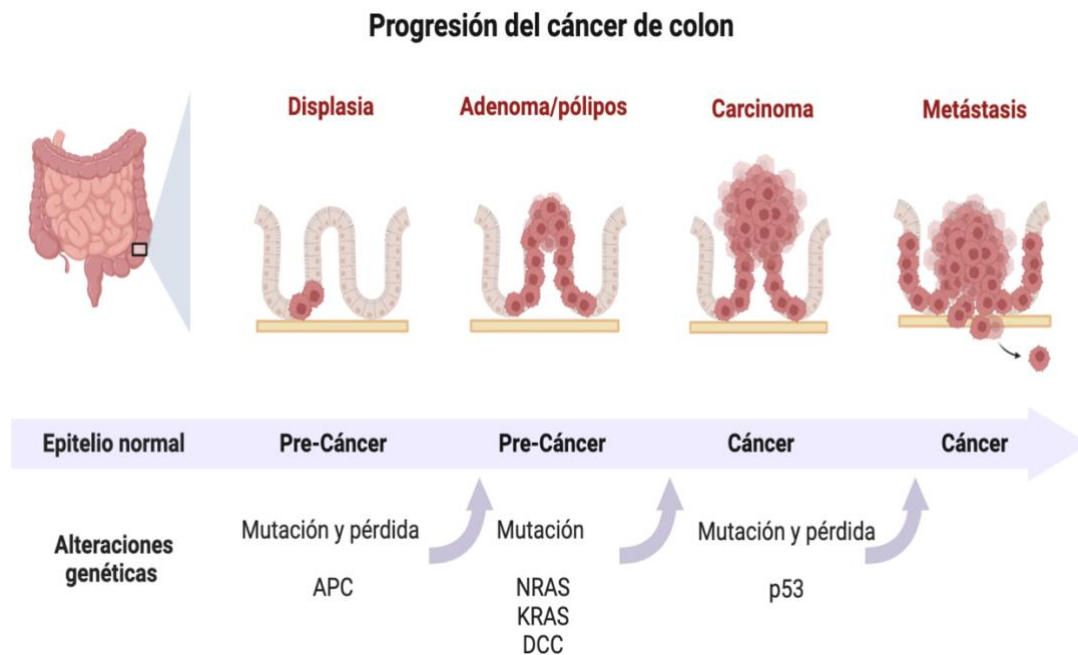


Figura 1. Modelo de carcinogénesis en cáncer de colon. Se muestra la secuencia de eventos genéticos que ocurren con la progresión del cáncer de colon. En esta secuencia participan oncogenes como K-RAS que permiten un aumento de la proliferación celular y, por el contrario, la inactivación de genes supresores de tumores como APC, DCC, P53 que evitan el control de la proliferación celular y apoptosis (Fearon & Vogelstein, 1990).

Aproximadamente el 75% de los casos de CaCO son de origen esporádico y están muy relacionados con el modelo de Fearon y Volgestein, mientras que el 25% restante es de origen hereditario ligado a síndromes como poliposis adenomatosa familiar (FAP), el cual se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de pólipos en el colon; o bien, el síndrome de Lynch o CaCO no poliposo hereditario (HNPCC) que está relacionado a una incorrecta reparación de DNA (Chabner *et al.*, 2013; Cruz-Bustillo Clarens, 2004; Fearon & Vogelstein, 1990).

La etiología del CaCO abarca desde factores genéticos como la predisposición hereditaria que se mencionó anteriormente, hasta factores ambientales, los cuales dependen en gran parte del estilo de vida de las personas; uno de los más destacables es el tipo de dieta, ya que el consumo excesivo de grasas, alcohol, tabaco y café se asocian a un mayor riesgo de desarrollar CaCO, otros

factores que influyen son el sedentarismo y el uso de analgésicos no esteroideos (Morgan-Villela *et al.*, 2008).

El cuadro clínico que presentan los pacientes al inicio de la enfermedad depende de la localización del tumor, la mayoría se encuentran en el colon izquierdo llegando a causar obstrucción intestinal parcial o total lo que tiene como consecuencia dolor abdominal, sangrado y disminución en el tamaño de las heces. Por el contrario, si el tumor está ubicado en el colon derecho, no hay obstrucción de los intestinos, pero la absorción de líquidos es ineficiente y por consecuencia el paciente presenta heces líquidas, pérdida de peso y dolor abdominal (Rivera *et al.*, 2017).

El CaCO tiene un cuadro clínico muy general y similar al de otras enfermedades que se presentan en el colon, por lo tanto, detectarlo oportunamente es importante. Las pruebas recomendadas para su detección temprana son la sangre oculta en heces y la colonoscopia. Por su parte, la determinación del antígeno carcinoembrionario tiene valor pronóstico (Chabner *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2017).

Una vez confirmada la neoplasia, el tratamiento depende de la progresión del cáncer; por ejemplo, en las etapas I, II, y III cuando la enfermedad está localizada o es operable, se utiliza cirugía con o sin quimioterapia adyuvante. Para la etapa IV los pacientes presentan metástasis por lo que la quimioterapia es la mejor opción, además se evalúa la resección de la lesión primaria; sin embargo, los pacientes en esta etapa no tienen un buen pronóstico (Juárez-Vázquez & Rosales-Reynoso *et al.*, 2014).

Actualmente, las investigaciones se han enfocado en mejorar el diagnóstico y pronóstico de las personas con CaCO identificando por ejemplo firmas genéticas que funcionan como biomarcadores con utilidad en el pronóstico y diagnóstico del cáncer. Estos biomarcadores pueden encontrarse en biopsias de tejido, así como en la llamada biopsia líquida, siendo esta última la más actual y que ha generado mucho interés al ser menos invasiva (Poulet *et al.*, 2019; Ignatiadis *et al.*, 2021).

La biopsia líquida es una prueba complementaria o alternativa a la biopsia de tejido que analiza el material derivado de tumores que se encuentran en la sangre u otros fluidos fisiológicos, su objetivo principal consiste en aportar información para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de la enfermedad; sus principales fuentes de detección son las células tumorales circulantes y los ácidos nucleicos circulantes los cuales están siendo considerados como un blanco terapéutico (Poulet *et al.*, 2019; Alix-Panabières & Pantel, 2021).

1.4 DNA circulante extracelular (DNAcir).

El DNA extracelular (DNAex) hace referencia al DNA que se encuentra fuera de la célula y que proviene del núcleo; generalmente se encuentra envuelto en vesículas o en complejos lipoproteicos que lo protegen del sistema inmunológico y de las nucleasas que se encuentran en el medio extracelular. El término DNAex abarca tanto el DNA que está en fluidos fisiológicos circulantes (DNAcir) como: sangre y fluidos linfáticos; así como el que no está en circulación: tales como heces, saliva, esputo, orina, semen, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, bilis, lavado bronquial, cepillado esofágico, secreción mamaria, desgarres y quistes (Figura 2; Thierry *et al.*, 2016). El DNAcir se caracteriza por ser de cadena sencilla o doble con una longitud que abarca desde menos de 500 pares de bases (pb) hasta 21 mil pb (Martínez-Ezquerro *et al.*, 2008).

El procedimiento por el cual el DNAcir se secreta al medio extracelular, continúa en estudio; sin embargo, el mecanismo mejor descrito es mediante la liberación pasiva el cual implica daño celular; dentro de estos se encuentra la apoptosis (considerada como la principal fuente de DNAcir), necrosis, fagocitosis, y oncosis (Figura 2). También se ha descrito la secreción activa de DNAcir, el cual se caracteriza por la liberación espontánea del DNA de células vivas, proceso que implica gasto energético (Thierry *et al.*, 2016; Gahan *et al.*, 2008).

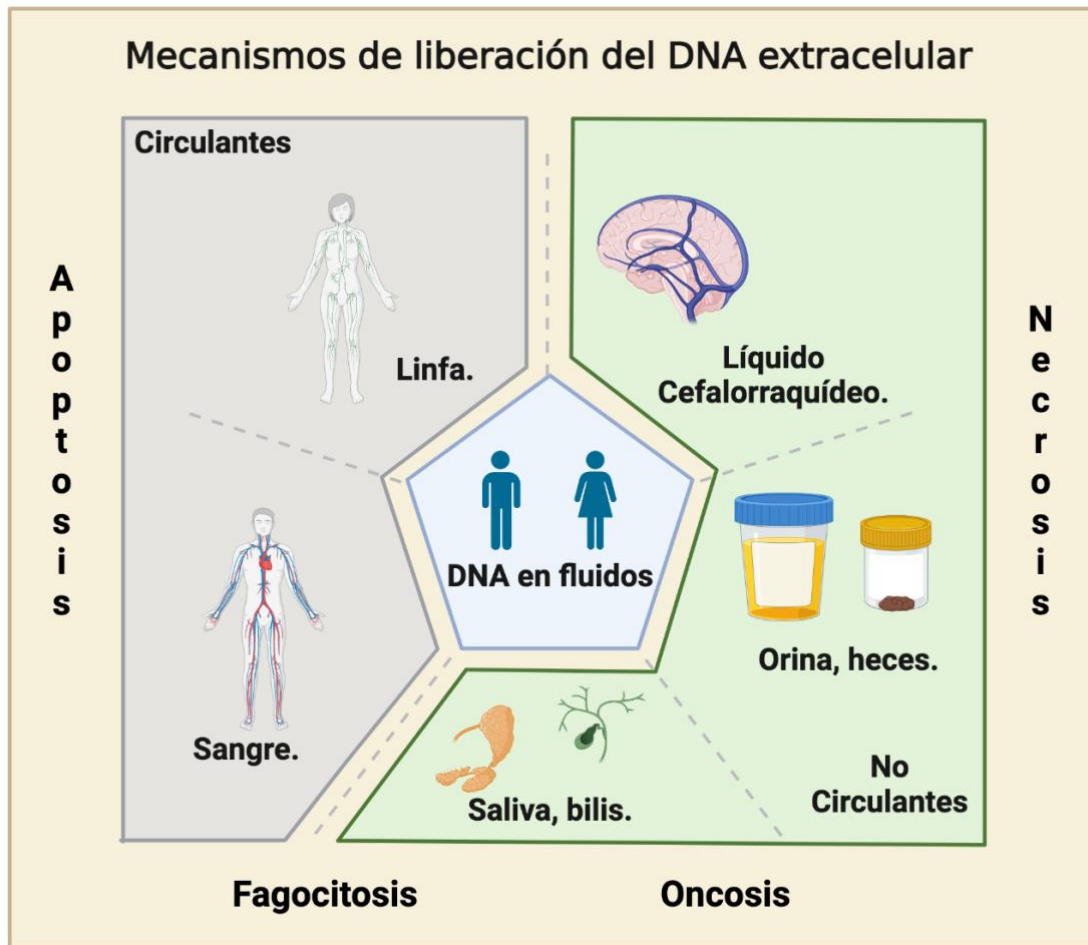


Figura 2. DNA presente en fluidos fisiológicos. El DNA liberado en el organismo se puede encontrar en fluidos fisiológicos circulantes (DNACir) y no circulantes y la mayoría de este material genético deriva de procesos en los que existe daño celular (Thierry *et al.*, 2016; Gahan *et al.*, 2008).

La estructura y composición del DNACir puede ser monomérica u oligomérica y estar solo o unido a histonas. Debido a la heterogeneidad del DNACir su clasificación se da con base en su tamaño: microvesículas y complejos macromoleculares o por los elementos que lo acompañan: vesicular y no vesicular (Grabuschnig *et al.*, 2020). En la tabla 1 se describen los diferentes tipos de DNACir y sus características, los cuales se han considerado como una firma para conocer el mecanismo de liberación por el cual se originan.

Tabla 1. Estructuras asociadas al DNACir.

Estructura	Componentes que lo integran	Tamaño	Mecanismo de liberación
Microvesículas			
Exosomas	Proteínas, lípidos, RNAm, microRNA y DNA en menor cantidad.	30-100 nm	Apoptosis Fagocitosis
Micropartículas	DNA, RNA envuelto en una parte de la membrana celular.	100-200 nm	Liberación directa de la membrana plasmática.
Cuerpos apoptóticos	DNA degradado por apoptosis envuelto vesículas.	1 y 5 μ m	Apoptosis
Complejos macromoleculares			
Virtosoma	DNA, RNA y lipoproteínas.	Variado	Secreción activa
NETs	DNA de neutrófilos	Variado	NETosis

(Thierry *et al.*, 2016; Grabuschnig *et al.*, 2020).

1.5 Funciones del DNACir.

Diversos autores han sugerido que el DNACir tiene la capacidad de actuar como un mensajero intercelular ya que puede transferir información genética de una célula a otra y modificarlas, lo cual ha sido comprobado en diversos experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los primeros reportes se llevaron a cabo en la década de los 60, en los que la exposición a DNACir de un organismo diferente causaba modificaciones en plantas o bacterias (Thierry *et al.*, 2016). Más tarde, en el año de 1965, Bendich y colaboradores, demostraron que el DNACir tumoral inyectado a ratones inducía desarrollo de tumores. Otras investigaciones que apoyaron esta observación fueron realizadas por Anker y colaboradores en 1994, cuando comprobaron la transformación de células NIH/3T3 después de ser expuestas y de adquirir el DNACir liberado por la línea celular de cáncer de colon SW480, la cual tiene mutado el gen *K-RAS* (Bendich *et al.*, 1965; Fernández-Domínguez *et al.*, 2021; Anker *et al.*, 1994).

Con base en lo anterior, surgió la hipótesis hoy conocida como genometástasis, la cual propone que el DNACir liberado por las células tumorales es capaz de transferirse a células susceptibles lejanas al tumor primario y generar metástasis. Lo anterior se ha estudiado en modelos de ratón y se ha observado que el DNACir derivado de un proceso tumoral puede contener fragmentos de oncogenes que estimulen la metástasis. Actualmente la hipótesis de la genometástasis continúa siendo una teoría; sin embargo, diversas investigaciones intentan explicar cómo se realiza la transferencia de DNACir, siendo la composición y la estructura en lo que está envuelto, lo que ha dado la pauta de cómo abordar el mecanismo de transferencia; ello debido a que se ha observado que estructuras como cuerpos apoptóticos, virtosoma y exosomas pueden ser responsables de la transformación a distancia. Por ejemplo; en el caso de los NETs se ha demostrado que pueden promover el desarrollo de metástasis inmovilizando células tumorales y creando un ambiente propicio para su desarrollo. (Peters & Pretorius, 2012; Thierry *et al.*, 2016; Albregues *et al.*, 2018).

Otra forma en la que podría llevarse a cabo la transformación de las células es mediante receptores de membrana, de manera *in vitro* se ha comprobado que la proteína CCDC25 presente en la superficie de las células tumorales puede reconocer y unirse al DNA que forma parte de los NETs e incluso activar vías para mejorar la motilidad de estas células. Otro ejemplo es el de los receptores tipo Toll 9 que están presentes en células del sistema inmunitario como monocitos, macrófagos y células detriticas, que, aunque son intracelulares se tiene descrito que pueden reconocer DNA. Aún con estos ejemplos, el reconocimiento e internalización del DNAex aún no está totalmente descrito, sin embargo, su composición es de suma importancia (L. Alekseeva & Mironova, 2021).

1.6 DNACir y Cáncer.

El DNACir es detectable en personas sanas; sin embargo, los niveles varían en diversas condiciones patológicas, como enfermedades sistémicas, inflamatorias, infecciosas y en cáncer. Algunos estudios estiman que en sujetos sanos los niveles van de 1-100 ng/mL, mientras que en pacientes con cáncer estas cantidades se elevan a concentraciones de hasta 1500 ng/mL (Kustanovich *et al.*, 2019). Los niveles de DNACir que se detectan en pacientes dependen del tipo de tumor y estadio de la neoplasia; por ejemplo, en etapas tempranas, los niveles de DNACir pueden ser bajos o indetectables, pero aumentan en etapas tardías o metastásicas. Bettegowda y colaboradores en 2014, encontraron que el DNACir fue detectable en el 75% de los pacientes de estadios avanzados con cáncer de páncreas, ovario, colorrectal, vejiga, gastroesofágico, mama, melanoma, hepatocelular y de cabeza y cuello; mientras que, en tumores en estadios no-metastásicos, el DNACir se detectó entre el 50 y 75% de pacientes con cáncer colorrectal, gastroesofágico, cáncer de páncreas y adenocarcinoma de mama (Bettegowda *et al.*, 2014).

El nivel de DNACir no es la única característica distintiva en pacientes con cáncer; ya que se ha observado que tiene un perfil electroforético más fragmentado con un rango de tamaño de entre 160 y 180 pb (Jiang *et al.*, 2015). Además, contiene alteraciones genéticas (las presentes en el tumor), como, por ejemplo:

fragmentos del gen *K-RAS* mutado en el DNACir de pacientes con cáncer de mama y de colon, mutación que es específica de las células tumorales (Stroun *et al.*, 1989); además, alteraciones en la metilación (Cheng *et al.*, 2016). Otras mutaciones frecuentemente encontradas en el DNACir son las de los genes supresores de tumor; tales como el gen *P53* el cual tiene la capacidad de regular el ciclo celular y contribuir a la reparación en el daño del DNA, promoviendo la apoptosis y la estabilidad genómica; y de los genes involucrados en la reparación del DNA como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (Martínez-Ezquerro *et al.*, 2008; Payá Roma *et al.*, 2006).

1.7 CaCO como modelo de estudio.

La liberación de DNAex en el torrente sanguíneo (DNACir) de los pacientes con neoplasias es diferente dependiendo del tipo de cáncer; Bettegowda y colaboradores en 2014, encontraron que los niveles de DNACir son más altos y fácilmente detectables principalmente en personas con CaCO, vejiga, mama y melanoma (Bettegowda *et al.*, 2014).

Particularmente, el CaCO tiene una cinética de crecimiento tumoral que explica los altos niveles de DNACir en pacientes con este tipo de tumores. Los parámetros que se evalúan en una cinética de crecimiento tumoral consisten en el coeficiente de proliferación (15%) y el factor de pérdida de células tumorales (96%). Un nivel tan alto de pérdida de células tumorales se traduce en una fuente importante de DNACir que ocasiona una mayor liberación de DNACir al torrente sanguíneo lo que lo hace un modelo de estudio adecuado (Thierry *et al.*, 2016; Bettegowda *et al.*, 2014; Meyer, 1981).

1.8 El DNACir como blanco terapéutico.

El DNACir hoy en día es considerado como un blanco terapéutico ya que se ha demostrado su papel biológico como mensajero intercelular y su posible participación en la teoría de la genometástasis; por estas razones se ha considerado a la DNasa I como un posible tratamiento, ya que tiene la capacidad de degradar al DNACir, además se ha demostrado en diferentes estudios tanto

in vitro como *in vivo* que esta enzima es capaz de inducir muerte en diferentes líneas celulares e incluso disminuye el número de metástasis en ratones (Thierry *et al.*, 2016).

1.9 Reposicionamiento terapéutico.

En los últimos años, una de las estrategias novedosas implementadas en el tratamiento del cáncer es el reposicionamiento terapéutico de fármacos, el cual consiste en el uso de fármacos ya aprobados y establecidos para tratar afecciones no malignas, pero con un nuevo enfoque y función hacia el cáncer (González-Fierro & Dueñas-González, 2021). Ejemplo de reposicionamiento terapéutico ha sido el uso de la ribavirina con efecto antitumoral en líneas celulares de CaCO, glioma, próstata, mama y cervicouterino y cuyo uso convencional era como inhibidor de la replicación viral (De la Cruz-Hernández *et al.*, 2015). Estudios clínicos de fase II y III con la combinación de hidralazina y valproato han demostrado un efecto favorable sobre la supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer de cuello uterino y como una terapia no tóxica y eficaz en pacientes con síndrome mielodisplásico (Coronel *et al.*, 2011; Candelaria *et al.*, 2011). Otros ejemplos menos convencionales, es el uso de la DNasa I de bovino y proteasas para eliminar el DNACir con efectos antitumorales en un modelo *in vivo* (Trejo-Becerril *et al.*, 2016).

1.10 DNasa I.

La DNasa I es una enzima que puede hidrolizar enlaces fosfodiéster del DNA; es codificada por el gen *DNASE1* y expresada en distintos tejidos, principalmente en órganos del sistema digestivo. Particularmente, la DNasa I de vertebrados que es activada por Mg^{2+} y Ca^{2+} , tiene la capacidad de escindir al DNA bicatenario de 100 a 500 veces con más eficacia que al DNA monocatenario (Lauková *et al.*, 2020). La función de esta enzima es de gran relevancia ya que su deficiencia se ha vinculado a patologías como lupus eritematoso sistémico y en una degradación ineficiente de DNACir; por lo tanto, la actividad de la DNasa I en pacientes con cáncer se ha considerado como un biomarcador (Lauková *et al.*, 2020; Fujihara *et al.*, 2012).

La DNasa I de bovino fue la primera DNasa descubierta y cristalizada por Kunitz, está formada de 282 aminoácidos y tiene un tamaño de 45 x 40 x 35 A⁰; además, carece de especificidad, pero los cortes los realiza preferentemente en el lado 5' de las bases pirimidínicas (Figura 3; Leiva, A., *et al* 2002). Esta enzima ha sido usada ampliamente en diferentes ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha comprobado que puede inhibir la proliferación de células tumorales (Alcázar-Leyva *et al.*, 2009) y prevenir el desarrollo de metástasis en modelos de ratones (Lauková *et al.*, 2020).

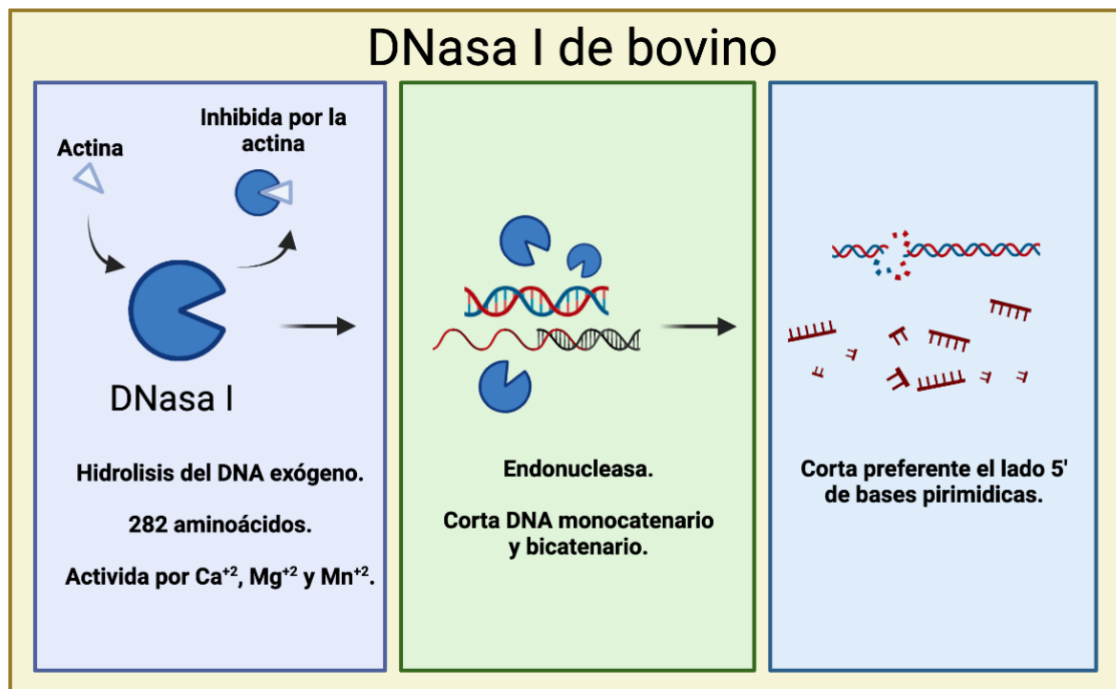


Figura 3. Actividad de la DNasa I de bovino. Se muestran las preferencias y características de la DNasa I para realizar la degradación de DNA, esta actividad puede ser inhibida principalmente por la actina (Leiva, A., *et al* 2002, Lauková *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

Las primeras observaciones en relación con el DNACir surgieron entre 1940 y 1988, la mayoría señalaron que había presencia de este material nucleico en la sangre de personas sanas o con alguna patología (Tan *et al.*, 1966; Thierry *et al.*, 2016). La primera patología con la que se le relacionó fue el lupus eritematoso (Tan *et al.*, 1966); más tarde, León y colaboradores (1977) demostraron una mayor cantidad de DNACir en pacientes con cáncer (Leon *et al.*, 1977).

La correlación del DNACir con el cáncer, cobró relevancia clínica al encontrar que alteraciones genéticas del tumor primario, se detectaban también en el DNACir; como es el caso de las mutaciones en el gen *K-RAS* (Vasioukhin *et al.*, 1994). Años más tarde se demostró su función como mensajero intercelular y su capacidad para la transferencia horizontal de genes (Aucamp *et al.*, 2016). Adicionalmente se determinó que la presencia de una mayor concentración de DNACir en la sangre de personas con cáncer podría explicarse debido a un aumento en la masa tumoral y una disminución en la cantidad y actividad de la DNasa I endógena (Tamkovich *et al.*, 2006).

De acuerdo con las evidencias antes expuestas, el DNACir es considerado como un blanco terapéutico por lo que la administración de la DNasa I es un tratamiento con potencial antitumoral (Patutina *et al.*, 2010).

Uno de los primeros reportes en referencia a la DNasa I como tratamiento se llevó a cabo en el año de 1964, en el que un grupo de investigadores evaluó la toxicidad y la capacidad antigénica de la DNasa I de bovino en humanos; encontrando que la dosis tolerable y no tóxica es de 2,000,000 de unidades (U) por vía intravenosa; adicionalmente, se determinó la eficacia de esta enzima en pacientes con meningitis provocada por neumococos administrándola en distintos períodos y dosis (677691 U de la DNasa I en promedio por día). Los resultados del estudio indicaron que, en la mejoría de los pacientes, disminuyó la presencia de pus en el líquido cefalorraquídeo y fiebre; y no se detectaron anticuerpos contra la DNasa I de bovino (Johnson *et al.*, 1954).

Las investigaciones en el área de la oncología respecto al potencial antitumoral de la DNasa I hasta el momento han sido realizadas en modelos *in vitro* e *in vivo*, siendo la de origen bovino una de las más utilizadas debido a su bajo costo en comparación a la DNasa I recombinante existente en el mercado, y que está aprobada únicamente para tratar fibrosis quística en humanos (Wagener & Kupfer, 2012). La mayoría de los estudios realizados con la DNasa I analizan su acción en líneas tumorales y su efecto en modelos *in vivo* para evaluar su capacidad antitumoral y antimetastásica, como lo reportan los siguientes estudios:

Los ensayos realizados *in vitro* indican una correlación dosis-respuesta de la DNasa I en ensayos de viabilidad, proliferación celular y clonogenicidad en distintas líneas celulares tumorales; por ejemplo, Alcázar-Leyva y colaboradores (2009) evaluaron dosis de 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, y 9.0 µg/mL de la DNasa I en diferentes líneas celulares; y lo que observaron fue que la dosis más alta de 9 µg/mL de la DNasa I disminuyó la viabilidad hasta en un 95% en líneas celulares como HeLa y HEP-2. Mientras que en líneas celulares como CaLu-1, SK-MES-1, y L-929, la viabilidad se disminuyó en un 50%. En la línea celular de melanoma murino B16-F10 se ha reportado también una disminución dosis-respuesta en la viabilidad y en la capacidad de formar colonias tras el tratamiento con la DNasa I (García-Higuera *et al.*, 2001). En los reportes anteriores se observó que el efecto es además línea celular-dependiente.

Otros estudios también han informado efectos citotóxicos y en la actividad migratoria de células con potencial metastásico (B16 altamente invasivo), encontrando en ensayos de viabilidad que la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) fue de 10.1×10^3 U/mL de DNasa I, y en experimentos que evaluaron migración celular, concentraciones de $0.25 - 3 \times 10^3$ U/mL de la DNasa I la disminuyeron de manera dependiente de la dosis hasta en un 70% (Alexeeva *et al.*, 2017). En células de cáncer de colon murino (CT26) también se ha observado que la DNasa I afecta la migración y adhesión celular dependiente de quimiocinas inducidas por NETs (Al-Haidari *et al.*, 2019).

También se ha analizado el efecto *in vitro* de la DNasa I sobre el DNAcir del suero de personas sanas y con cáncer; Trejo-Becerril y colaboradores (2016) demostraron que la DNasa I en combinación con proteasas puede eliminar el DNAcir del suero casi por completo (Trejo-Becerril *et al.*, 2016).

Con respecto a los estudios *in vivo* para evaluar el potencial terapéutico de la DNasa I; en el año de 1993 se reportó que la aplicación intravenosa de la DNasa I en ratones con metástasis hepáticas, prolongó el tiempo de supervivencia; sin embargo, el mejor efecto se observó cuando dicho tratamiento era combinado con la extirpación quirúrgica del tumor primario (Sugihara *et al.*, 1993). Se reportaron resultados similares por Shklyeva y colaboradores en 2007. En este estudio, se demostró que la administración de la DNasa I en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis aumentaron su supervivencia y las áreas de metástasis disminuyeron entre un 35.5% y un 45.3%, con dosis de 0.023 mg/kg y 2.3 mg/kg respectivamente (Shklyeva *et al.*, 2008).

En el 2011, Patutina y colaboradores demostraron que el tratamiento con la DNasa I disminuye los niveles de DNAcir en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis y hepatoma A-1 hasta niveles encontrados en ratones sanos y se asoció a un efecto positivo en la disminución del número de metástasis (Patutina *et al.*, 2011).

Otro aspecto importante que ha sido evaluado por diversos autores es el efecto del tratamiento con la DNasa I sobre el sistema inmune, por ejemplo, Wen y colaboradores en 2013, encontraron en un modelo de ratón con xenoinjerto de células de cáncer de páncreas, la inhibición de las metástasis desde el páncreas hasta el hígado y diafragma al usar dosis desde 1 a 50 U de la DNasa I por ratón. Adicionalmente evaluaron la producción de citocinas, encontrando que únicamente la IL8, una proteína proinflamatoria, se veía afectada con el tratamiento de la DNasa I reduciendo los niveles de RNAm y proteína en líneas celulares de páncreas normales y tumorales (Wen *et al.*, 2013).

Por otro lado, en ratones con melanoma murino se encontró activación inespecífica del sistema inmunológico ya que la administración de la DNasa I ocasionó cambios morfológicos en el timo y el bazo de ratones, aumento en el número de folículos linfoides, aparición de centros germinales y cambios en las capas del timo (Alexeeva *et al.*, 2017).

Otros estudios se han enfocado en explicar la relación del DNAcir y las metástasis; por ejemplo, en ratones con tumores de CaCO se ha comprobado que las trampas de DNA extracelular de neutrófilos (NETs) contribuyen al proceso de diseminación de células tumorales y que al administrar 2.3 mg/kg de la DNasa I disminuyeron las metástasis hasta en un 88% (Al- Haidari *et al.*, 2019). El efecto antes mencionado se debe en gran parte a la ruptura del DNA que forma parte de la estructura de los NETs, sin embargo, la DNasa I no solo altera a la estructura del DNAcir o lo degrada, ya que también se ha reportado que después del tratamiento con esta enzima, hay un aumento de linfocitos T citotóxicos, los cuales pueden detectar y destruir células tumorales a través de moléculas citotóxicas (Xia *et al.*, 2020).

En nuestro equipo de trabajo se han realizado distintos experimentos con la DNasa I, con el objetivo de eliminar al DNAcir y examinar el efecto antitumoral de la enzima. Se encontró que el uso de la DNasa I (2.3 mg/kg) en combinación con proteasas como tripsina (10 mg/kg), papaína (25 mg/kg) y quimotripsina (10 mg/kg) en ratones BALB/c nu/nu inoculados con células de CaCO humano (SW480) tiene un efecto antitumoral después de 21 días tratamiento y en ratas Wistar este mismo tratamiento disminuyó el DNAcir y las proteínas del suero (Trejo-Becerril *et al.*, 2016). Con base en esos resultados, se decidió el uso de un número menor de enzimas, comprobando que la DNasa I sola o en combinación con papaína únicamente, fueron capaces de disminuir el número y tamaño de las metástasis en ratas Wistar y que, la DNasa I sola o en combinación con proteasas (papaína, quimotripsina y tripsina) tiene actividad antitumoral en un modelo de ratones BALB/c inoculados con células CT26 (cáncer de colon murino) (González–Ballesteros, 2016).

Tomando en cuenta que la DNasa I se encuentra de forma endógena en nuestro cuerpo y que la disminución de su concentración y actividad se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer, es razonable pensar que su administración debe ser considerada como un potencial tratamiento. Sin embargo, la mayoría de los reportes hoy en día, se han enfocado en su efecto antimetastásico dejando de lado su acción sobre el tumor primario; adicionalmente, las dosis empleadas en los distintos modelos murinos antes mencionados, son empíricas o bien tomados de otras referencias; por lo tanto, en este proyecto se busca evaluar el efecto de la DNasa I en líneas celulares de cáncer de colon (SW480 y CT26) y posteriormente administrar la dosis de DNasa I equivalente a las utilizadas en humanos para determinar si hay un efecto antitumoral en tumores primarios.

Tabla 2. Resumen de los estudios realizados *in vivo* con la DNasa I.

Modelo	Tratamiento	Resultados	Referencia
Ratón Metástasis hepáticas	Inyección i.v de 0.1 U de DNasa I por 3 días.	Aumento de la supervivencia en ratones con metástasis.	Sugihara <i>et al.</i> , 1993
Ratón Cáncer de pulmón de Lewis.	Inyección i.p de 0.023 mg/kg y 2.3 mg/kg.	Disminución del área de metástasis.	Shklyaeva <i>et al.</i> , 2008
Ratón/ Metástasis pulmonares y hepáticas	RNasa (0.550 µg/kg) DNasa I (0.22- 3 mg/kg) 15 días	Disminución de metástasis y los niveles de DNAcir,	O. Patutina <i>et al.</i> , 2011
Ratón Cáncer de páncreas	Inyección i.p de 1 – 50 U por ratón	Disminución de metástasis desde el páncreas hasta el hígado y diafragma.	Wen <i>et al.</i> , 2013
Ratón CaCO	Inyección i.p de 2 mg/kg	Disminución de las metástasis en un 88%.	Al- Haidari <i>et al.</i> , 2019
Ratón melanoma B16	50 U por ratón 15 días Pulmozyme	Inhibición de metástasis en hígado y pulmón.	Alekseeva <i>et al.</i> , 2021.
Ratón Melanoma B16	0.12, 0.6 y 1.2 mg/kg 15 días	Disminución de metástasis pulmonares. Reducción del potencial invasivo del melanoma murino B16.	Alexeeva <i>et al.</i> , 2017

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado el papel del DNAcir en el desarrollo y progresión del cáncer, lo que ha hecho que se le considere como un blanco terapéutico para ser degradado mediante el uso de DNAsas. Actualmente, el potencial terapéutico de la DNasa I se ha evaluado principalmente en modelos de metástasis, pero se ha estudiado poco el efecto sobre el tumor primario. Por lo anterior, consideramos necesario evaluar el efecto de diferentes dosis de la DNasa I de bovino sobre la viabilidad y clonogenicidad de dos líneas celulares de CaCO y analizar el efecto de la dosis no tóxica y equivalente en humanos sobre un modelo tumoral murino.

4. HIPÓTESIS

La DNasa I disminuirá la viabilidad y la clonogenicidad de las células SW480 y CT26 de cáncer de colon y tendrá un efecto antitumoral en un modelo murino con cáncer de colon.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antitumoral de la DNasa I *in vitro* e *in vivo*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

Modelo *in vitro*

- Evaluar el efecto de la DNasa I en la viabilidad y la clonogenicidad de las líneas celulares SW480 y CT26 de cáncer de colon.
- Cuantificar los niveles de DNAex en el medio condicionado de las líneas celulares SW480 y CT26, con y sin el tratamiento de la DNasa I.
- Evaluar el efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno en las líneas celulares SW480 y CT26.

Modelo *in vivo*

- Evaluar en ratones BALB/c el efecto de la dosis máxima no tóxica de la DNasa I reportada en humanos.
- Cuantificar los niveles de DNAcir en el suero de ratones BALB/c con y sin el tratamiento de la DNasa I.
- Evaluar el efecto antitumoral de la DNasa I con la dosis equivalente de humanos en ratones BALB/c inoculados con las células CT26.

7. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos antes planteados se siguió el esquema metodológico representado en la Figura 4.

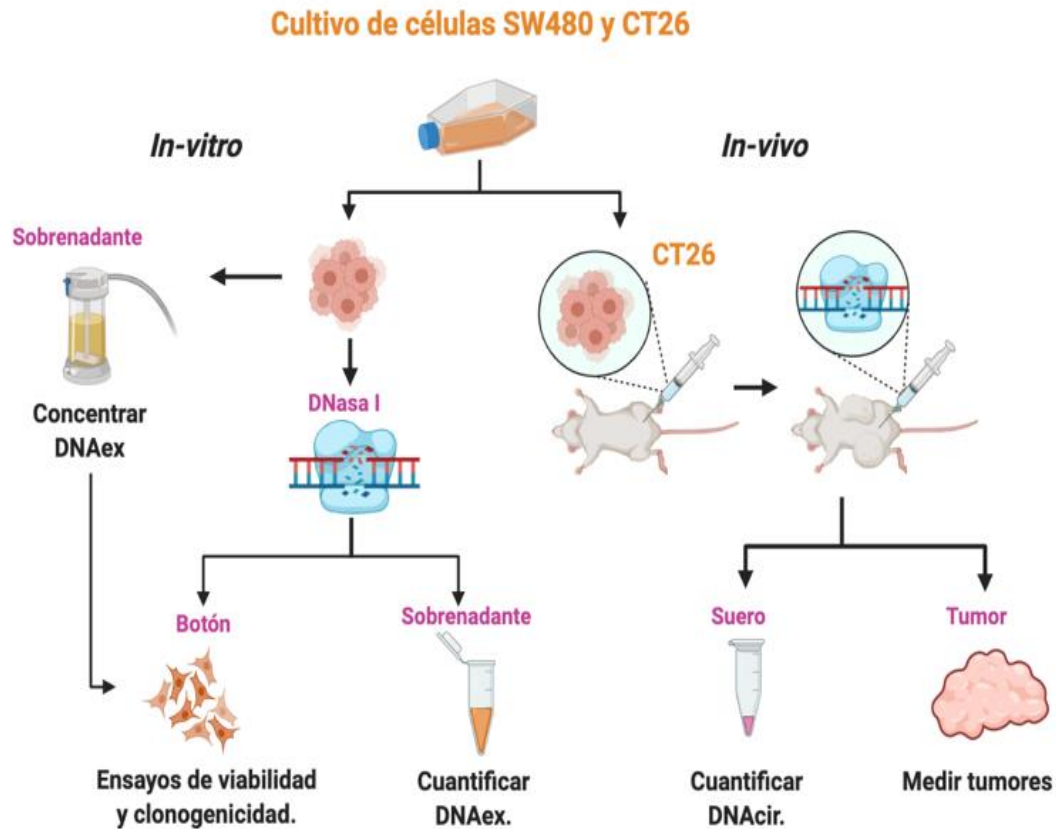


Figura 4. Esquema metodológico del desarrollo experimental. Se cultivaron las líneas celulares de CaCO murino (CT26) y humano (SW480) y fueron expuestas a diferentes concentraciones de la DNasa I durante 72 h, se recuperó tanto el botón celular como el sobrenadante y se realizaron los ensayos de viabilidad, clonogenicidad y cuantificación del DNAex. Por otra parte, para los estudios *in vivo* se inocularon alrededor de 500,000 células CT26 en la zona dorso-caudal en ratones BALB/c, posteriormente se administraron 20 inyecciones intraperitoneales de la dosis equivalente de DNasa I. Se realizaron ensayos tanto en el suero como en los tumores *ex vivo* para determinar el efecto de la DNasa I como tratamiento.

7.1 Cultivo de las líneas celulares SW480 y CT26.

Las líneas celulares SW480 y CT26 fueron cultivadas en cajas de 75 cm² con 15 mL de medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, E.U.A.) y RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; Gibco, E.U.A.) respectivamente, y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF, Gibco, E.U.A.) y 1X de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Thermo Forma Series II) a 37°C, humedad del 98% y una atmósfera con 5% CO₂ cambiando el medio de cultivo cada 48 horas.

7.2 Preparación de la DNasa I.

Para los ensayos *in vitro* se utilizó la DNasa I de bovino (Sigma-Aldrich, # de cat. DN25) con una concentración de 400 U/mg y se diluyó en medio de cultivo según la línea celular para la cual se utilizó (Anexo 1).

Para los ensayos *in vivo* se utilizó la DNasa I de bovino (Sigma-Aldrich, # de cat. D5025) con una concentración de 2,000 U/mg disuelto en solución salina al 0.15 M como lo indica el proveedor.

Ensayos *in vitro*

7.3 Ensayo de viabilidad celular.

Se cultivaron las líneas celulares SW480 y CT26 en placas de 6 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) con 2 mL de su respectivo medio de cultivo. Para la línea celular SW480 se sembraron 30,000 células por pozo, mientras que para CT26 se sembraron 7,000 células por pozo, el período de incubación fue de 24 h, posteriormente ambas líneas celulares se trataron durante 72 h con la DNasa I (Sigma-Aldrich, # de cat. DN25) la cual se resuspendió en medio de cultivo, las dosis administradas fueron 120, 240, 360, 480 y 600 U/mL. El medio con el tratamiento se cambió cada 24 h.

Al concluir el tratamiento, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron y tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.75% (Sigma-Aldrich, Merck KgaA), después de 30 min el colorante se eliminó y las placas se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de colorante. A cada pozo se le adicionó 1 mL de PBS con 1% de SDS para determinar su absorbancia a 570 nm en un lector de placas (The Accuris SmartReader 96, model MR9600-T).

7.4 Ensayo de clonogenicidad.

Ambas líneas celulares fueron tratadas con las diferentes dosis antes mencionadas de la DNasa I durante 72 h, cambiando el medio y el tratamiento cada 24 h, al finalizar las células se despegaron con 1 mL de PBS 1X, 20 μ L tripsina (2.5%) y EDTA (1%), se incubaron durante 5 min a 37 °C, se centrifugaron y el botón celular se lavó con PBS 1X. Finalmente se contó el número de células y se evaluó la viabilidad en un hemocitómetro. Se cultivaron 1,000 células en 2 mL de medio completo sin la DNasa I durante 7 días en placas de 6 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Posteriormente, las colonias que se formaron se fijaron y tiñeron con una solución al 0.75% de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Merck KgaA) y se contaron con el software ImageJ (National Institute of Health, versión 2.0).

7.5 Citometría de flujo para evaluar apoptosis y necrosis.

Ambas líneas celulares fueron tratadas con las dosis más altas de la DNasa I (360, 480 y 600 U/mL) durante 72 h cambiando el medio y el tratamiento cada 24 h. Posteriormente las células se despegaron incubándolas 5 min a 37 °C con 1 mL de PBS, 20 μ L tripsina (2.5%) EDTA (1%). Se lavó el botón celular en dos ocasiones con PBS 1X. Para evaluar muerte celular se utilizó el Kit Annexin-V-FLUOS Staining (Roche, # de catalogo 11858777001). Para ello, el botón celular de cada línea se resuspendió en 100 μ L de Buffer y las células fueron marcadas con 2 μ L de anexina-V-FLUOS y 2 μ L de yoduro de propidio y se incubaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 15 min. Cada una de las muestras se leyó en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II mediante el software BC FACSDiva™ V6.1.3 (Becton Dickinson, USA). Las condiciones de

lectura fueron: 10,000 eventos por muestra, la señal positiva del marcador de anexina-V-FIUOS se usó para determinar apoptosis temprana, el marcador de yoduro de propidio para necrosis y para apoptosis tardía ambos marcadores positivos.

7.6 Purificación y cuantificación de DNAex en el medio condicionado.

A partir de los ensayos de viabilidad celular (sección 7.3) se recolectó el medio condicionado de ambas líneas celulares cada 24 h durante las 72 h de tratamiento.

Para eliminar los restos celulares cada una de las muestras fue centrifugada a 400 g por 20 min y se filtraron utilizando un filtro de 0.45 μm (Sartorius, 16555). Para realizar la extracción se utilizó una alícuota de 500 μL de sobrenadante de cada muestra a la que se añadió 500 μL de Buffer de extracción (Tris-base 10 mM, EDTA 0.02 M, SDS 0.5% pH 7.8) y se incubaron durante toda la noche a 55°C con 3 μL de proteinasa K. Posteriormente se mezcló por agitación con 1 mL de fenol: cloroformo (1:1 v/v) y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min, se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 1 mL de cloroformo, nuevamente se agitaron y centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se dejó precipitar durante toda la noche a - 20°C con 1 μL de glucógeno, 50 μL de acetato de amonio 7.5 M y 500 μL de isopropanol, posteriormente se centrifugaron a 11,000 rpm por 90 min. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire hasta que se evaporó todo el alcohol. Finalmente, la muestra se resuspendió en 50 μL de H₂O.

La cuantificación de DNAex se realizó con el kit DNAds Quant-iT™ (Invitrogen™, # de catalogo Q33120) diluyendo 1:200 el reactivo Quant-iT™ en el buffer de dilución, posteriormente 5 μL de cada muestra se depositaron en placas de 96 pozos y se les añadió 200 μL de la solución de trabajo. Las muestras se leyeron en un fluorímetro (Tecan Infinite® 200 PRO-SERIES) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y emisión de 535 nm.

7.7 Recolección y concentración de DNAex en medios condicionados.

Se cultivaron de forma independiente 200,000 células SW480 y CT26 en cajas de cultivo de 175 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) con su respectivo medio de cultivo, suplementado con 2% de suero fetal bovino (SBF, Gibco, E.U.A.) y 1x de penicilina y estreptomycin. El sobrenadante de las células se recolectó cada 24 h durante 5 días y se sustituyó por medio de cultivo fresco. Para eliminar restos celulares, el sobrenadante recolectado fue centrifugado a 400 g por 20 min y se pasó por un filtro de 0.45 µm.

El volumen de sobrenadante recolectado (250 mL) se concentró a 40 mL en un sistema de ultrafiltración con una membrana de 40 kDa y se conservó a -80°C hasta su uso posterior. De este sobrenadante concentrado, se tomó una alícuota de 500 µL de cada línea celular para realizar la extracción y posterior cuantificación de DNAex como se describió en el apartado 7.6 de esta sección.

7.8 Evaluación del efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno.

Una vez que se obtuvo la concentración de DNAex de los sobrenadantes concentrados, se realizaron los cálculos correspondientes para exponer a ambas líneas celulares a medios de cultivo con una determinada concentración de DNAex de su propia línea celular.

Para este ensayo se cultivaron 5,000 células SW480 y 500 células CT26 en placas de 24 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY, USA); las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de DNAex de su misma línea celular (0, 50, 100, 150 y 200 ng/mL) con cambio de medio cada 24 h durante 120 h. Al finalizar el tratamiento se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron y tiñeron con una solución al 0.75% de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Merck KgaA). Después de 30 min el colorante se eliminó y las placas se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de colorante. A cada pozo se le adicionó 1 mL de PBS con 1% de SDS para determinar su absorbancia a 570 nm en un lector de absorbancia de placas (The Accuris SmartReader 96, model MR9600-T).

7.9 Efecto de la DNasa I en la viabilidad de células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno.

Una vez analizado el efecto del DNAex concentrado en la viabilidad de cada línea celular (sección 7.8) se determinó que las células CT26 y SW480 serían expuestas a 100 y 200 ng de DNAex respectivamente. Posteriormente estas células se trataron con 360, 480, y 600 U/mL de la DNasa I durante 120 horas, y el cambio de medio y tratamiento se realizó cada 24 horas. Al concluir el experimento las placas se analizaron con la técnica de cristal violeta.

Ensayos *in vivo*

Los experimentos realizados en animales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología, así como por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales y se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Los ratones BALB/c se mantuvieron a una temperatura de 25°C con alimento para ratones y agua *ad libitum*, los ciclos de luz y oscuridad fueron de 12 h y humedad relativa del 50%, todos los animales eran hembras de entre 20 a 23 g al inicio de los experimentos.

7.10 Administración de dosis no tóxicas reportadas en humanos a ratones BALB/c.

Para evaluar la seguridad de la DNasa I en ratones se eligieron 6 dosis dentro del intervalo reportado para humanos (dosis no tóxicas) en el artículo de Johnson y colaboradores (1954) y se calcularon las dosis equivalentes en ratones utilizando la fórmula reportada por Reagan-Shaw en el 2008, la cual utiliza el factor K_m que se obtiene de la división del peso promedio (kg), entre la superficie corporal ($BSA\ m^2$) de la especie (Tabla 3; Johnson *et al.*, 1954; Reagan-Shaw *et al.*, 2008).

Dosis equivalente humana (HED mg/kg) = dosis animal (mg/kg) multiplicado por $\frac{\text{Animal } K_m}{\text{Humano } K_m}$

Tabla 3. Conversión de dosis animal a dosis equivalente humana.

Especie		Peso (kg)	BSA (m ²)	Factor K _m
Humano	Adulto	60	1.6	37
	Niño	20	0.8	25
Perro		10	0.5	20
Mono		3	0.24	12
Conejo		1.8	0.15	12
Rata		0.15	0.025	6
Ratón		0.02	0.007	3

Valores basados en los datos de FDA Draft Guidelines. Para convertir la dosis en mg/kg a la dosis en mg/m², multiplica por el valor de K_m (Reagan-Shaw *et al.*, 2008).

Tabla 4. Dosis equivalentes no tóxicas en ratones.

Dosis en humano (promedio 60 kg)	Dosis equivalente en ratón (promedio 20 g)
62,500 U	256 U
125,000 U	513 U
250,000 U	1,027 U
500,000 U	2,055 U
1,000,000 U	4,111 U
2,000,000 U	8,222 U

Se diluyó la DNasa I en solución salina al 0.15 M y se disolvió por completo con agitación suave. La enzima fue administrada por vía intraperitoneal de forma diaria por 5 días a ratones BALB/c. Se formaron 7 grupos de 4 animales cada uno. Al grupo control se administró únicamente vehículo, y las 6 dosis de la DNasa I a los otros grupos. El tratamiento fue por 5 días durante el cual se evaluó

el aspecto físico de los animales (peso y conducta) y el porcentaje de supervivencia.

7.11 Obtención de la dosis equivalente en ratones.

Una vez que se determinó que la DNasa I es segura en dosis altas de hasta 8,222 U, se calculó la dosis equivalente de la DNasa I en ratones BALB/c como tratamiento antitumoral. Para calcular dicha dosis, se obtuvo un promedio de las unidades administradas por Johnson y colaboradores (1954) a pacientes con meningitis, ya que el tratamiento en dichos pacientes fue en diferentes dosis y tiempos de tratamiento dependiendo la gravedad de la enfermedad.

Tabla 5. Esquema de tratamiento (Johnson *et al.*, 1954).

Unidades totales administradas	Número de inyecciones	Unidades administradas por día a personas con meningitis.
60,000,000	83	722,891
23,000,000	27	851,851
Promedio de unidades por día		787,371 U.

La dosis de 787,371 U administrada diariamente a pacientes con meningitis se trasladó a la dosis equivalente en ratones con la fórmula de Reagan-Shaw y colaboradores (2008), obteniendo una dosis equivalente de 161,838 U/kg (3,236 U en ratones con peso promedio de 20 g) que fue administrada a ratones BALB/c como tratamiento antitumoral en los siguientes experimentos.

7.12 Inoculación de células CT26 en ratones BALB/c.

Se cultivaron células CT26 al 80% de confluencia y se despegaron con 1 mL de PBS, 20 µL de tripsina al 2.5% y EDTA al 1%. Para inactivar la tripsina se añadió medio de cultivo con suero al 5%. Las células se centrifugaron y lavaron con medio RPMI-1640 en tres ocasiones, se contaron en un hemocitómetro y se verificó que tuvieran una viabilidad mayor al 95%. A cada ratón se inoculó vía

subdérmica en la región dorso-caudal 500,000 células suspendidas en 100 µL de medio RPMI-1640 libre de suero fetal bovino.

7.13 Efecto antitumoral del tratamiento con la DNasa I.

Para evaluar el efecto antitumoral de la dosis seleccionada de la DNasa I (Sección 7.10; 161,838 U/kg), se formaron 5 grupos con 7 ratones cada uno:

Dos grupos sin tumor:

- Grupo control inyectado únicamente con vehículo.
- Grupo control de tratamiento con dosis equivalente de la DNasa I. (161,838 U/kg igual a 3,236 U por ratón, los cuales pesaban en promedio 20 g).

Tres grupos con tumor:

- Grupo inyectado únicamente con vehículo.
- Grupo con tratamiento, dosis equivalente de la DNasa I (3,236 U)
- Grupo con tratamiento, promedio de dosis reportadas de la DNasa I (80 U).
(Park *et al.*, 2016, Alekseeva *et al.*, 2021; Patutina *et al.*, 2011, Alexeeva *et al.*, 2017, Al- Haidari *et al.*, 2019).

7 días después de la inoculación de las células CT26 se inició el tratamiento, el cual se administró en un esquema conocido como 5 x 2, en el cual los animales recibieron 5 días continuos de una inyección intraperitoneal con la enzima o el vehículo y 2 días de descanso. En total los ratones recibieron 20 inyecciones. Se registró el volumen del tumor y el peso del ratón cada 7 días y fueron sacrificados el día de la última inyección de la DNasa I. Para obtener el volumen tumoral se utilizó la fórmula:

$$VT = [Diametro Mayor] * [diametro menor]^2 * \left[\frac{\pi}{6}\right]$$

(Myklebust *et al.*, 1994).

7.14 Cuantificación de los niveles de DNACir en el suero de ratones BALB/c.

Al concluir los 20 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados; para ello, se anestesiaron con isoflurano/oxígeno en una cámara especial para ratones. La obtención de sangre se realizó mediante desorbitación ocular y se colectó en tubos Microvette® (Sarstedt, Alemania). Las muestras de sangre se mantuvieron a 4°C durante 24 h y posteriormente se centrifugaron a 1000 g por 20 min; el suero se recuperó en tubos eppendorf eliminando la fracción celular.

Para la extracción del DNACir, se añadieron 3 µL de proteinasa K y 500 µL de buffer de extracción a 200 µL de cada muestra de suero y se incubaron durante toda la noche a 55°C. Posteriormente se añadió 1 mL de fenol cloroformo (1:1 v/v) y se agitaron por 10 min, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min, se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 1 mL de cloroformo, y se repitió el ciclo de agitación y centrifugación. Se recuperó la fase acuosa y se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C con: 1 µL de glucógeno, 50 µL de acetato de amonio 7.5 M y 500 µL de isopropanol, posteriormente se centrifugaron a 11,000 rpm por 90 min. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire hasta que se evaporó todo el alcohol, finalmente la muestra fue resuspendida en 50 µL de H₂O. La cuantificación se realizó como se describe en la sección 7.6.

7.15 Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado con 3 réplicas técnicas cada uno, los datos obtenidos fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 16.62 y analizados en el software GraphPad Prism (versión 8.0; GraphPad Software, CA, USA) utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Para evaluar viabilidad y clonogenicidad se utilizó ANOVA de una vía con la prueba de Tukey, y para los niveles de DNAex, DNACir y volumen tumoral se utilizó ANOVA de dos vías con la prueba de post-hoc.

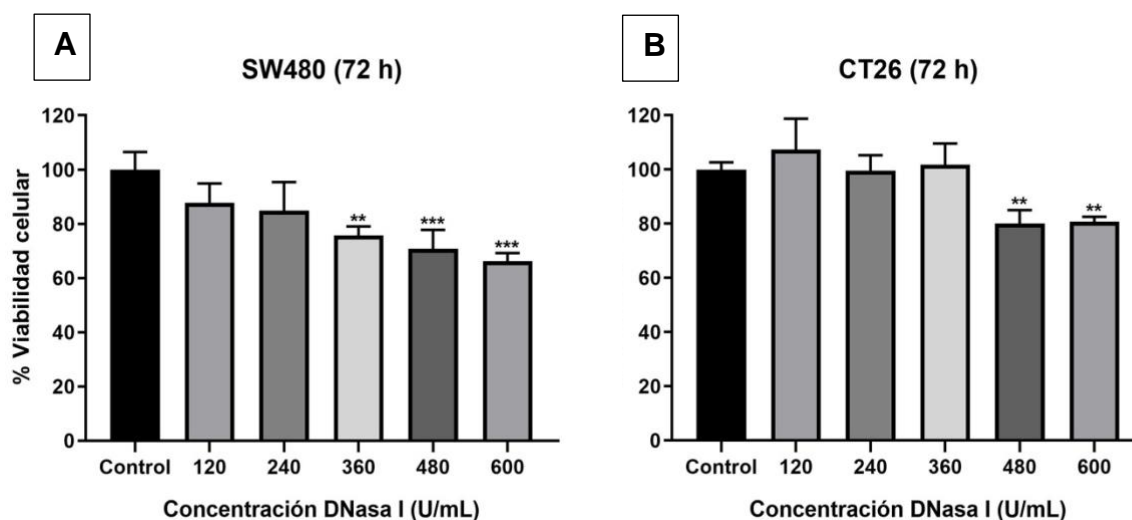
8. RESULTADOS

Modelo *in vitro*

8.1 Efecto de la DNasa I en la viabilidad de las líneas celulares CT26 y SW480.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la DNasa I sobre la viabilidad, las líneas celulares de cáncer de colon SW480 y CT26, de origen humano y murino respectivamente, fueron expuestas durante 72 h a diferentes concentraciones de la DNasa I (120, 240, 360, 480 y 600 U/mL), cambiando el medio y el tratamiento cada 24 h. Al finalizar el tiempo de tratamiento, se retiró el medio y las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Se observó que la viabilidad en ambas líneas celulares disminuye con las concentraciones más altas de la DNasa I, en las células SW480, las dosis de 360, 480 y 600 U/mL disminuyeron la viabilidad celular entre un 25 y 35% de forma significativa ($p < 0.001$) respecto al control (Figura 5-A). Un efecto similar se detectó en las células CT26, ya que la viabilidad de esta línea celular disminuyó 20 y 25% con las dosis de 480 y 600 U/mL respectivamente ($p < 0.01$; Figura 5-B).

Las gráficas e imágenes de viabilidad en ambas líneas celulares se muestran en la Figura 5.



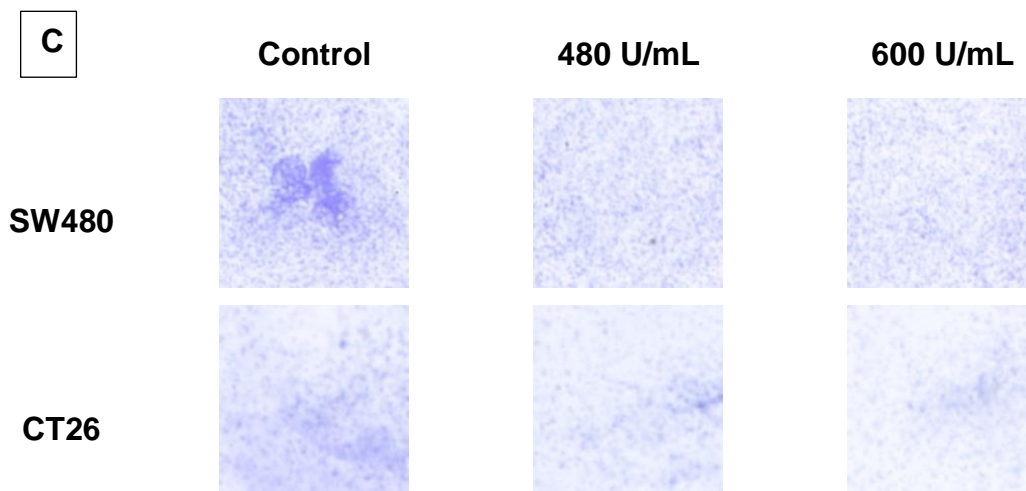


Figura 5. Ensayo con Cristal Violeta para evaluar el efecto de la DNasa I en la viabilidad de SW480 y CT26. (A) Ensayo de viabilidad celular en células de cáncer de colon humano (SW480) y (B) en células de colon murino (CT26) después de 72 h de tratamiento. (C) Imágenes representativas de los ensayos de viabilidad realizados con la técnica de cristal violeta que fija y tiñe células vivas que se quedaron adheridas a la superficie de la placa. Ya que la DNasa I fue disuelta en medio de cultivo, en todos los casos el control se incubó solo con medio (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

8.2 Evaluación de muerte celular en las líneas celulares SW480 y CT26.

En el ensayo anterior, se observó que se redujo la viabilidad de ambas líneas celulares utilizando las concentraciones más altas de la DNasa I; sin embargo, la técnica de cristal violeta no evalúa el mecanismo por el cual la enzima induce a muerte celular, por lo tanto, para determinar si este efecto se debe a muerte por apoptosis o necrosis, las líneas celulares SW480 y CT26 fueron tratadas con las dosis de 360, 480 y 600 U/mL cada 24 h por 72 h y analizadas mediante citometría de flujo.

En la línea celular SW480, se observó que el 13% de las células muertas fueron por apoptosis y el 2% por necrosis con la dosis de 600 U/mL de la DNasa I, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.001$); mientras que las concentraciones más bajas no tuvieron un efecto significativo respecto al control (Figura 6). Sin embargo, el 15% de la muerte celular demostrado en este ensayo ya sea por apoptosis o necrosis no corresponde al 35% de inhibición observado en los ensayos de viabilidad con cristal violeta de la figura 5-A (técnica no específica para evaluar mecanismo de muerte celular).

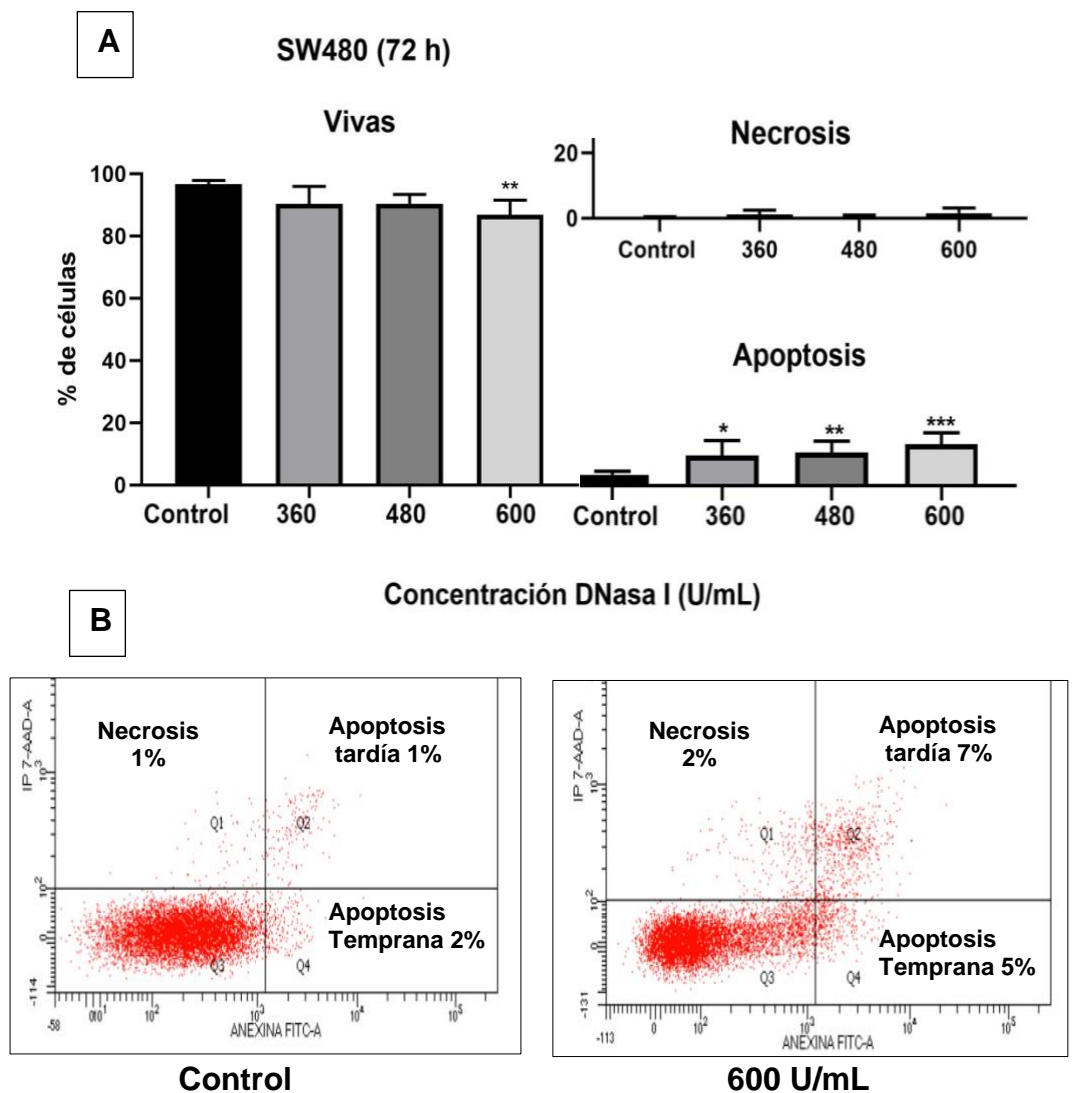


Figura 6. Análisis por citometría de flujo de muerte celular en la línea SW480. (A) Efecto de la DNasa I en la muerte celular por apoptosis y necrosis después de 72 h de tratamiento. (B) Distribución de las células SW480 (10,000 eventos por muestra) en los cuatro cuadrantes para evaluar apoptosis tardía, temprana (anexina V-FITC positivo, ioduro de propidio negativo o positivo) y muerte celular por necrosis (anexina V-FITC negativo, ioduro de propidio positivo) (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

En la línea celular CT26, las concentraciones de 480 y 600 U/mL de la DNasa I disminuyeron de forma significativa ($p < 0.001$) el porcentaje de células vivas con respecto al control (17 y 27% respectivamente). A su vez, del 27% de disminución de la viabilidad, el 19% corresponde a muerte celular por apoptosis y el 8% a muerte por necrosis (Figura 7). Estos datos coinciden con el porcentaje de inhibición de la viabilidad reportado en la figura 5-B.

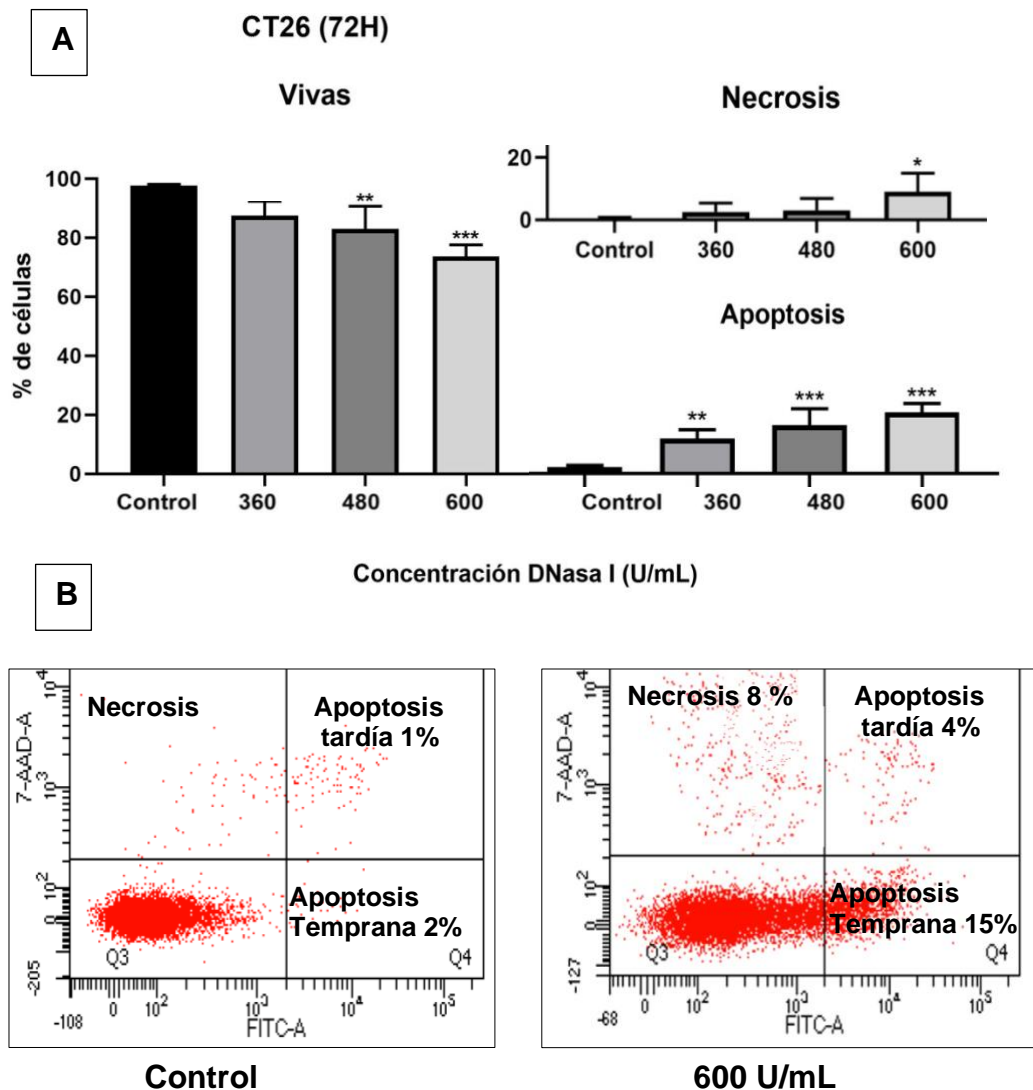


Figura 7. Análisis por citometría de flujo de muerte celular en la línea CT26. (A) Efecto de la DNasa I en la muerte celular por apoptosis y necrosis después de 72 h de tratamiento. (B) Distribución de las células CT26 (10,000 eventos por muestra) en los cuatro cuadrantes para evaluar apoptosis tardía, temprana (anexina V-FITC positivo, ioduro de propidio negativo o positivo) y muerte celular por necrosis (anexina V-FITC negativo, ioduro de propidio positivo) (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

8.3 Efecto de la DNasa I en la clonogenicidad de las líneas celulares CT26 y SW480.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la DNasa I sobre la capacidad para proliferar de las células SW480 y CT26, se realizaron ensayos de clonogenicidad en ambas líneas celulares previamente expuestas durante 72 h a las concentraciones de la DNasa I antes mencionadas. Se contabilizó el número de

colonias fijadas y teñidas con cristal violeta que se formaron en 7 días y se observó que las dosis de 360, 480 y 600 U/mL, disminuyeron la capacidad clonogénica de manera significativa respecto al control ($p < 0.001$). En la línea celular SW480 esta disminución fue entre el 37 y el 42% (Figura 8-A), mientras que para CT26 fue entre el 24 y 29% en las tres dosis más altas para ambas líneas celulares (Figura 8-B).

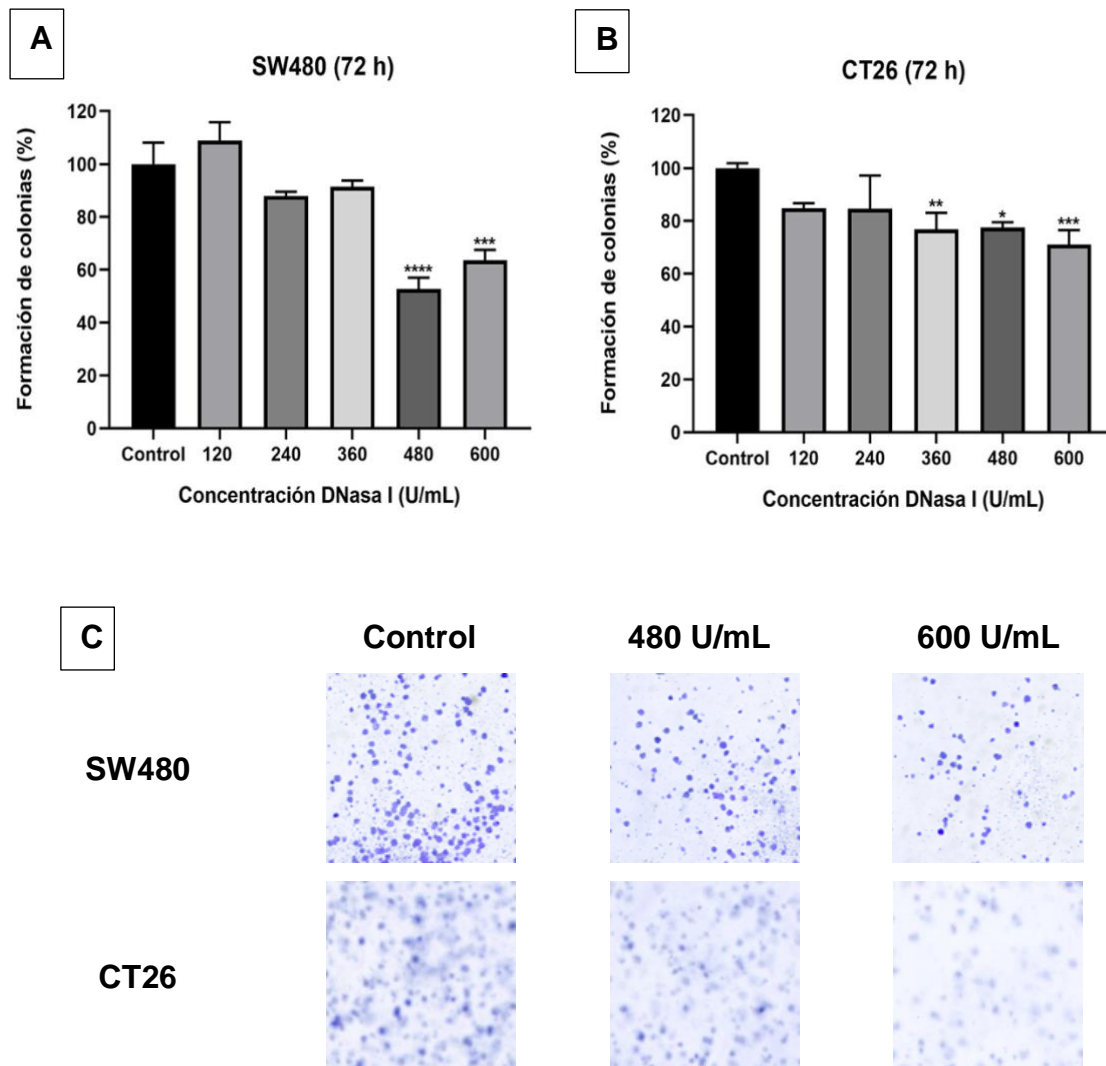


Figura 8. Ensayos clonogénicos en las líneas SW480 y CT26. (A-B) Efecto de la DNasa I en la capacidad de formar colonias de las líneas de cáncer de colon humano (SW480) y murino (CT26). (C) Colonias formadas durante 7 días con células previamente tratadas con diferentes concentraciones de la DNasa I durante 72 h, fueron fijadas y teñidas con cristal violeta, el conteo se realizó con el programa ImageJ (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

8.4 Cuantificación de los niveles de DNAex en el medio condicionado de las líneas celulares CT26 y SW480 con y sin tratamiento de la DNasa I.

Para evaluar si existe una diferencia en la cantidad de DNA que es liberado al medio extracelular posterior al tratamiento con la DNasa I, se recolectó el medio condicionado de ambas líneas celulares (tratadas y no tratadas) cada 24 h durante 72 h. Para evitar cualquier contaminación por células, los medios fueron centrifugados y filtrados, posteriormente la cuantificación de DNAex se realizó en un fluorímetro.

En la línea celular SW480, la concentración de DNAex disminuyó de forma significativa respecto al control a las 24, 48 y 72 h de tratamiento con todas las dosis utilizadas ($p < 0.0001$); sin embargo, el efecto de la DNasa I sobre los niveles de DNAex no fueron dependientes del tiempo y de la dosis empleada, ya que no se observaron diferencias significativas entre ellas. Por ejemplo, a las 72 h de tratamiento hay un pequeño incremento en la concentración de DNAex con algunas dosis, pero no fue directamente proporcional a la dosis (Figura 9).

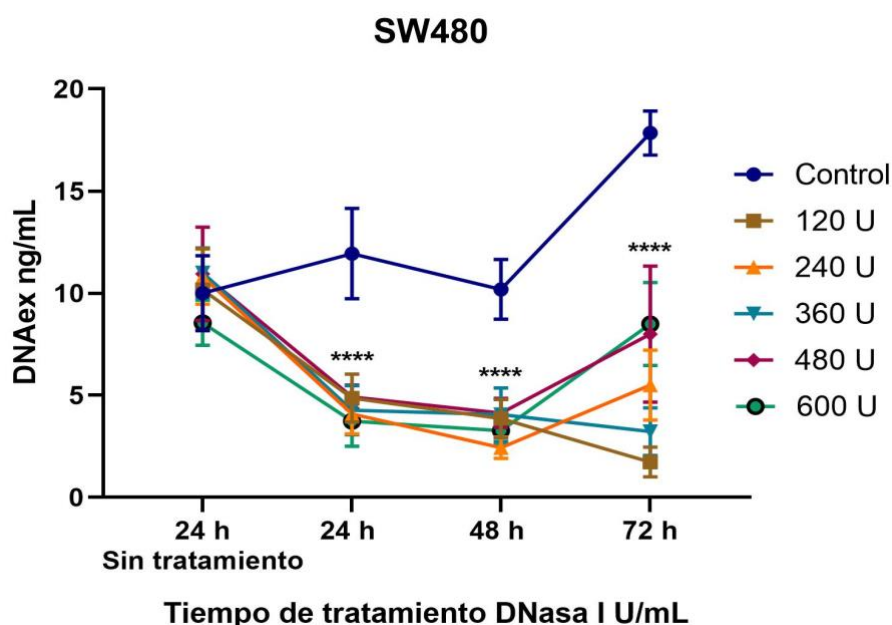


Figura 9. Cuantificación por fluorimetría de la concentración del DNAex en el medio condicionado de SW480. El tratamiento con la DNasa I disminuye significativamente la concentración de DNAex que liberan al medio las células SW480, a las 72 h hay un aumento del DNAex excepto con las dosis de 120 y 360 U/mL. Entre dosis y tiempos de tratamiento no se observaron cambios significativos (**** $p < 0.0001$).

Por otro lado, en la línea celular CT26, el tratamiento con la DNasa I no disminuyó la concentración de DNAex en ninguno de los tiempos y dosis evaluadas; por el contrario, se observó un aumento en los niveles de DNAex en función de las dosis de la DNasa I empleadas (Figura 10). Este incremento en el DNAex fue estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) en todas las dosis empleadas con respecto al control. El mayor incremento se observó de las 48 a las 72 h; este comportamiento también se encontró solamente a las 72 h en la línea celular SW480, pero en dicha línea celular no rebaso los niveles del control (Figura 9).

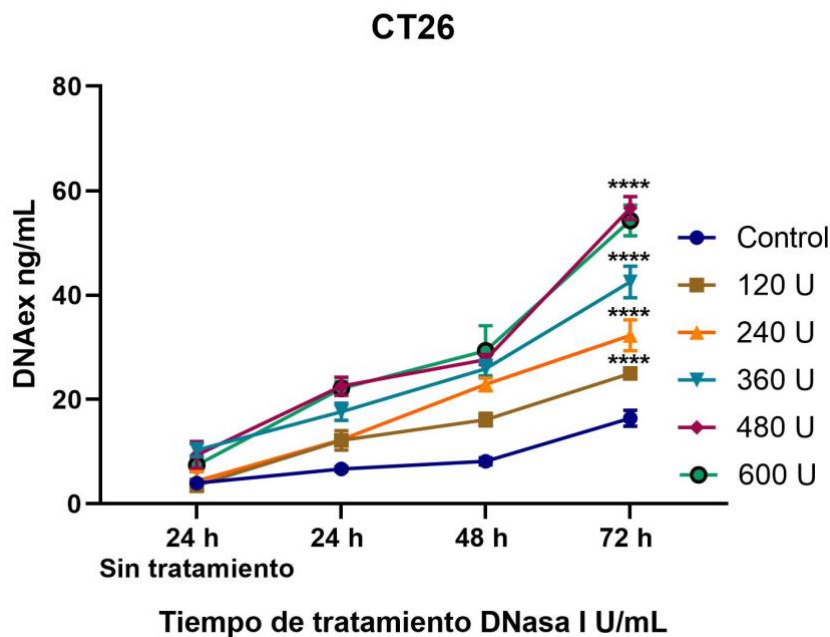


Figura 10. Cuantificación por fluorimetría de la concentración de DNAex en el medio condicionado de CT26. El tratamiento con la DNasa I durante 72 h no disminuye significativamente la concentración de DNAex que liberan al medio las células CT26, por el contrario, se observa un aumento dosis-respuesta (**** $p < 0.0001$).

8.5 Efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno en las líneas celulares SW480 y CT26.

Hasta el momento hemos observado que la DNasa I inhibe tanto la viabilidad como la clonogenicidad de ambas líneas celulares. Se esperaba que el efecto antes mencionado estuviera correlacionado con la disminución del DNAex; sin embargo, no se observó un efecto dosis-respuesta. Como el mecanismo de acción de la DNasa I sobre el DNAex consiste en la degradación del material nucleico de forma azarosa y la técnica de cuantificación no distingue entre los distintos tamaños de los fragmentos, es posible encontrar una alta concentración del DNAex aún cuando este último esté degradado y pierda su efecto farmacológico. En consecuencia, consideramos necesario continuar estudiando el efecto del DNAex, ya que además de lo antes descrito, se ha reportado que tiene participación en la progresión tumoral y que su concentración en personas con cáncer es mayor que en personas sanas (Kustanovich *et al.*, 2019), por lo cual, se decidió evaluar el efecto de una alta concentración de DNAex exógeno adicionado al medio condicionado sobre la viabilidad de ambas líneas celulares.

Para cumplir con este objetivo, decidimos purificar y concentrar el DNAex de cada línea celular y exponer las líneas celulares a una determinada concentración exógena de su correspondiente DNAex concentrado (100 y 200 ng/mL, concentraciones más altas a las observadas de forma basal). Esta exposición se realizó durante 120 h con cambios de medio con DNAex fresco cada 24 h. Al finalizar el experimento las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta. En la línea celular SW480 con la concentración de 200 ng/mL de DNAex, se observó un aumento en la viabilidad celular del 34% en comparación al control, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.0001$); dosis menores no tuvieron un efecto significativo (Figura 11-A). En la línea celular CT26 se determinó un aumento del 57% en la viabilidad celular con las concentraciones de 100 y 200 ng/mL sin diferencias significativas entre ambas concentraciones (Figura 11-B), pero sí con respecto al control ($p < 0.0001$). Es decir, en ambas líneas celulares, una alta concentración de DNAex exógeno aumenta la viabilidad celular.

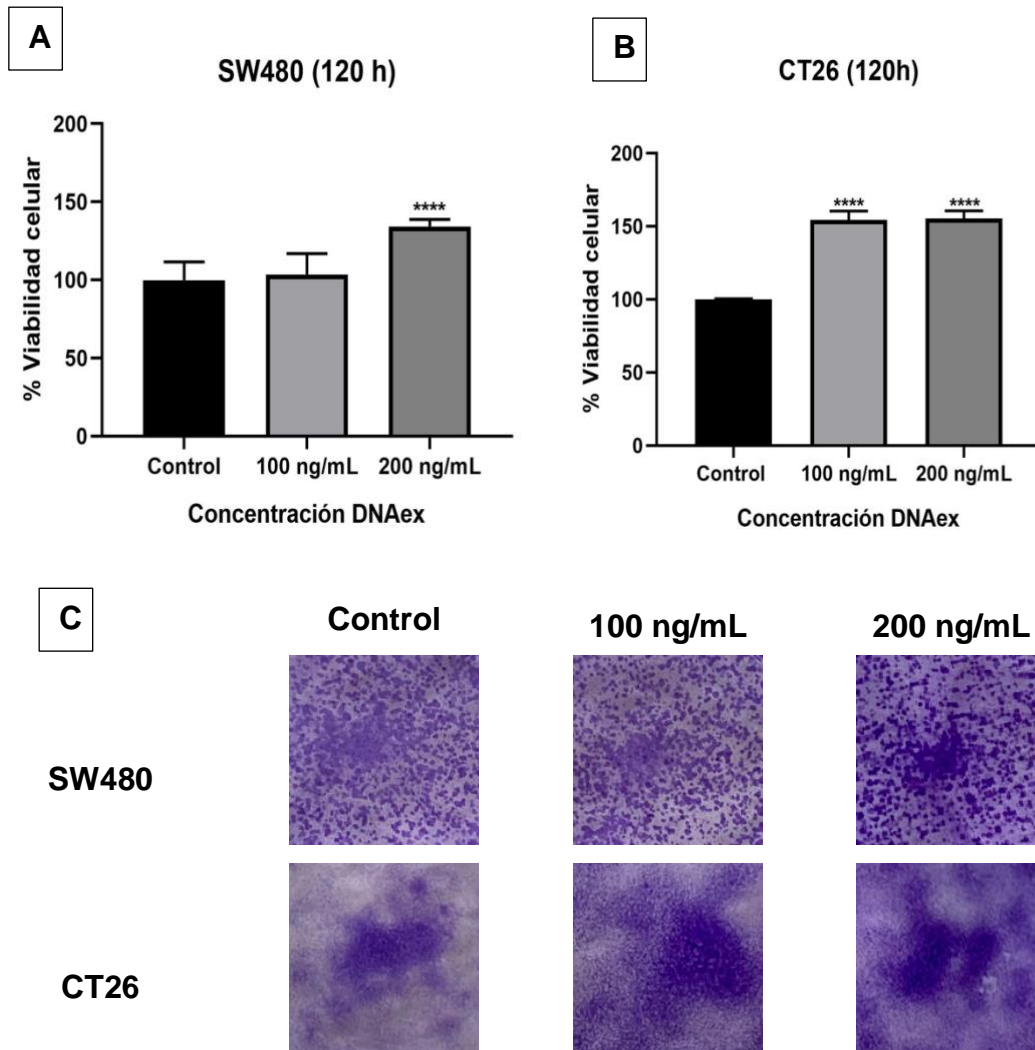


Figura 11. Efecto farmacológico de una alta concentración de DNAex exógeno sobre la viabilidad celular de las líneas SW480 y CT26. (A-B) Aumento en la viabilidad de las líneas celulares SW480 y CT26, después de 120 h de exposición a 100 y 200 ng/mL de DNAex de su misma línea celular. Al concluir el ensayo, las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta para evaluar viabilidad celular (**** $p < 0.0001$). (C) Imágenes representativas de células expuestas a diferentes cantidades de DNAex concentrado, fijadas y teñidas con cristal violeta.

8.6 Efecto de la DNasa I en la viabilidad de células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno.

Una vez que se determinó que la viabilidad en las líneas celulares CT26 y SW480 aumentaba con 100 y 200 ng/mL de DNAex respectivamente, se evaluó nuevamente el efecto del tratamiento con la DNasa I bajo estas condiciones experimentales. Las dos líneas celulares de cáncer de colon se expusieron a las

concentraciones de la DNasa I que mostraron resultados estadísticamente significativos en los ensayos de viabilidad (360, 480 y 600 U/mL).

Se observó que la línea celular SW480 expuesta a 200 ng/mL de DNAex fue más resistente al tratamiento con la DNasa I ya que no se observó diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 12-A). Por otro lado, la línea celular CT26 expuesta a 100 ng/mL de DNAex fue la más sensible al tratamiento con las distintas dosis probadas de la DNasa I, ya que su viabilidad celular disminuyó de forma significativa ($p < 0.0001$) con respecto a las células solo expuestas a 100 ng/mL de DNAex. La dosis más alta de la DNasa I disminuyó la viabilidad en un 47%, prácticamente a valores observados en el control (células sin ningún tratamiento ni exposición a DNAex concentrado; Figura 12-B). Lo que nos lleva a suponer, que cada línea celular tiene diferente sensibilidad a la DNasa I, y/o los mecanismos de acción de la DNasa I varía en cada tipo celular.

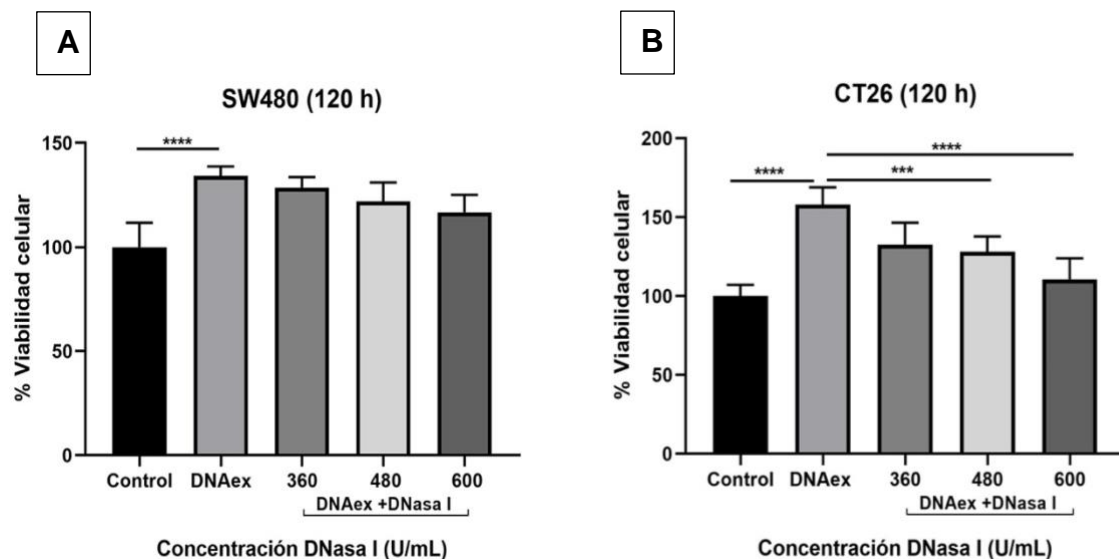


Figura 12. Efecto de la DNasa I en células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno. Ambas líneas celulares fueron expuestas a una alta concentración de DNAex. Para este ensayo se usaron dos controles, uno sin ningún tipo de tratamiento (control) y las células expuestas a DNAex sin tratamiento con la DNasa I (DNAex). (A) La DNasa I no tuvo efecto en la viabilidad de la línea celular SW480 expuesta a 200 ng/mL de DNAex concentrado. (B) Las células CT26 expuestas a 100 ng/mL de DNAex son susceptibles a las dosis de 480 y 600 U/mL (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$).

Modelo *in-vivo*

8.7 Administración de dosis no tóxicas reportadas en humanos a ratones BALB/c.

Estudios previos reportaron la administración intravenosa de la DNasa I en adultos y niños, en dosis crecientes que fueron desde las 10 U hasta 2,000,000 U sin encontrar evidencia de toxicidad (Johnson *et al.*, 1954). Con el objetivo de evaluar la seguridad de la administración de la DNasa I en el modelo murino, en el presente estudio se seleccionaron 6 dosis equivalentes en ratones (256, 513, 1,027, 2,055, 4,111 y 8,222 U) las cuales se encuentran dentro del rango de unidades antes mencionadas y se administraron durante 5 días a ratones BALB/c por vía intraperitoneal (7 grupos con 4 ratones cada uno). Durante el período de tratamiento los animales ingirieron alimento adecuadamente, se mostraron activos y no se observó ninguna señal que indicara dolor (pelo erizado, taquipnea, disminución en la ingesta de agua y comida, etc.). Al finalizar los 5 días de la administración de la DNasa I, todos los animales sobrevivieron sin perder peso (Figura 13).

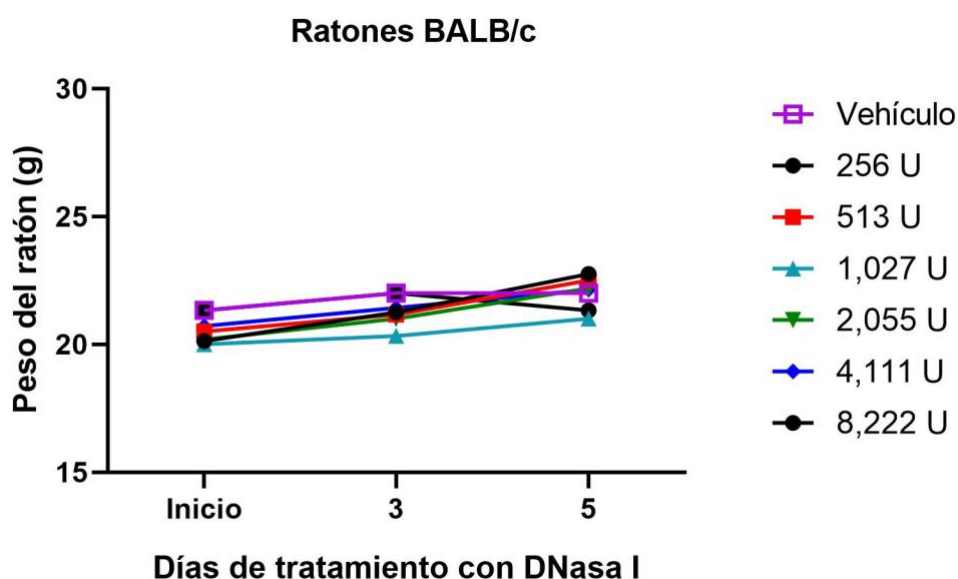


Figura 13. Peso de ratones BALB/c. El tratamiento con las seis diferentes dosis no generó cambios significativos en el peso de los ratones después de recibir la enzima durante cinco días continuos. El vehículo utilizado fue cloruro de sodio (0.9% NaCl).

8.8 Efecto antitumoral de la DNasa I en ratones BALB/c.

Considerando que en los ensayos *in vitro* demostramos que la DNasa I disminuyó la viabilidad y la clonogenicidad de las células de cáncer de colon murino (CT26) y que la dosis más alta de la DNasa I (8,222 U) no tuvo ningún efecto tóxico en los ratones BALB/c, se decidió evaluar el efecto antitumoral de la DNasa I en un modelo de ratones BALB/c inoculados con células CT26 (que son de origen murino). El cálculo de la dosis equivalente de la DNasa I en ratones, como parte del tratamiento antitumoral, se describió en el apartado 7.11 de la sección de materiales y métodos (161,838 U/kg igual a 3,236 U por ratón, los cuales pesaban en promedio 20 g), adicionalmente se evaluó el efecto de la dosis reportada de la DNasa I para ratones (80 U). Para la generación de tumores se inyectaron vía subdérmica en la región dorso-caudal 500,000 células suspendidas en 100 μ L de medio libre de suero. El séptimo día posterior a la inoculación de las células tumorales, se inició la administración de la DNasa I. En total el tratamiento consistió en 20 inyecciones intraperitoneales y al término de la última inyección los animales fueron sacrificados, se recolectó el suero y los tumores de cada grupo evaluado.

Durante el tiempo de tratamiento, se observó que los tumores de los ratones tratados con la dosis equivalente se desarrollaron más lento comparado al grupo control (sólo con el vehículo), lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). En el día 28, el volumen promedio de los tumores en el grupo tratado fue 37% menor que en el grupo control; sin embargo, para el día 33, la reducción del volumen tumoral fue del 23% (Figura 14-A).

Por otro lado, la dosis reportada de 80 U no tuvo efecto sobre el volumen del tumor primario. El peso de los ratones no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figura 14-B).

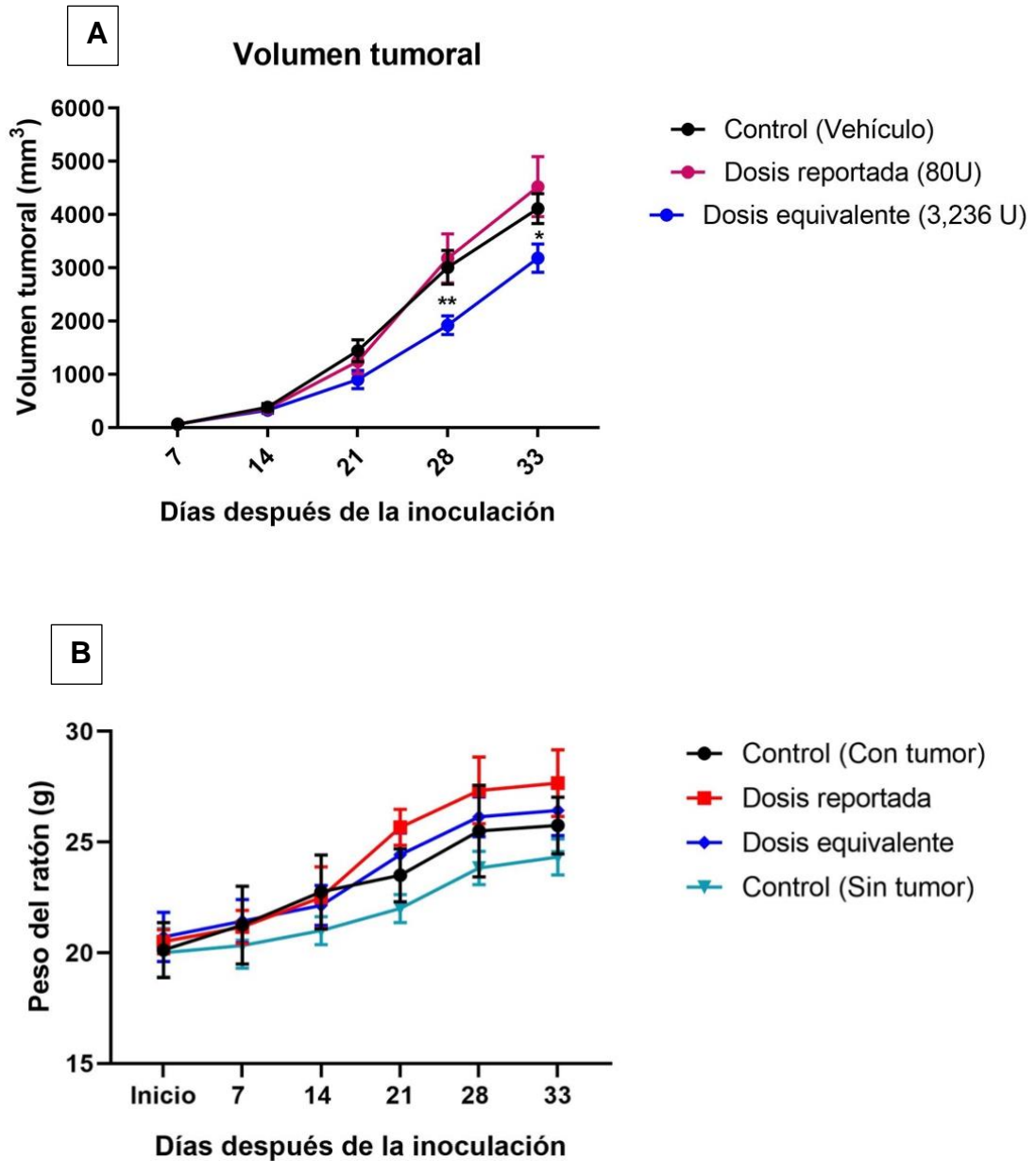


Figura 14. Efecto de la DNasa I en el modelo *in vivo*. (A) La dosis equivalente de la DNasa I disminuyó de forma significativa el volumen tumoral en comparación al control, la dosis reportada no tuvo efecto sobre el modelo. (B) No hay diferencias significativas en el peso de los ratones de los grupos evaluados (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

8.9 Cuantificación de los niveles de DNAcir en el suero de ratones BALB/c con y sin el tratamiento de la DNasa I.

Para evaluar el efecto de la DNasa I *in vivo*, se cuantificó el DNAcir presente en el suero de los ratones del experimento anterior. Esta cuantificación de DNAcir se realizó al finalizar el tratamiento de 20 inyecciones intraperitoneales de la DNasa I, tanto en los grupos con tumor como en los grupos sin tumor.

Para comprobar que el crecimiento tumoral aumenta los niveles de DNAcir, se compararon los niveles de DNAcir del grupo control con tumor y del grupo control sin tumor (es decir los grupos que no recibieron tratamiento con la enzima). Como se esperaba, la concentración de DNAcir en el suero de los ratones con tumor (204 ng/mL) es dos veces mayor que la concentración determinada en los ratones sin tumor (90 ng/mL), este aumento fue estadísticamente significativo (**** $p < 0.0001$) (Figura 15).

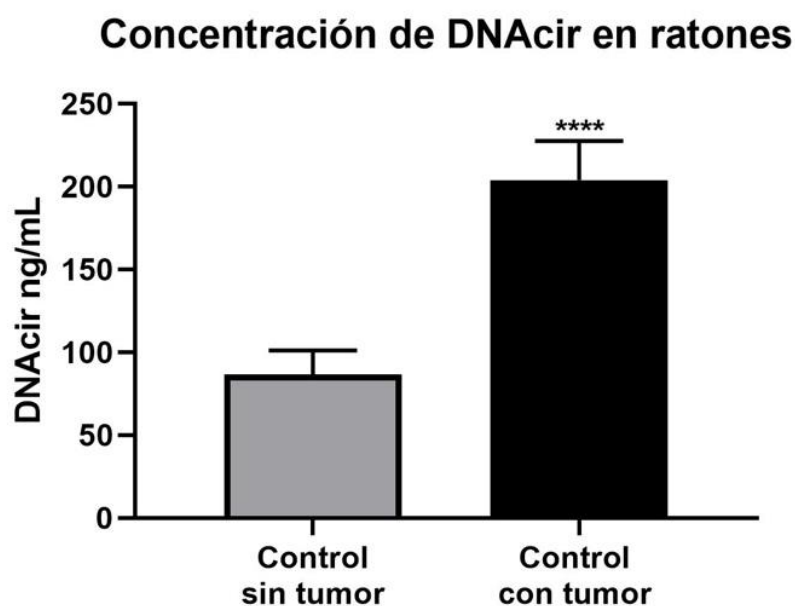


Figura 15. Concentración de DNAcir en los grupos control. Los niveles de DNAcir aumentan cuando hay un desarrollo tumoral en ratones BALB/c (**** $p < 0.0001$).

Posteriormente, se comparó la concentración de DNAcir en los grupos con tumor, con y sin tratamiento enzimático. Se observó que la dosis equivalente de humanos en ratones disminuyó de manera significativa ($p < 0.001$) los niveles de DNAcir en el suero de los ratones; de 204 ng/mL encontrado en el grupo control con tumor a 140 ng/mL del grupo que recibió la dosis equivalente de 3,236 U de la DNasa I; esto equivale a una disminución del 32% en la concentración de DNAcir en suero. Por otro lado, la dosis reportada no tuvo efecto significativo sobre la cantidad de DNAcir ya que la concentración encontrada fue de 190 ng/mL (Figura 16). Estos resultados sugieren que el DNAcir tiene un efecto en el crecimiento tumoral y que su degradación mediante el uso de la DNasa I contrarresta este efecto.

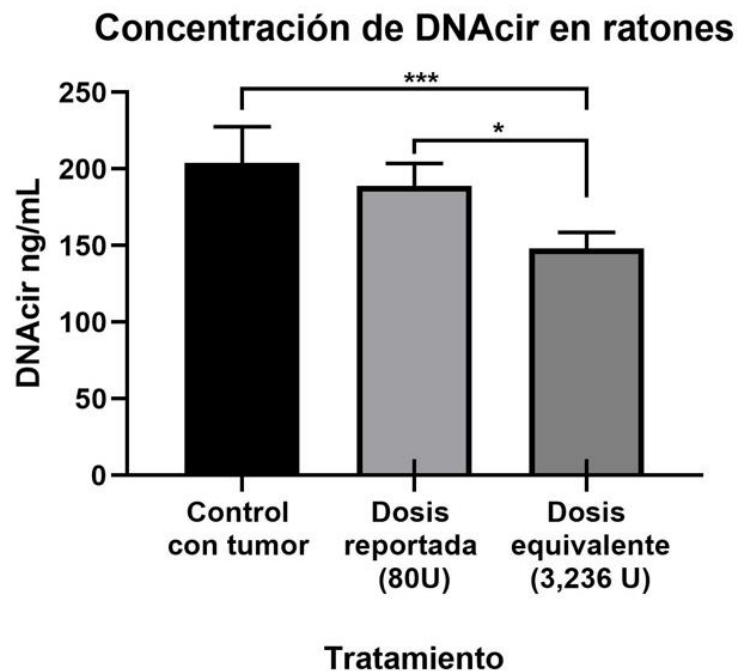


Figura 16. Concentración de DNAcir en el suero de ratones con tumor. El nivel de DNAcir disminuyó con la administración de la dosis equivalente de humanos en el suero de ratones, después de 20 inyecciones intraperitoneales a ratones BALB/c inoculados con células CT26. (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial uso de la DNasa I como tratamiento para cáncer y los resultados obtenidos sugieren que puede ser considerada como un agente antitumoral, ya que disminuyó la viabilidad y clonogenicidad de células de cáncer de colon humano (SW480) y murino (CT26); además el efecto antes mencionado en el modelo *in vitro*, se correlacionó con lo observado en el modelo *in vivo* con ratones BALB/c en los que los tumores generados por CT26, tuvieron un crecimiento más lento cuando se administró la DNasa I. Esta observación se relacionó con la disminución de la concentración de DNAcir en el suero de estos ratones lo cual sugiere que el DNAcir participa en el desarrollo tumoral.

Diferentes estudios han señalado al DNAcir como un blanco terapéutico, por lo que su degradación mediante el uso de enzimas como la DNasa I se ha considerado una estrategia antitumoral (Trejo-Becerril *et al.*, 2016, Thierry *et al.*, 2016, Al-Haidari *et al.*, 2019). Por otro lado, el reposicionamiento terapéutico ha cobrado importancia en los últimos años, ya que permite el uso de fármacos que ya fueron aprobados en afecciones no malignas, para su aplicación contra el cáncer (González-Fierro & Dueñas-González, 2021). La DNasa I se ha usado clínicamente como antiinflamatorio (Johnson *et al.*, 1954) y para reducir la viscosidad del moco en la fibrosis quística (Suri, 2005), sin embargo, en la actualidad esta enzima continúa siendo estudiada como una terapia para el cáncer.

El potencial de la DNasa I como agente antitumoral, se debe a su alta afinidad y especificidad sobre el DNA (Vellard, 2003) así como por su capacidad de contrarrestar los niveles deficientes de la DNasa I endógena en pacientes con cáncer (Tamkovich *et al.*, 2006). Diversos estudios han evaluado su efecto en líneas celulares tumorales y en modelos *in vivo*, demostrando que la DNasa I tiene un efecto en la viabilidad, clonogenicidad, migración y adhesión de células tumorales; mientras que en modelos murinos, la DNasa I se ha dirigido principalmente contra las metástasis y se ha observado su efecto antimetastásico (Sugihara *et al.*, 1993, García-Higuera *et al.*, 2001, Alcázar-

Leyva *et al.*, 2009, Wen *et al.*, 2013, Alexeeva *et al.*, 2017, Al-Haidari *et al.*, 2019, Trejo-Becerril *et al.*, 2016).

Debido al potencial terapéutico de la DNasa I antes mencionado, se evaluó su efecto en líneas celulares de cáncer de colon y en el tumor primario de ratones BALB/c inoculados con células CT26.

Para los experimentos *in vitro*, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva sobre las dosis de la DNasa I utilizada en ensayos de viabilidad; encontrando muy pocos trabajos y con información insuficiente para ser reproducibles. Uno de los estudios que aporta información clara respecto a las dosis empleadas en ensayos de viabilidad fue el de Alexeeva y colaboradores (2017), quienes reportaron que la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de la DNasa I en células de melanoma murino (B16) fue de 1000 U/mL (Alexeeva *et al.*, 2017); por lo que, para este proyecto, se evaluaron seis diferentes dosis de la DNasa I que fueron desde 120 hasta 600 U/mL en un período de 72 h (en períodos de 24 y 48 h no se observaron diferencias significativas).

Las dosis de DNasa I utilizadas en los diversos estudios son muy heterogéneas entre sí y en pocos reportes se ha demostrado que tiene la capacidad de disminuir la viabilidad de diferentes líneas celulares. Los porcentajes de inhibición de dichos estudios fueron distintos dependiendo de la línea celular; por ejemplo, en el caso de B16-F10 la viabilidad celular disminuyó un 20% (efecto observado con 1,750 U/mL de la DNasa I), en CaLu-1, SK-MES-1, y L-929 un 50% y los mejores resultados se observaron en HeLa y HEP-2 con un 90% de inhibición de la viabilidad celular (efecto observado con 9 µg/mL de la DNasa I) (Alekseeva *et al.*, 2021, Alcázar-Leyva *et al.*, 2009). Por el contrario, en el estudio realizado por Wen y colaboradores (2013), la concentración de 30 U/mL de la DNasa I no disminuyó la viabilidad de líneas celulares de cáncer de páncreas como MiaPaCa-2, BxPc3 y Panc-1 (Wen *et al.*, 2013). A pesar de las diferencias en cada uno de los resultados, coinciden en dos puntos: el efecto más significativo de la DNasa I se observó con al menos 24 h de exposición al tratamiento y con las dosis más altas de la DNasa I (las unidades de medida reportadas por Alcázar-Leyva y colaboradores son en µg/mL y no fue posible

obtener la equivalencia en U/mL). Nosotros también demostramos el efecto de la DNasa I sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de colon SW480 y CT26; siendo la exposición a las concentraciones más altas de esta enzima (360, 480 y 600 U/mL) durante 72 h, las que disminuyeron la viabilidad de forma significativa respecto al control entre un 20 y 35%; estos resultados apoyan el hecho de que el efecto de la DNasa I, depende del tipo de línea celular, dosis empleada y tiempo de tratamiento.

Por otra parte, se evaluó el efecto de la DNasa I en la clonogenicidad de las líneas celulares de colon; y nuevamente las dosis más altas de esta enzima disminuyen entre un 24 y 49% el número de colonias formadas; resultados similares fueron reportados por García-Higuera y colaboradores (2001) quienes observaron que la DNasa I es capaz de disminuir la formación de colonias en células de melanoma murino (B16-F10; García-Higuera *et al.*, 2001).

La diferencia en la sensibilidad de estas líneas celulares podría deberse a las condiciones experimentales empleadas en cada uno de los ensayos (dosis, tiempo de tratamiento y tipo de línea celular); por ejemplo, los mejores resultados se observaron con al menos 24 h de tratamiento, lo que se podría explicar por el tiempo de duplicación de cada línea celular en donde la división celular es el momento más susceptible de las células debido a que su material genético queda expuesto para ser dañado por la DNasa I. Además, se ha reportado que la G-actina es uno de los principales componentes del citoesqueleto en células eucariotas y un inhibidor importante de la DNasa I, lo cual podría explicar en parte, que solamente concentraciones altas de esta enzima, en nuestras condiciones experimentales, tienen resultados significativos en la viabilidad y clonogenicidad de las diferentes líneas celulares evaluadas en comparación con las dosis más bajas (Chhabra *et al.*, 2002, Alcázar-Leyva *et al.*, 2009, Alekseeva *et al.*, 2021).

Actualmente no se conoce el mecanismo de acción por el cual la DNasa I disminuye la viabilidad celular y la clonogenicidad de diversas líneas celulares; por ello se han propuesto dos posibles mecanismos de acción: uno indirecto que consiste en la degradación del DNAex que liberan las células y que se ha

observado que tiene funciones biológicas (mensajero intercelular); y el mecanismo directo, en el cual la enzima daña la integridad y componentes de las células tumorales debido a que estas son más permeables que las células no malignas (Thierry *et al.*, 2016, Alcázar-Leyva *et al.*, 2009). Para investigar este último mecanismo se han realizado experimentos donde evalúan la integridad del DNA nuclear de células tumorales expuestas a la DNasa I; sin embargo, solo se ha observado una degradación insignificante del material nucleico (Alcázar-Leyva *et al.*, 2009, García-Higuera *et al.*, 2001).

Tomando en cuenta las propuestas antes mencionadas y una vez que demostramos el efecto de la DNasa I sobre la viabilidad y la clonogenicidad de las líneas celulares estudiadas, resultó interesante evaluar el mecanismo de muerte celular por el cual disminuyó la viabilidad de ambas líneas celulares, además de cuantificar la concentración del DNAex en el medio condicionado después del tratamiento con la DNasa I. Y lo que se observó es que cierto porcentaje de células fue inducida a apoptosis y necrosis por la DNasa I, con la dosis de 600 U/mL; en las células SW480 el 13% estaban en estado apoptótico y un 2% en estado necrótico, mientras que en las células CT26, el 19% de muerte celular fue por apoptosis y un 8% por necrosis. De igual forma, en el artículo publicado por Alekseeva y colaboradores (2021) reportaron que las células de melanoma murino tratadas con la DNasa I, presentaron muerte celular por apoptosis y necrosis en un porcentaje del 5% y 2% respectivamente (Alekseeva *et al.*, 2021).

Por otra parte, los porcentajes de viabilidad celular del primer ensayo realizado con cristal violeta y los obtenidos por citometría de flujo (la cual determina muerte por apoptosis y necrosis; Anexo 2) no son iguales, y esto se debe principalmente a que la técnica de cristal violeta evalúa la muerte celular de forma indirecta tiñendo las células viables que están adheridas a una superficie y es posible que con la manipulación se despeguen células que aún estén vivas y no son consideradas con esta técnica; mientras que la citometría de flujo valoró dos tipos de muerte celular de forma más específica. Sin embargo, también es importante considerar que estudios previamente realizados han descrito otro tipo de muerte celular en las células expuestas al tratamiento con la DNasa I y que

muestran cambios morfológicos asociados a un tipo de muerte celular conocido como autoesquesis, caracterizado por el redondeo celular, ampollas celulares y reducción del núcleo (Alvarado-Vásquez *et al.*, 1996).

Una vez analizado el mecanismo de muerte celular que se activa posterior al tratamiento con la DNasa I, nos preguntamos si los resultados de viabilidad celular podrían también estar relacionados con la cantidad de DNA que cada línea celular libera al medio extracelular y que pueda ser degradado por la enzima. Para esto se cuantificó el DNAex en los medios condicionados de las líneas celulares SW480 y CT26. En la línea celular SW480, la DNasa I mantiene la concentración del DNAex por debajo del control, en todos los tiempos y dosis evaluadas; sin embargo, no hay una correlación entre el tiempo, dosis y respuesta al tratamiento. Por otro lado, en la línea celular CT26 se observaron resultados contrastantes, ya que el tratamiento con la DNasa I no disminuyó el nivel de DNAex en ningún tiempo ni dosis empleada, por el contrario, aumentó; aunque el incremento del DNAex en esta línea celular no fue proporcional a la dosis empleada, sí hay una ligera tendencia a incrementar en relación con la concentración de la enzima.

Debido a la actividad enzimática de la DNasa I, se esperaba que existiera una correlación entre la dosis empleada y la disminución de la concentración de DNAex, además de que este efecto estuviese relacionado con la disminución de la viabilidad celular; sin embargo, la cuantificación del DNAex en ambas líneas celulares muestra que responden de forma distinta al tratamiento con la DNasa I y que no hay un efecto dosis-respuesta. Esto podría deberse a características propias de cada tipo de célula. Se ha demostrado en estudios previos que la liberación de DNA al medio extracelular es diferente en cada línea celular y se identificaron 3 patrones de liberación a lo largo del tiempo en la fase de crecimiento exponencial: algunas líneas celulares con tendencia al aumento, otras con tendencia a disminuir y algunas con niveles variados de DNAex; además, estos patrones no estuvieron asociados al origen tisular de estas células (Aucamp *et al.*, 2016).

Si bien en este trabajo no se realizó una caracterización detallada del patrón de liberación del DNA al medio extracelular, en los controles se observó que SW480 mantiene las mismas concentraciones de DNAex a las 24 y 48 h con un aumento a las 72 h; mientras en el caso de CT26, hay una tendencia a aumentar los niveles de DNAex desde las 24 h iniciales, pero sobre todo de las 48 a las 72 h, por lo tanto, no solo el tratamiento con la DNasa I provocó diferencia en las concentraciones de DNAex sino también la propia naturaleza de la línea celular.

Otros reportes han informado que células inducidas a apoptosis y necrosis, liberan una mayor cantidad del DNA al medio extracelular, sugiriendo que estos dos tipos de muerte celular son los principales mecanismos de liberación, aunque pueden existir otros (Bronkhorst *et al.*, 2016). Tomando lo anterior como referencia, los porcentajes de muerte celular por apoptosis y necrosis que encontramos pudieron contribuir al aumento del DNAex, sobre todo de las 48 a las 72 h y principalmente en las células CT26, cuyo efecto fue el más inesperado ya que ninguna de las dosis de la DNasa I disminuyó la concentración del DNAex en el medio condicionado, por el contrario, la concentración aumentó.

Después de observar que la disminución de la viabilidad y la concentración de DNAex en el medio condicionado de ambas líneas celulares no estaba relacionado de forma dosis-dependiente con el tratamiento de la DNasa I y como parte del estudio del papel del DNAex sobre las líneas celulares, decidimos evaluar el efecto de altas concentraciones de DNAex exógeno en comparación a las encontradas de forma basal. Se observó que una alta concentración de DNAex en los medios condicionados, aumentó la viabilidad de ambas líneas celulares y que el posterior tratamiento con la DNasa I contrarrestó este efecto de manera significativa sobre todo en la línea celular CT26. La técnica de cristal violeta con la que se evaluó este efecto tiene ciertas limitaciones como se mencionó anteriormente, por lo cual, la interpretación de “aumento en la viabilidad” debería tomarse con ciertas reservas; en este trabajo se utilizó dicho término por cuestiones de tiempo ya que no fue posible por el momento, la realización de los ensayos de ciclo celular que nos indicarían si las células expuestas a una alta concentración de DNAex exógeno se encuentran preferentemente en una determinada fase del ciclo celular y que nos ayudaría a

explicar el efecto en el “aumento de viabilidad”. Al realizar una revisión bibliográfica extensa, este efecto del “aumento de viabilidad” no ha sido reportado anteriormente, pero si se ha demostrado que el DNA presente en el sobrenadante de células SW480 tiene la capacidad de transformar otras líneas celulares y que el tratamiento previo con la DNasa I aunado a otras proteínas, evita este resultado (Trejo-Becerril *et al.*, 2012, Anker *et al.*, 1994). En conjunto, estas observaciones sugieren que el DNAex que tiene un efecto biológico sobre la célula puede ser anulada con el tratamiento de la DNasa I. Esto puede ser contrastante con lo observado en los resultados anteriores en los que el efecto de la DNasa I en la disminución de la viabilidad no tiene relación con las concentraciones de DNAex observadas; sin embargo, quizá la concentración del DNAex *per se* no sea la razón, sino la integridad del propio DNAex presente en el medio.

Actualmente en nuestro país está aprobado en humanos el uso de la DNasa I en combinación con RNasa I (RD nuverasa, origen bovino) cuya administración se realiza por vía intramuscular y está indicada como tratamiento enzimático y coadyuvante en proceso virales (RD NUVERASA - PLM, s/f), sin embargo, la administración intravenosa de la DNasa I no ha sido aprobada en humanos y tampoco como tratamiento para el cáncer. No obstante, se ha explorado su efecto en modelos *in vitro* e *in vivo* y en la mayoría se considera a la DNasa I con potencial terapéutico. En consecuencia, los estudios realizados en modelos murinos administran la DNasa I en dosis experimentales acorde al modelo que utilizan, pero no a las dosis empleadas en humanos. En este trabajo, el objetivo fue evaluar en un modelo murino, una dosis lo más cercana a lo que podría administrarse en humanos y se tomó como antecedente el artículo publicado por Johnson y colaboradores en el año de 1954. Si bien este artículo no evaluó a la DNasa I como tratamiento antitumoral, si se administró vía intravenosa a pacientes con meningitis y además reportaron dosis no tóxicas y niveles séricos de la enzima en sangre (Johnson *et al.*, 1954). Las dosis utilizadas como tratamiento y las dosis no tóxicas reportadas en estos pacientes se utilizaron para calcular las dosis equivalentes de humanos en ratones (se describe en la sección 7.10 y 1.11 de materiales y métodos) que se evaluaron en el modelo de ratones BALB/c con tumores derivados de células CT26.

En primer lugar, se observó que con la dosis de hasta 8,222 U/ratón (equivalente a la dosis no tóxica de 2,000,000 U en humanos, Johnson y colaboradores; 1954) los animales no presentaron daños físicos aparentes (pérdida de apetito, señales de dolor, poca movilidad) y al finalizar los 5 días de tratamiento todos los animales sobrevivieron sin perder peso; por lo cual, se consideró que la administración de la DNasa I en dosis altas era segura en ratones BALB/c y se administró la dosis equivalente de humanos en ratones para evaluarla como tratamiento antitumoral (161,838 U/kg igual a 3,236 U por ratón, los cuales pesaban en promedio 20 g). En estudios previos también se ha reportado de la seguridad y baja toxicidad de la DNasa I en ratones (Patutina *et al.*, 2011).

Nuestros resultados mostraron que la dosis equivalente de 3,236 U/ratón, retrasó el desarrollo tumoral en ratones BALB/c inoculados con células CT26 y al finalizar el tratamiento, el volumen del tumor primario fue 23% menor a los controles; este efecto correlacionó con la disminución significativa de un 28% en la concentración del DNAcir respecto al grupo control con tumor y sin tratamiento enzimático. Además, comparando los grupos control con y sin tumor, se observó que cuando hay crecimiento tumoral, la concentración del DNAcir en el suero aumenta dos veces más de forma significativa. Adicionalmente se evaluó una dosis promedio de tres estudios (80 U/ratón, Park *et al.*, 2016, 2019; Alekseeva *et al.*, 2021; Patutina *et al.*, 2011) la cual no tuvo efecto sobre el tumor primario y tampoco en la concentración del DNAcir en el suero de los ratones.

Los resultados antes descritos, coinciden con los obtenidos por otros grupos de investigación; por ejemplo, Patutina y colaboradores (2011) reportaron que, en ratones portadores de tumores, los niveles de DNAcir en plasma aumentan entre 1.1 y 1.3 veces y que el efecto antimetastásico de la DNasa I está ligado a una disminución del DNAcir en el plasma sanguíneo de ratones con metástasis pulmonares o hepáticas (Patutina *et al.*, 2011). Alekseeva y colaboradores (2017) también observaron dicha correlación además de cambios en el perfil del DNAcir después del tratamiento con la DNasa I (Alekseeva *et al.*, 2017). Otros reportes señalan que la DNasa I elimina el DNAex de las trampas de neutrófilos (NETs), reduciendo así el número de metástasis en modelos de cáncer de colon y de pulmón (Al-Haidari *et al.*, 2019, Park *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría

de los estudios que utilizan a la DNasa I como tratamiento, tienen éxito sobre la reducción de las metástasis, pero no sobre el tumor primario (Trejo-Becerril *et al.*, 2016, Sugihara *et al.*, 1993, Park *et al.*, 2016, Alekseeva *et al.*, 2017). Esto podría deberse a que las dosis reportadas en estos estudios, no son suficientemente altas como la dosis equivalente (3,236 U/ratón) evaluada en este trabajo; al mismo tiempo en estos artículos, se considera que el principal y posible mecanismo por el que se observa el efecto antimetastásico, sea la degradación directa sobre el DNAcir, el cual se ha demostrado que participa en la transformación maligna de las células (Alekseeva *et al.*, 2017); pero no toman en consideración el posible efecto que la DNasa I tenga sobre el microambiente tumoral (Alekseeva *et al.*, 2021); y que quizá, solamente dosis altas de la enzima puedan ejercerlo, por lo que esto correlacionaría con lo demostrado en los ensayos de viabilidad y clonogenicidad.

El enfoque de nuestra investigación no fue mecanístico, por lo que vimos limitada nuestra capacidad de describir el proceso por el cuál la DNasa I tuvo efecto sobre las células en nuestro modelo de estudio. Sería interesante analizar los efectos del tratamiento con la DNasa I en un modelo de xenotrasplante (implantación de células humanas en ratones) ya que sería más parecido al objetivo principal que es su uso en humanos. Por otra parte, una de las principales aportaciones de este trabajo fue información clara y reproducible de las dosis utilizadas en U/mL o U/ratón, y que se evaluó el efecto de la dosis equivalente de humanos en ratones de la DNasa I lo cual permitirá tener un mejor acercamiento a lo que podría administrarse en pacientes con cáncer; conjuntamente se eligió el modelo de cáncer de colon por la cinética de crecimiento tumoral que presenta y por ser uno de los primeros modelos utilizados para el estudio del DNAcir.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que la DNasa I tiene efecto negativo sobre la viabilidad y clonogenicidad de las líneas celulares SW480 y CT26. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la DNasa I causó dicho efecto, se demostró que la enzima puede inducir a las células a apoptosis o necrosis y aunque estos resultados no correlacionaron con un efecto dosis-respuesta en las concentraciones de DNAex, sí se observó que una alta concentración de DNAex exógeno puede aumentar la viabilidad celular. En el

modelo murino, la dosis equivalente de humanos en ratones de la DNasa I, tuvo efecto antitumoral y se correlacionó con una menor cantidad de DNAcir en el suero de estos animales.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que el tratamiento con la DNasa I bovina disminuye la viabilidad celular y la clonogenicidad de dos líneas celulares de cáncer de colon SW480 y CT26, y que el principal mecanismo por el cual se observa este efecto es la muerte por apoptosis y necrosis.

No se observó un efecto dosis-respuesta de la DNasa I bovina sobre la concentración de DNAex en el medio condicionado de ambas líneas celulares.

También se demostró que una alta concentración de DNAex aumenta la viabilidad celular y que este efecto puede ser contrarrestado por la DNasa I.

La dosis equivalente de humanos en ratón (3,236 U), reduce el crecimiento tumoral y disminuye la concentración del DNAcir en ratones con tumores de cáncer de colon.

Los resultados obtenidos en este trabajo aunados a los antecedentes de la literatura sugieren que la DNasa I bovina puede utilizarse como un agente antitumoral con potencial en el reposicionamiento terapéutico.

PERSPECTIVAS

Realizar ensayos de ciclo celular con las células expuestas al tratamiento con la DNasa I y a una alta concentración de DNAex.

Caracterizar el patrón de liberación del DNAex en las líneas celulares de cáncer de colon humano (SW480) y murino (CT26).

Evaluar el efecto antitumoral y antimetastásico de la dosis equivalente de humanos de la DNasa I en un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon.

ANEXOS

1. Preparación de soluciones.

PBS 10X

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KHPO ₄	2.4 g

Agregar cada uno de los reactivos a 800 mL de agua, ajustar el pH a 7.4 con NaOH y llevar al aforo a 1 L, agitar vigorosamente y esterilizar por autoclave.

0.5 M de EDTA

Agregar 186.1 g de sal de EDTA disódico en 800 mL de agua, ajustar el pH a 8 con NaOH, llevar al aforo a 1 L, agitar vigorosamente y esterilizar por autoclave.

DNasa I

DNasa I de bovino (Sigma-Aldrich, # de cat. DN25) con una concentración de 400 U/mg, se diluyeron 5mg en 1 mL de medio de cultivo.

DNasa I de bovino (Sigma-Aldrich, # de cat. D5025) con una concentración de 2,000 U/mg, se diluyeron 5 mg en 1 mL de solución salina al 0.15 M como lo indica el proveedor.

2. Corroboración de la actividad de la DNasa I diluida en medios de cultivo.

Con la finalidad de comprobar que la DNasa I no perdía actividad al ser diluida en el medio de cultivo (DMEM-F12 o RPMI) se diluyeron 5 mg de la enzima en 1 mL de medio de cultivo y 5mg de DNasa I en 1 mL de NaCl (como lo indica el proveedor), posteriormente, el DNA genómico de células SW480 fue expuesto durante 1 h a la DNasa I disuelta en los medios de cultivo y en solución salina. Al concluir el tiempo de exposición se realizó la extracción y purificación del DNA

como se describe en la sección 7.6 de materiales y métodos. Finalmente se realizó un gel de agarosa al 1.5% para determinar la integridad del DNA. No se observaron cambios en la degradación del DNA genómico utilizando la DNasa I disuelta en medio de cultivo o en NaCl (Figura 15).

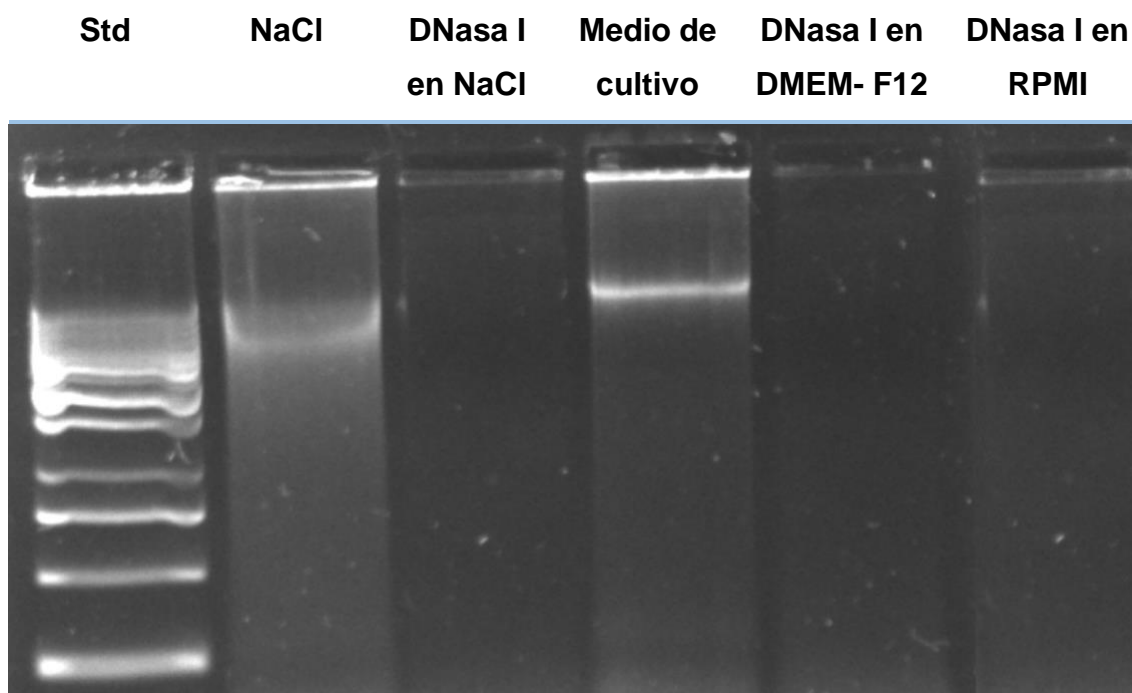


Figura 17. Degradación de DNA genómico con DNasa I disuelta en medios de cultivo. La DNasa I disuelta en medio de cultivo no perdió actividad y degradó al DNA genómico de forma eficiente obteniendo resultados similares cuando se diluyo en NaCl como indica el proveedor.

3. Comparación del porcentaje de muerte celular por dos técnicas.

Línea celular	% de muerte celular con la dosis de 600 U/mL	
	Cristal violeta	Citometría de flujo
SW480	35%	15%
CT26	25%	27%

BIBLIOGRAFÍA

Al-Haidari, A. A., Algethami, N., Lepsenyi, M., Rahman, M., Syk, I., & Thorlacius, H. (2019). Neutrophil extracellular traps promote peritoneal metastasis of colon cancer cells. *Oncotarget*, *10*(12), 1238–1249.

Albregues, J., Shields, M. A., Ng, D., Park, C. G., Ambrico, A., Poindexter, M. E., Upadhyay, P., Uyeminami, D. L., Pommier, A., Küttner, V., Bružas, E., Maiorino, L., Bautista, C., Carmona, E. M., Gimotty, P. A., Fearon, D. T., Chang, K., Lyons, S. K., Pinkerton, K. E., Egeblad, M. (2018). Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *361*(6409), 4227.

Alcázar-Leyva, S., Cerón, E., Masso, F., Montaña, L. F., Gorocica, P., & Alvarado-Vásquez, N. (2009). Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *15*(2), CR51-55.

Alekseeva, L. A., Mironova, N. L., Brenner, E. V., Kurilshikov, A. M., Patutina, O. A., & Zenkova, M. A. (2017). Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment. *PloS One*, *12*(2), e0171988.

Alekseeva, L., & Mironova, N. (2021). Role of cell-free DNA and deoxyribonucleases in tumor progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22), 12246.

Alekseeva, L., Sen'kova, A., Savin, I., Zenkova, M., & Mironova, N. (2021). Human recombinant DNase I (Pulmozyme®) inhibits lung metastases in Murine metastatic B16 melanoma model that correlates with restoration of the DNase activity and the decrease SINE/LINE and c-Myc fragments in blood cell-free DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 12074.

Alexeeva, L. A., Patutina, O. A., Sen'kova, A. V., Zenkova, M. A., & Mironova, N. L. (2017). Inhibition of invasive properties of Murine melanoma by bovine pancreatic DNase I *in vitro* and *in vivo*. *Molekuliarnaia biologii*, 51(4), 637–646.

Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discovery*, 11(4), 858–873.

Alvarado-Vásquez, N., Alcázar-Leyva, S., Benítez-Rodríguez, M., & Zamudio-Cortés, P. (1996). Decrease in viability and proliferation ability of tumor cell lines by effect of a deoxyribonuclease. *Rev. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 9(2), 93–99.

Anker, P., Lyautey, J., Lefort, F., Lederrey, C., & Stroun, M. (1994). Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 317(10), 869–874.

Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S., & Pretorius, P. J. (2016). A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(23), 4355–4381.

Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Peters, D. L., Van Dyk, H. C., Van der Westhuizen, F. H., & Pretorius, P. J. (2017). Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines *in vitro*. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(14), 2689–2707.

Bendich, A., Wilczok, T., & Borenfreund, E. (1965). Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 148(3668), 374–376.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., ... Diaz, L. A., Jr. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early-

and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24.

Bronkhorst, A. J., Wentzel, J. F., Aucamp, J., van Dyk, E., du Plessis, L., & Pretorius, P. J. (2016). Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(1), 157–165.

Candelaria, M., Herrera, A., Labardini, J., González-Fierro, A., Trejo-Becerril, C., Taja-Chayeb, L., Pérez-Cárdenas, E., de la Cruz-Hernández, E., Arias-Bofill, D., Vidal, S., Cervera, E., & Dueñas-González, A. (2011). Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial. *Annals of Hematology*, 90(4), 379–387.

Chabner, B. A., Lynch, T. J., Jr, & Longo, D. L. (2013). *Harrisons Manual of Oncology 2/E* (2nd ed.). McGraw-Hill Medical.

Cheng, F., Su, L., & Qian, C. (2016). Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30), 48832–48841.

Chhabra, D., Bao, S., & dos Remedios, C. G. (2002). The distribution of cofilin and DNase I *in vivo*. *Cell Research*, 12(3–4), 207–214.

Coronel, J., Cetina, L., Pacheco, I., Trejo-Becerril, C., González-Fierro, A., de la Cruz-Hernández, E., Pérez -Cárdenas, E., Taja-Chayeb, L., Arias-Bofill, D., Candelaria, M., Vidal, S., & Dueñas-González, A. (2011). A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 28 Suppl 1(S1), S540-6.

Cruz-Bustillo C, D. (2004). Genética molecular del cáncer colorrectal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96(1), 48-59.

Cruz-Bustillo Clarens, D. (2004). Molecular genetics of colorectal cáncer. *Revista Española de Enfermedades Digestivas: Organo Oficial de La Sociedad Española de Patología Digestiva*, 96(1), 48–59.

De la Cruz-Hernández, E., Medina-Franco, J. L., Trujillo, J., Chavez-Blanco, A., Domínguez-Gómez, G., Pérez -Cárdenas, E., González-Fierro, A., Taja-Chayeb, L., & Dueñas-González, A. (2015). Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncology Reports*, 33(5), 2384–2392.

Fauci, Wilson, & Harrison, T. R. (2000). *Principios de Medicina Interna (2 T.)* (14a ed.). McGraw-Hill Professional Publishing.

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.

Fernández-Domínguez, I. J., Manzo-Merino, J., Taja-Chayeb, L., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., & Trejo-Becerril, C. (2021). The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer Biology & Therapy*, 22(4), 267–278.

Fujihara, J., Yasuda, T., Ueki, M., Iida, R., & Takeshita, H. (2012). Comparative biochemical properties of vertebrate deoxyribonuclease I. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 163(3–4), 263–273.

Gahan, P. B., Anker, P., & Stroun, M. (2008). Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 7–17.

García-Higuera, M., Alvarado-Vásquez, N., Alcázar-Leyva, S., Meneses-Flores, M., Cerón-Rodríguez, E., & Zamudio-Cortés, P. (2001). Efectos de la desoxirribonucleasa I sobre células del melanoma murino B16-F10. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 14(2), 79–84.

González Ballesteros, M. (2016). Estudio preclínico del tratamiento sistémico con proteasas y DNasa-I en dos modelos tumorales *in vivo*. (Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México.

González-Fierro, A., & Dueñas-González, A. (2021). Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done. *Seminars in Cancer Biology*, 68, 123–131.

Grabuschnig, S., Bronkhorst, A. J., Holdenrieder, S., Rosales Rodriguez, I., Schliep, K. P., Schwendenwein, D., Ungerer, V., & Sensen, C. W. (2020). Putative origins of cell-free DNA in humans: A review of active and passive nucleic acid release mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8062.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.

Ignatiadis, M., Sledge, G. W., & Jeffrey, S. S. (2021). Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 18(5), 297–312.

Jiang, P., Chan, C. W. M., Chan, K. C. A., Cheng, S. H., Wong, J., Wong, V. W.-S., Wong, G. L. H., Chan, S. L., Mok, T. S. K., Chan, H. L. Y., Lai, P. B. S., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2015). Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), E1317-25.

Johnson, A. J., Goger, P. R., & Tillett, W. S. (1954). The intravenous injection of bovine crystalline pancreatic desoxyribonuclease into patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 33(12), 1670–1686.

Juárez-Vázquez, C. I., & Rosales-Reynoso, M. A. (2014). Cáncer colorrectal (CCR): Alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*, 150, 154–164.

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J., Los Calzo J(Eds.), (2019). *Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e*. McGraw Hill.2

Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy, 20*(8), 1057–1067.

Lauková, L., Konečná, B., Janovičová, L., Vlková, B., & Celec, P. (2020). Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine. *Biomolecules, 10*(7), 1036.

Leiva, A., (2002). DNasa I en el cristalino bovino. (Tesis de doctorado en ciencias). Universidad de la república.

León, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research, 37*(3), 646–650.

Martínez-Ezquerro, J. D., Trejo-Becerril, C., & Dueñas-González, A. (2008). ADN circulante y su potencial clínico. *Ciencia, 64*–73.

Meyer, J. S. (1981). Growth and cell kinetic measurements in human tumors. *Pathology Annual, 16*(Pt 2), 53–81.

Morgan-Villela G., Silva-Uribe, A.M., Sat-Muñoz, D. (2008). Factores de riesgo para cáncer colorrectal. *Gamo, 12*–14.

Myklebust, A. T., Helseth, A., Breist I, K., Hall, W. A., & Fodstad, ystein. (1994). Nude rat models for human tumor metastasis to CNS: Procedures for intracarotid delivery of cancer cells and drugs. *Journal of Neuro-Oncology, 21*(3), 215–224.

Park, J., Wysocki, R. W., Amoozgar, Z., Maiorino, L., Fein, M. R., Jorns, J., Schott, A. F., Kinugasa-Katayama, Y., Lee, Y., Won, N. H., Nakasone, E. S., Hearn, S. A., Küttner, V., Qiu, J., Almeida, A. S., Perurena, N., Kessenbrock, K., Goldberg, M. S., & Egeblad, M. (2016). Cancer cells induce metastasis-

supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science Translational Medicine*, 8(361), 361ra138-361ra138.

Patutina, O., Mironova, N., Ryabchikova, E., Popova, N., Nikolin, V., Kaledin, V., Vlassov, V., & Zenkova, M. (2011). Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie*, 93(4), 689–696.

Payá Romá, A., Alenda González, C., Jover Martínez, R., & Aranda López, F. I. (2006). Carcinoma colorrectal con alteración de la vía reparadora. Claves para su identificación y relevancia clínica. *Revista española de patología: publicación oficial de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Citología*, 39(4), 201–208.

Peters, D. L., & Pretorius, P. J. (2012). Continuous adaptation through genetic communication - a putative role for cell-free DNA. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12 Suppl 1(sup1), S127-32.

Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. (2019). Liquid biopsy: General concepts. *Acta Cytologica*, 63(6), 449–455.

RD NUVERASA-PLM. (s/f). Medicamentosplm.com. Recuperado el 21 de septiembre de 2022, de https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/rd_nuverasa_solución/106/101/53961/146.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), 659–661.

Rivera, R S., Calderillo, R G., Quintana, Q M.(2017). *Oncología General para profesionales de la salud de primer contacto*. 1st ed. Ciudad de México: Permanyer México.

Rosner, K. (2011). DNase1: a new personalized therapy for cancer? *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(7), 981–984.

Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441–442.

Shklyayeva, O. A., Mironova, N. L., Malkova, E. M., Taranov, O. S., Ryabchikova, E. I., Zenkova, M. A., & Vlasov, V. V. (2008). Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I. *Doklady. Biochemistry and Biophysics*, 420(1), 108–111.

Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., & Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5), 318–322.

Sugihara, S., Yamamoto, T., Tanaka, H., Kambara, T., Hiraoka, T., & Miyauchi, Y. (1993). Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice. *British Journal of Cancer*, 67(1), 66–70.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.

Suri, R. (2005). The use of human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of cystic fibrosis. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 19(3), 135–144.

Tamkovich, S. N., Cherepanova, A. V., Kolesnikova, E. V., Rykova, E. Y., Pyshnyi, D. V., Vlassov, V. V., & Laktionov, P. P. (2006). Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 191–196.

Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., & Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation*, 45(11), 1732–1740.

Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P., & Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Reviews*, 35(3), 347–376.

Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Gutiérrez-Díaz, B., De La Cruz-Sigüenza, D., Taja-Chayeb, L., González-Ballesteros, M., García-López, P., Chanona, J., & Dueñas-González, A. (2016). Antitumor effects of systemic DNase I and proteases in an in vivo model. *Integrative Cancer Therapies*, 15(4), NP35–NP43.

Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Taja-Chayeb, L., Anker, P., Herrera-Goepfert, R., Medina-Velázquez, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Pérez-Montiel, D., Chávez-Blanco, A., Cruz-Velázquez, J., Díaz-Chávez, J., Gaxiola, M., & Dueñas-González, A. (2012). Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PloS One*, 7(12), e52754.

Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., & Stroun, M. (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), 774–779.

Vellard, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 444–450.

Wagener, J. S., & Kupfer, O. (2012). Dornase alfa (Pulmozyme). *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 18(6), 609–614.

Wen, F., Shen, A., Choi, A., Gerner, E. W., & Shi, J. (2013). Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis. *Cancer Research*, 73(14), 4256–4266.

Xia, Y., He, J., Zhang, H., Wang, H., Tetz, G., Maguire, C. A., Wang, Y., Onuma, A., Genkin, D., Tetz, V., Stepanov, A., Terekhov, S., Ukrainskaya, V., Huang, H., & Tsung, A. (2020). AAV-mediated gene transfer of DNase I in the liver of mice with colorectal cancer reduces liver metastasis and restores local innate and adaptive immune response. *Molecular Oncology*, *14*(11), 2920–2935.