



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL DNA EN
CIRCULACIÓN Y SU PARTICIPACIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN C. DESIREE ARIADNA DE LA CRUZ SIGÜENZA

DIRECTOR DE TESIS
DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA
Facultad de Medicina, UNAM

DR. MARCO VELASCO VELAZQUEZ
Facultad de Medicina, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. DICIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud. México.

Durante la realización de este trabajo la alumna Desiree Ariadna De La Cruz Sigüenza fue becaria del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) con número de registro 434561.

Agradecimientos

Agradezco a los miembros del jurado

- **Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal**
- **Dr. Juan Miranda Rios**
- **Dra. Leticia Rocha Zavaleta**
- **Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo**

A mi director de tesis,

Dr. Alfonso Dueñas González, por haberme brindado la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación y brindarme la confianza para realizar dicho proyecto.

A mi comité tutor,

Dr. Juan Pablo Reyes y al Dr. Marco Velasco, por sus consejos y gran apoyo académico.

A la Dra. Yolanda Chirino

Por el apoyo brindado durante el proceso de titulación.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Cancerología.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico de forma muy especial a mi padre, quien me enseñó a disfrutar de la vida brindándome todo su amor y cariño, viejito un gran abrazo hasta el cielo.

A mi madre, quien me ha impulsado en cada logro y a quien debo la persona que soy.

A Jesús, mi esposo, quien ha sido mi cómplice, mi consejero y mi refugio en los momentos más complicados, gracias por la paciencia durante este proceso.

Y a Jesucito, mi hijo, el mejor regalo que Dios me pudo brindar.

Quiero Agradecer de forma muy especial a la Dra Catalina Trejo Becerril y al Dr. Enrique Pérez Cárdenas, ya que fueron parte muy importante durante mi formación académica, muchas gracias por el tiempo brindado, su guía y consejos. Fueron unos grandes tutores.

A la Dra. Lucy Taja, por sus enseñanzas dentro del laboratorio.

A las Dras. Alma Chávez y Lupita Domínguez, por la paciencia que nos tienen a los estudiantes dentro del laboratorio, de verdad, mil gracias por el soporte en momentos complejos.

Al Dr. Joaquín Manzo, por sus consejos, el tiempo dedicado y por su gran apoyo académico en momentos de confusión.

A la Dra. Adri Romo, por el gran apoyo durante la pandemia.

Al Dr. José Correa Basurto, del IPN, por el apoyo con el espectrómetro de masas.

Al Dr. Sergio Román del INMEGEN, por el tiempo dedicado a la enseñanza sobre proteómica.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, aunque ya no nos vemos tan seguido, los llevo en el corazón, gracias por haber hecho un buen ambiente de trabajo.

A mi gran amiga y hermana, Odette Lira, gracias por seguir a mi lado y apoyarme a través del tiempo.

Índice

| | |
|--|--------------------|
| <i>Índice de Figuras</i> | <i>viii</i> |
| <i>Índice de tablas</i> | <i>ix</i> |
| <i>Lista de Abreviaturas</i> | <i>x</i> |
| <i>Resumen</i> | <i>xi</i> |
| | |
| <i>Marco teórico</i> | <i>1</i> |
| Definición del Concepto de DNA Circulante | <i>2</i> |
| Origen del DNA extracelular | <i>3</i> |
| Liberación Activa | <i>7</i> |
| Capacidad de transformación del DNAex | <i>10</i> |
| Importancia de las proteínas asociadas al DNAc | <i>12</i> |
| <i>Antecedentes</i> | <i>14</i> |
| <i>Hipótesis</i> | <i>16</i> |
| <i>Objetivo General</i> | <i>17</i> |
| <i>Objetivos Específicos</i> | <i>17</i> |
| <i>Material y Métodos</i> | <i>18</i> |
| Material biológico | <i>18</i> |

| | |
|--|-----------|
| Condiciones de cultivo celular | 18 |
| Separación y caracterización de estructuras que contienen DNA..... | 19 |
| Western blot de proteínas asociadas a vesículas | 20 |
| Purificación y cuantificación de DNA | 21 |
| Microscopía electrónica de transmisión | 22 |
| Exposición de las fracciones obtenidas a células no tumorigénicas (Transfección pasiva)..... | 23 |
| Detección por PCR de la mutación <i>K-RAS</i> humana..... | 27 |
| Microscopía de fluorescencia..... | 28 |
| Viabilidad celular | 28 |
| Citometría de flujo | 29 |
| Análisis Estadístico..... | 29 |
| Identificación de proteínas por MS/MS..... | 30 |
| Digestión de proteínas..... | 30 |
| LC MS/MS | 30 |
| Resultados | 32 |
| El DNA extracelular se encuentra en vesículas, así como en forma libre de vesículas en una conformación semejante a fragmentos de cromosomas. | 32 |
| El DNA presente en fsDNA es el que transforma a las células NIH3T3..... | 34 |
| El DNA libre de vesículas está asociado con Proteínas..... | 43 |

| | |
|---|----|
| El DNA libre de vesículas (fsDNA) se introduce en las células NIH3T3..... | 45 |
| El DNA extra vesicular (fsDNA) que proviene de las células de SW480 reduce la apoptosis de los fibroblastos NIH3T3 y aumenta el porcentaje de células que se encuentran en síntesis. | 48 |
| Identificación de proteínas por Expectrometría de Masas de la fracción FsDNA.. | 50 |
| <i>Discusión</i> | 53 |
| <i>Conclusión</i> | 60 |
| <i>Bibliografía</i> | 61 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema general de la metodología empleada en la separación y caracterización de estructuras extracelulares que contienen DNA. | 20 |
| Figura 2. Esquema general de la metodología empleada en el modelo de transfección pasiva y de los ensayos de transformación celular..... | 26 |
| Figura 3. Identificación de proteínas asociadas a la formación de vesículas extracelulares. | 33 |
| Figura 4. Microscopía electrónica de las dos fracciones extracelulares. | 34 |
| Figura 5. Formación de focos en el cultivo de las células murinas NIH3T3..... | 36 |
| Figura 6. Amplificación de la secuencia KRAS en el DNA genómico de las células NIH3T3..... | 37 |
| Figura 7. Colonias formadas en Agar blando. | 39 |
| Figura 8. Amplificación de la secuencia KRAS en el DNA genómico de las colonias formadas por las células NIH3T3..... | 40 |
| Figura 9. Formación de tumores en ratones NSG. | 42 |
| Figura 10. Formación de focos en el cultivo de las células murinas NIH3T3 expuestas a fsDNA tras el tratamiento enzimático..... | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Células NIH3T3 expuestas al fsDNA de SW480 teñido con Picogreen. | 46 |
| Figura 12. Células NIH3T3 expuestas a la fracción fsDNA de SW480 tratado con proteínasa k y DNasa I..... | 47 |
| Figura 13. Proliferación de las células NIH3T3 expuestas a las diferentes fracciones del Medio condicionado de la línea celular SW480..... | 49 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Condiciones de gradiente para la separación de los péptidos..... | 31 |
| Tabla 2. Grupos de animales para el ensayo de crecimiento tumoral in vivo..... | 40 |
| Tabla 3. Proteínas identificadas por Espectrometría de Masas de la fracción fsDNA | 50 |

Lista de Abreviaturas

ACN: Acetonitrilo

AF: Ácido fórmico

DNAc: DNA circulante

DNA_{ds}: DNA de doble cadena

DNA_{ex}: DNA extracelular

fsDNA: fracción soluble de DNA_{ex}

evDNA: Fracción vesicular de DNA_{ex}

EVs: Vesículas extracelulares

lncRNA: RNA largo no codificante

miRNAs : micro RNA

mRNA: RNAmensajero

ncRNA: RNA no codificante

SFB: suero fetal bovino

Resumen

El DNA Extracelular (DNAex), es una fuente utilizada para la obtención de biopsia líquida, utilizada frecuentemente para el diagnóstico del cáncer, la selección de la terapia y el seguimiento de la enfermedad, debido a su naturaleza no invasiva y la facilidad de su obtención. Sin embargo, el DNAex también participa en el desarrollo y progresión del cáncer por la transferencia horizontal de información genética. En humanos, el exDNA circula formando complejos con vesículas extracelulares (EVs) y complejos macromoleculares como nucleosomas, otros lípidos y proteínas séricas. En este proyecto queríamos demostrar si el DNAex no asociado a EVs induce la transformación celular y la tumorigénesis. Para ello se utilizó el sobrenadante de la línea celular de cáncer de colon humano SW480 se procesó por ultracentrifugación para obtener dos fracciones: una fracción soluble (fsDNA) independiente a EVs y una fracción asociada enriquecida con EVs (evDNA). Las células primarias de fibroblastos embrionarios murinos (NIH3T3) se sometieron a transfección pasiva con estas fracciones y se realizaron ensayos de proliferación celular, ciclo celular, apoptosis, transformación celular y ensayos tumorigénicos. Se confirmó la transferencia horizontal de información genética, buscando por PCR de punto final el gen K-Ras humano mutado en células receptoras (células NIH3T3, fibroblastos inmortalizados de ratón) Así mismo, se observó la internalización de células receptoras mediante microscopía de fluorescencia. Se hizo un ensayo piloto de LC-MS/MS, para identificar la identidad de proteínas que acompañan a la

fracción transformante. Los resultados mostraron que el fsDNA pero no el evDNA induce efectos proliferativos y anti-apoptóticos, dichos efectos, fueron contrarrestados por la digestión con DNasa I y proteinasa K. Estos efectos se asociaron con la transferencia horizontal de DNA y la internalización de DNAex en células receptoras. Nuestros resultados respaldan los efectos pro-tumorales del DNAex en la fracción soluble (fsDNA) que pueden compensarse con el tratamiento enzimático. Dentro de las proteínas identificadas por MS/MS se encontraron dedos de zinc, factores de transcripción y remodeladores de la cromatina.

Se necesita una mayor exploración para determinar si su manipulación podría tener un papel en la terapia del cáncer.

Marco teórico

En los individuos normales existe DNA en el espacio extracelular, circulando por el torrente sanguíneo, a este DNA extracelular, se le ha denominado DNA circulante (DNAC), se ha observado que las concentraciones del DNAC en el plasma de donadores sanos es de 1.6-23.7 ng/ml(Breitbach et al., 2014) (Meddeb et al., 2019), mientras que en pacientes con distintas patologías tales como, lupus eritematoso, enfermedades cardiacas, diabetes, y diferentes tipos de cáncer las concentraciones de DNAC son hasta 10 veces mayores (Goebel et al., 2005), por lo que se ha propuesto que el DNAC puede ser un marcador del estado de salud de pacientes (Xu et al., 2018).

En el caso de pacientes con cáncer, el DNAC es utilizado como un biomarcador ya que se han identificado mutaciones, metilaciones (Skvortsova et al., 2010) y alteraciones en microsatélites; así mismo, se ha logrado monitorear la progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Cheng et al., 2009)(Aarthy et al., 2015).

Si bien varias aplicaciones clínicas, especialmente en oncología, están en progreso, la determinación de las características estructurales del DNAC aún se está investigando.

Definición del Concepto de DNA Circulante

La primera observación documentada de la existencia de DNA circulante en humano se reportó en 1948 por los investigadores Mendel y Métais, estos investigadores encontraron ácidos nucleicos en muestras de suero provenientes de pacientes con cáncer (MANDEL & METAIS, 1948). En las dos décadas posteriores, los ácidos nucleicos se encontraron en el medio extracelular de todos los reinos donde fueran buscados (Leon et al., 1977).

Maurice Stroun y Philippe Anker reconocieron que el DNAC aislado de pacientes con diversas neoplasias malignas provenía del tumor, proponiendo que esta molécula a podría actuar como un biomarcador potencial para el cáncer (Philippe Anker et al., 1999),

En 2016, Thierry y colaboradores discutieron en su revisión "Orígenes, estructuras y funciones del DNA circulante en oncología" el significado conceptual sobre los ácidos nucleicos extracelulares. Estos autores concluyeron que el término "DNA extracelular" se refiere tanto al DNA nuclear como al DNA mitocondrial liberado de la célula (Thierry et al., 2016). Es decir, todo el DNA que se encuentra en el medio extracelular fisiológico, como lo son, la sangre, linfa, bilis, leche, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico. Estas moléculas de DNA extracelular se encuentran no solo en humanos, sino también en el resto del reino animal y también

en el vegetal. Los autores también refieren que las moléculas de DNA extracelular se pueden encontrar en sobrenadantes de cultivos celulares, ya sea de líneas celulares, células primarias u organoides, independientemente de su estructura: tanto el DNA asociado a una variedad de complejos de proteínas o dentro de vesículas extracelulares, deben ser considerado como DNA extracelular (Thierry et al., 2016). De lo contrario, el término de DNA circulante se designó solo para el DNA presente en el suero o plasma de la circulación sanguínea.

Utilizaremos el término "DNAc" para describir el DNA presente en la circulación y el término "DNAex" para referirnos al DNA extracelular que se encuentra en los estudios *in vitro*.

Origen del DNA extracelular

Existe discrepancia con el tamaño y el origen del DNAc y DNAex, ya que se ha reportado que el tamaño oscila entre 500 pb y 30 Kb. Estas diferencias podrían estar asociadas con un origen distinto (Aucamp et al., 2018). Durante casi 20 años se ha considerado que la muerte celular es la principal fuente de DNAc tanto en individuos sanos como en individuos con alguna patología, teniendo en cuenta que alrededor de 50 a 70 mil millones de células mueren diariamente (Hu et al., 2021). El mecanismo por el cual el DNAc es liberado no se conoce, pero podría deberse a procesos apoptóticos o de necrosis.

Apoptosis

El proceso de apoptosis se caracteriza por múltiples alteraciones morfológicas, que incluyen reducción celular, formación de vesículas en la membrana plasmática, condensación nuclear y fragmentación del DNA internucleosómico(Elmore, 2007). Si bien las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca son detonadas por diferentes estímulos, una característica común en el proceso apoptótico implica la activación de un conjunto de caspasas que catalizan la hidrólisis de los componentes celulares. Algunas de estas caspasas desencadenan la activación de las endonucleasas, especialmente la desoxirribonucleasa activada por caspasa (CAD), que escinde la cromatina a través del DNA conector, que luego genera oligo y mononucleosomas(Elmore, 2007). Este proceso de degradación del DNA, en el que el DNA cromosómico se escinde primero en fragmentos grandes (50–300 kb), continúa con la ruptura posterior en múltiples unidades nucleosómicas (180–200 pb) (Elmore, 2007). Estos nucleosomas se empaquetan en vesículas llamadas "cuerpos apoptóticos", que luego se liberan de las células (Elmore, 2007).

Para evaluar la apoptosis como una posible fuente de cfDNA, Jahr et al. indujeron la apoptosis al tratar la línea de células T Jurkat con estaurosporina (inhibidor de la proteína quinasa), confirmando así que la cantidad de cfDNA era proporcional al grado de apoptosis. Adicionalmente observaron mediante electroforesis en gel, que el tamaño de los fragmentos de DNA era de ~180 pb, algunas veces acompañados de fragmentos de DNA de dos, tres o cuatro veces este tamaño, este patrón

concuenda con lo observado en el tamaño de DNA aislado del suero de pacientes con cáncer (Cheng et al., 2009).

Asimismo, el referido patrón en escalera de los subproductos de DNA que se muestra tras la electroforesis en gel del DNA aislado del sobrenadante de células HL-60 que corresponden a leucocitos humanos, los cuales al ser cultivado en presencia de estaurosporina (Stroun et al., 2001) y del DNA aislado del sobrenadante de la línea celular SW480 sin tratamiento (Trejo-Becerril et al., 2012). Esto evidencia que la apoptosis puede ser una de las fuentes de los fragmentos de DNA observados en la región extracelular.

Sin embargo, las células malignas suelen tener una mayor actividad antiapoptótica, por lo que varios autores han propuesto que existen otros mecanismos de liberación de DNAex responsables del aumento.

Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis se caracteriza por la pérdida desorganizada de la integridad de la membrana plasmática, que junto con el hinchamiento de organelos y células, conduce a la lisis celular(Adigun et al., 2022). La fuga de componentes intracelulares nocivos puede dañar las células vecinas e invariablemente desencadena una respuesta inflamatoria(Adigun et al., 2022).

Beyer y colaboradores demostraron en la línea celular de linfoma Jurkat, tratada con 3 ciclos de congelación para inducir la necrosis *in vitro*, que las concentraciones de DNAex aumentaron un 50 % después de la inducción de la necrosis, lo que sugiere que la necrosis puede conducir a una liberación extensa de DNAex(Beyer et al., 2012).

Para investigar la posibilidad de que el DNA plasmático se origine a partir de células necróticas, Jahr y colaboradores realizaron estudios con células necróticas (estaurosporina más oligomicina) *in vitro* y con ratones después de la inducción de lesión hepática necrótica (paracetamol). Se encontró que cantidades crecientes de DNA se liberaban en los sobrenadantes de las células (DNAex) y en las muestras de plasma sanguíneo (DNAc) de los animales tratados (Jahr, 2001). Los mismos patrones característicos de fragmentos de DNA podrían identificarse en plasma derivado de diferentes pacientes con cáncer(Jahr, 2001). Esto es consistente con la presencia de estructuras macromoleculares de DNA (21-80 kb) encontradas en plasma de donantes sanos (Meddeb et al., 2019) y de algunos pacientes con cáncer colorrectal (Mouliere et al., 2014), los datos sugieren que la muerte celular necrótica es una fuente importante de DNAc y DNAex.

Liberación Activa

Incluso sin que mueran las células, la concentración de DNA en el medio de cultivo aumenta en proporción a la proliferación de células malignas cultivadas (Morozkin et al., 2008). También se ha observado que los linfocitos humanos liberan activamente DNA de doble cadena en el medio de cultivo hasta una determinada concentración, independientemente del tiempo de incubación (Philippe Anker et al., 1975). Lo que sugiere que la apoptosis y la necrosis no son la principal fuente de DNAc/DNAex. El DNA liberado por las células vivas es una alternativa viable.

Moronzki et al han estudiado la contribución de las vías de secreción a la generación de DNAex, utilizaron los compuestos que inhiben dos vías principales de secreción de proteínas: vías clásicas (dependientes del aparato de Golgi) y no clásicas (independientes del aparato de Golgi) sobre la concentración de DNAex en los cultivos de células endoteliales de vasculatura umbilical humana (HUVEC) y células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa) (Morozkin et al., 2008). Demostraron la participación del transporte vesicular y de proteínas en la generación de DNAex (Morozkin et al., 2008).

Microvesículas y exosomas

Las células pueden comunicarse entre sí mediante la liberación de vesículas extracelulares (EV), que interactúan y modifican el comportamiento de las células objetivo en sitios cercanos o distantes. Según su origen, las EV se pueden dividir

en subgrupos de pequeñas vesículas generadas dentro de los compartimentos endosómicos y vesículas que brotan directamente de la membrana plasmática.

Todas las vesículas extracelulares exponen en su superficie varias biomoléculas como RNA, lípidos, proteínas y posiblemente DNA (Bebelmann et al., 2018). Su clasificación distingue dos subpoblaciones principales en función del origen. Primero, las vesículas más pequeñas de origen endosomal llamadas exosomas, con un tamaño de 40 – 150 nm de diámetro (Baietti et al., 2012; Colombo et al., 2013). La composición de los exosomas varía de acuerdo al tipo celular que los secreta, sin embargo, se han identificado proteínas que todos los exosomas contienen, como CD9, CD81 y CD63 (Moeinzadeh et al., 2022).

Por otro lado se encuentran las vesículas derivadas de la membrana plasmática, también conocidas como micropartículas, microvesículas o, ectosomas, con un diámetro de 100 a 1000 nm, se producen por protrusión hacia afuera o gemación de la membrana plasmática (Muralidharan-Chari et al., 2009). Los ectosomas se desprenden de la membrana plasmática durante el crecimiento, activación, proliferación, senescencia y apoptosis celular (Antwi-Baffour, 2015). Una característica común de todas las clases de vesículas es su estructura de membrana, una bicapa lipídica con la misma orientación topológica que la membrana plasmática. (Arraud et al., 2014; Trajkovic et al., 2008). La presencia de ectosomas es común en individuos sanos y un aumento en su liberación, aunque

sea un evento controlado, es un sello distintivo de una alteración (Antwi-Baffour, 2015).

Aunque el origen de las microvesículas y los exosomas es bien conocido, la discriminación experimental de este tipo de vesículas es difícil, por lo que en ocasiones se suman los términos de vesículas extracelulares (EVs).

Las EVs contienen la mayoría de las moléculas bioactivas, incluidas proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y varios tipos de ARN, incluidos ARNm, ARN largos no codificantes (ARNc), microARN (miARN), ARN de transferencia (ARNt), ARN mitocondrial. ADN (ADNmt), citocinas, receptores de factores de transcripción (Fernando et al., 2017; Gajos-Michniewicz et al., 2014; Whiteside, 2016). De tal manera que pueden inducir cambios epigenéticos, en las células receptoras (Thakur et al., 2014).

Otras estructuras macromoleculares

En el 2010, Gahan y Stroun propusieron que el DNAc estaba conformado por un complejo de DNA-RNA-lipoproteínas al cual denominaron “virtosoma”(Gahan & Stroun, 2010), la primera vez que observaron este complejo fue en el medio condicionado de linfocitos estimulados, posteriormente demostraron que existía la liberación de este DNA en diferentes tipos de células eucariotas (Gahan & Stroun, 2010; Garcia-Arranz et al., 2017).

En un estudio realizado recientemente por Cataldi, se cuantificó la composición de los virtosomas liberados por los linfocitos humanos, en este estudio se encontró que el virtosoma presente en el medio condicionado de los linfocitos contenía 3,92 % de DNA, 36,41 % de RNA, 32,21 % de fosfolípidos y 27,44 % de proteínas, estos autores sugirieron que por la baja concentración de colesterol y fosfatidil colina del complejo, no había membrana alrededor del virtosoma.(Cataldi & Viola-Magni, 2016)

Capacidad de transformación del DNAex

La metástasis es un proceso complejo, que consiste en la diseminación y colonización de células malignas desde el sitio del tumor primario hacia otros sitios del cuerpo(Hunter et al., 2008). Entre otras hipótesis para la adquisición de la capacidad metastásica, se reconoce a la transferencia horizontal de genes como un posible factor contribuyente al fenómeno metastásico, y múltiples evidencias avalan esta afirmación. De hecho, existe una extensa investigación al respecto. García-Olmo et al. ha demostrado la factibilidad biológica de la transferencia de genes, así como de la transformación celular inducida por el DNAc derivado de tumores primarios (D. García-Olmo et al., 1999; Damián García-Olmo & García-Olmo, 2001). Los autores han propuesto que el DNAc en el plasma participa en la tumorigénesis y el desarrollo de metástasis vía transfección o internalización de dicho DNA por

parte de células susceptibles, a través de un proceso llamado “genometástasis”. Otros autores han apoyado este fenómeno, utilizando diferentes modelos. En 2014, Abdouh observó que las células de la línea celular de riñón embrionario humano HEK293 que se expusieron al suero del cáncer aumentaron su capacidad proliferativa y mostraron características de las células transformadas, como la pérdida de la inhibición por contacto, el potencial de crecimiento independiente del anclaje y la formación de tumores (Abdouh et al., 2014). Sin embargo, Hamam et al. han demostrado que los fibroblastos BRCA1-KO tratados con sueros de pacientes con cáncer mostraron una mayor proliferación y sufrieron una transformación maligna, a diferencia de los fibroblastos de control que no se vieron afectados por la exposición al suero de pacientes con cáncer, lo que sugiere un posible papel de la desactivación del gen *BRCA1* en tales células para permitir el proceso tumorigénico (Hamam et al., 2016). Cabe señalar que tanto en los trabajos de Abdouh como de Hamam, si bien se empleó suero humano, se corroboró que únicamente el DNA era el responsable de la transformación celular.

Por otro lado, Trejo-Becerril et al., empleando medios condicionados enriquecidos en DNAex de adenocarcinoma de colon humano SW480 y de líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa, no solo confirmaron la hipótesis de García-Olmo et al., sino que también demostraron mediante experimentos de hibridación de Southern, que la transferencia de DNAex puede no estar limitada a unas pocas secuencias de DNA, ya que observaron que el patrón de DNA dentro de las células transformadas

era muy similar al observado en la célula donante de DNAex (Trejo-Becerril et al., 2012).

Estas evidencias indican que los virtosomas liberados por células malignas pueden transferir su DNA y modificar la biología de las células receptoras.

Importancia de las proteínas asociadas al DNAc

A pesar de la larga trayectoria en el estudio del DNAc, no se ha determinado el papel que desempeña en el organismo, tanto en condiciones normales como patológicas, se ha observado que una vez que ingresa a la célula o bien al interactuar con la superficie de las células diana, actúa como mensajero intercelular desencadenando diversas respuestas biológicas, dejando ver que la secuencia de nucleótidos no siempre está implícita en sus funciones.

Se ha descrito que el DNAc puede ser detectado por receptores situados en la membrana celular de los leucocitos (Chen et al., 2005; Thierry et al., 2016) así como por receptores de ligandos en el citoplasma celular, tales como RIG-1, AIM2, DAI, IFI16, y STING (Vanpouille-Box et al., 2018) los cuales forman parte de la familia PRR (Receptores de Reconocimiento de patrones) y que pueden reconocer DNAc como DAMP (Patrones Moleculares Asociados a Daño) (Vanpouille-Box et al., 2018). Por otro lado, se ha observado que la albúmina, tiene la capacidad de formar complejos con el DNAc y favorece su internalización en la célula mediante endocitosis (Kustanovich et al., 2019). Una vez dentro de la célula, el DNAc es

detectado por TLR-9 (receptor tipo Toll 9), el cual es conocido como un potente inductor de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-12 y TNF- α (Bhagirath et al., 2015).

Por otro lado, se ha observado, que cuando el DNAc se encuentra en forma de nucleosomas, puede formar autoanticuerpos, los cuales son blanco de HMGB1, una proteína de unión al ADN, la cual es un componente estructural que facilita el ensamblaje de complejos de nucleoproteínas. Los complejos extracelulares de HMGB1-ADN, pueden activar el sistema inmunológico a través de RAGE y TLR9(Sims et al., 2010; Tian et al., 2007).

Estas evidencias sugieren que la incorporación de DNAc en la célula y el posterior desencadenamiento de vías biológicas inflamatorias se produce debido a la acción de varias proteínas de unión al ADN, incluidas las histonas. Por lo que, la estructura en que el DNAc viaja en el torrente sanguíneo está estrechamente relacionada con sus efectos biológicos.

Antecedentes

En el 2012, en grupo de investigación de Trejo et al. Demostró en un estudio *in vivo* que al tratar el medio condicionado proveniente de la línea celular tumorigénica de cáncer de colon humano, SW480, con una mezcla de enzimas (proteínasa K + DNasa), el medio condicionado era incapaz de favorecer que las células blanco (células murinas, NIH3T3) formaran tumores en ratones Balbc nu/nu. Con estos resultados propusieron que el DNA extracelular, se encontraba protegido por proteínas y que aparentemente éstas eran importantes para favorecer el proceso de transformación celular (Trejo-Becerril et al., 2012).

En el 2015, el grupo de Mitra et al. demostraron que el DNAc aislado del suero tanto de pacientes con cáncer como de individuos sanos era incorporado por fibroblastos inmortalizados de ratón localizándose dentro del núcleo, además ellos compararon la incorporación de DNA desnudo con la incorporación de cromatina, observando que, la incorporación era significativamente más efectiva por parte de la cromatina en comparación con el DNA desnudo, proponiendo que las proteínas que están unidas al DNA favorecen la integración hacia las células blanco, posiblemente debido a la condensación del DNA y a la protección contra la degradación de la cromatina (Mitra et al., 2015).

Por otro lado, existen varias evidencias que respaldan que las EVs son las responsables de la transformación celular, ya que son una fuente importante de DNA extracelular (Fernando et al., 2017), además que se ha observado que, bajo ciertas condiciones, se incorporan dentro de las células formando agregados en las zonas perinucleares (Abdouh et al., 2017, 2019a).

Estas evidencias sugieren que independiente al complejo en el que se encuentre unido al DNA, ya sea en EVs o bien en estructuras no asociadas a EVs, el proceso de transformación celular se ve favorecido por las proteínas que se encuentran asociadas al DNA extracelular, sin embargo, se desconoce la identidad de estas proteínas, y cuál es su papel en el proceso de transformación celular.

Hipótesis

Las proteínas que se encuentran en el complejo del DNA circulante participan en la transformación celular.

Objetivo General

Identificar las proteínas asociadas al DNA extracelular y determinar su papel en la transformación celular.

Objetivos Específicos

1. Separar e identificar las estructuras extracelulares que contienen DNA:
Vesículas y DNA no asociado a vesículas.
2. Evaluar la capacidad de transformación de la fracción vesicular y de la fracción de DNA extracelular no asociado a vesículas.
3. Evaluar la participación de las proteínas asociadas al DNA en circulación en el proceso de transformación celular.
4. Identificar las proteínas asociadas al DNA extracelular que presente capacidad transformante.

Material y Métodos

Material biológico

- a) SW480 (ATCC® CCL-228, carcinoma de colon humano).
- b) NIH3T3 (ATCC® CRL-1658, fibroblastos embrionarios de ratón)
- c) Ratones NOD-SCID (machos de 12 semanas de edad)

Condiciones de cultivo celular

Como fuente de DNA extracelular se utilizó el medio condicionado de la línea celular SW480, cultivadas en botellas de cultivo de 175 cm², bajo condiciones estándar (ambiente controlado a 37°C con 5% de CO²) con medio DMEM F-12 suplementado con 10% de SFB. Cuando las células se encontraron a un 80% de confluencia, se retiró el medio, las células se lavaron 3 veces con una solución de PBS y finalmente se agregó medio fresco sin SFB, esto con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de proteínas y DNAex provenientes del SFB. Las células se incubaron en estas condiciones por 48 horas.

Por cada 2 botellas de medio de cultivo, se obtuvieron 40 ml de medio condicionado el cual se obtuvo a partir de 2×10^7 células.

Separación y caracterización de estructuras que contienen DNA

Para separar las estructuras que contienen DNA del medio extracelular, se colectó el medio condicionado sin SFB de 48 horas de la línea SW480 a partir de 2×10^7 células (40 ml), este medio se centrifugó a 400 g por 20 minutos (centrífuga Thermo, BIOFUGUE PRIMO) y filtró con una membrana de celulosa con tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore Millex, 25 mm) para eliminar restos celulares, posteriormente se ultra centrifugó a 120,000 g (ultracentrífuga Beckman, Beckman Coulter) por 120 minutos para separar vesículas extracelulares. Las vesículas se lavaron con PBS, se diluyeron en 500 μl de medio libre de SFB y se criopreservaron a -80°C hasta su uso.

Mientras que la fracción restante o fsDNA, se concentró hasta 500 μl con una celda de agitación (Amicon, celda de ultrafiltración, 8010) y un equipo de vacío de alta velocidad, utilizando un disco de ultrafiltración de celulosa con tamaño de poro de 10 kDa (Millipore) (Figura 1).

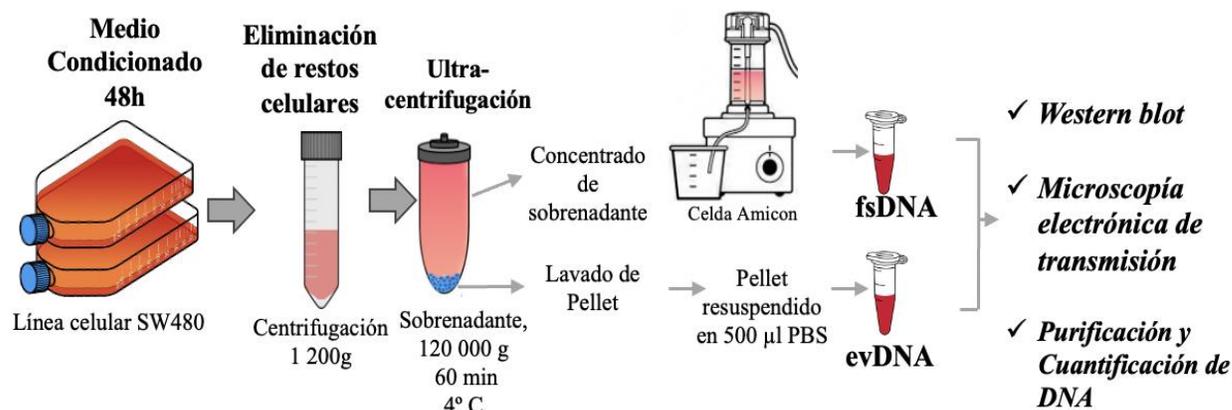


Figura 1. Esquema general de la metodología empleada en la separación y caracterización de estructuras extracelulares que contienen DNA.

Western blot de proteínas asociadas a vesículas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford en ambas fracciones ya concentradas (fsDNA y evDNA). Para hacer la identificación de proteínas se separaron 20 µg de proteína por cada fracción en un gel de poliacrilamida al 10 %. El gel se transfirió a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). La membrana se incubó durante 1 h con una solución de bloqueo (TBS/Tween-20, 5% de leche descremada) e incubado durante toda la noche con el anticuerpo primario específico en solución de bloqueo (dilución 1:1,000). Las membranas se lavaron con TBS-T, se incubaron 1 h con un anticuerpo peroxidasa secundario a una dilución de 1:1000, y revelado con sustrato de quimioluminiscencia cat. WBLUR0100 (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Los

anticuerpos utilizados fueron anti-CD81 (Santa Cruz Biotechnology, sc 166029) y anti-CD9 (Biotecnología Santa Cruz, sc 13118).

Purificación y cuantificación de DNA

La extracción del DNA se realizó con la técnica descrita por Trejo-Becerril (Trejo-Becerril et al., 2012) brevemente a partir de 500 µl de cada muestra (FS y FV) se mezcló con 500 µl de solución de SDS/proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante la noche a 55°C. Se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1 v/v), se agitó brevemente y se centrifugó a 200 g durante 10 min (Biofuge primo R, Heraeus). Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con un volumen igual de cloroformo. Se centrifugó a 800 g (Centrifuga Biofuge primo R, Heraeus) durante 5 minutos La fase acuosa se precipitó durante la noche a -20°C con 1/10 volumen de acetato de amonio 7,5 M, 1 µl de glucógeno y 2.5 volúmenes de etanol al 100 % y luego se centrifugó a 1,200 g (Biofuge primo R, Heraeus) durante 45 minutos El sedimento de DNA se lavó con etanol al 70 %, se secó al aire y se diluyó en 20 µl de agua.

El DNA total se cuantificó mediante el ensayo PicoGreen (P7589, Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Mezclamos 5 ml de reactivo PicoGreen® diluido 400 veces con buffer TE 1x con 5 ul de DNA resuspendido. Después de mezclar durante 3 min, se midió su fluorescencia en un Qubit™ 4 Fluorómetro (Número de catálogo Q33226,

Invitrogen™). Se construyeron curvas de calibración con un rango de concentraciones conocidas de solución de DNA de fago λ (Invitrogen™).

Microscopía electrónica de transmisión

Para preparar las muestras para la microscopía electrónica se utilizaron 100 µl de FsDNA y evDNA que se mezclaron con 400 µl de fijador compuesto de formaldehído al 2.5 % y glutaraldehído al 2.5 % (Electron Microscopy Sciences).

La solución fijadora se intercambió por PBS utilizando un dispositivo Amicon de 0.5 ml con un filtro de corte de 3 kDa y se concentró hasta 100 µl. Después de 45 minutos de fijación, se colocaron 7 µl de muestra sobre una rejilla recubierta de carbón y formvar de malla 200 (Electron Microscopy Sciences). la rejilla se transfirió siete veces sobre gotas de agua durante 2 minutos La tinción negativa se realizó con acetato de uranilo al 4% durante 12 minutos Las fotografías se tomaron bajo un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 equipado con una cámara digital AMT. La preparación y el análisis de las muestras se realizó por triplicado.

Exposición de las fracciones obtenidas a células no tumorigénicas (Transfección pasiva).

Para los ensayos de transformación celular, se sembraron 5×10^4 células de la línea NIH3T3 en placas de 6 pozos, con un área de cultivo de 9.5 cm^2 (Corning, Inc.) y se expusieron por separado a: medio condicionado de SW480, a la fracción de vesículas, a la fracción de DNA libre, y al medio reconstituido, el cual se obtiene de la unión de las vesículas con la fracción de DNA libre. Las células murinas NIH3T3 se expusieron por 30 días, con cambios de medio fresco cada 24 horas en proporción 1:1 con medio de cultivo DMEM con 4% de SFB y las diferentes fracciones (obtenido de 40ml de medio condicionado a partir de 2×10^7 células).

Los cultivos expuestos se revisaron diariamente para evaluar cambios morfológicos y de comportamiento en el cultivo celular, característicos de transformación maligna tales como la inhibición del crecimiento por contacto con la formación de focos; Crecimiento independiente al anclaje con el crecimiento de células sobre agar suave y la formación de tumores en ratones inmunocomprometidos (Figura 2).

Formación de focos. Durante el ensayo de transfección pasiva las células NIH3T3 expuestas a las diferentes fracciones del sobrenadante, fueron examinadas diariamente al microscopio de contraste de fase y cualquier alteración morfológica fue documentada fotográficamente. Las células se expusieron durante 28 días, se contabilizó el número de focos formados en los cultivos expuestos a las diferentes

condiciones. Los focos formados se extrajeron, disgregaron con tripsina-EDTA y se cultivaron en condiciones estándar. Para determinar que hubo transferencia del DNA del sobrenadante de las células humanas SW480 hacia las células murinas NIH3T3, se buscó por PCR la presencia de la mutación del codón 12 de K-rasV12. Y aquellos cultivos que resultaron positivos para K-rasV12, fueron utilizados para los ensayos de crecimiento en agar.

Crecimiento de células en agar blando. Las células que se recuperaron del ensayo anterior, se homogenizaron en una solución de medio DMEM que contenía 0.3% de agar noble y 15% de SFB. Una capa de esta suspensión, se virtió sobre una capa de medio DMEM que contenía 0.7% de agar sin suero. Las células se sembraron a una densidad de 1.2×10^4 células en placas de 6 pozos , con una superficie de siembre de 9.5 cm^2 (Corning, Inc).

Las placas fueron revisadas diariamente y se contabilizó el número de colonias después de los 15 días que duró el ensayo. Cada una de las colonias obtenidas de los ensayos de crecimiento en agar, se disgregaron con Tripsina-EDTA, se cultivaron y propagaron en condiciones estándar. Este ensayo se realizó por triplicado en dos experimentos independientes (se definió como colonia, agregados celulares que contenía por lo menos 50 células). Finalmente, se buscó por PCR la presencia de la mutación del codón 12 de K-rasV12.

Potencial tumorigénico. Se realizaron ensayos *in vivo* en ratones machos inmunodeficientes de la cepa NOD-SCID de 12 semanas de edad (Bioterio, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), a los que se les inyectaron las células por vía subdérmica con 1×10^6 de células por flanco (2×10^6 células por individuo). Los animales se dividieron en 5 grupos: el primer grupo formado por ratones inyectados con células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de SW480 (n=8), un segundo grupo con células NIH3T3 expuestas a la fsDNA (n=8), un tercer grupo con células NIH3T3 expuestas al medio reconstituido (n=8), como control negativo se inocularon a las células NIH3T3 cultivadas en condiciones estándar (n=8) y finalmente como control positivo las células SW480 (n=4). El crecimiento tumoral se registró semanalmente con un vernier electrónico por 91 días, calculando el volumen tumoral con la siguiente fórmula: $VM = (\text{diámetro mayor}) (\text{diámetro menor})^2 (\pi/6)$. Los ratones fueron sacrificados y los tumores se procesaron para realizar un análisis histológico. Todos los procedimientos de animales se realizaron bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

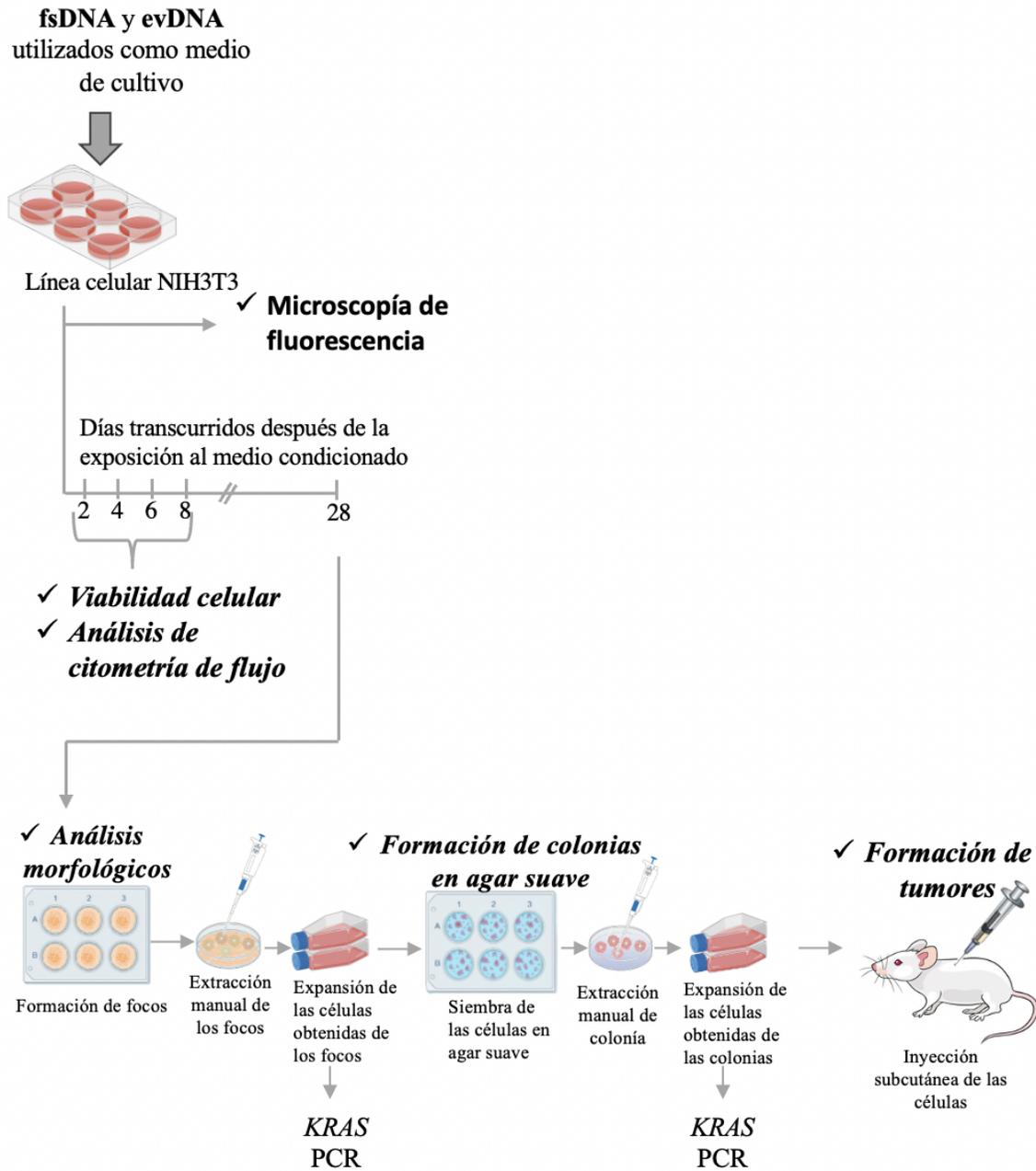


Figura 2. Esquema general de la metodología empleada en el modelo de transfección pasiva y de los ensayos de transformación celular.

Detección por PCR de la mutación *K-RAS* humana

Para demostrar la transferencia de secuencias humanas hacia las células NIH3T3, se evaluó por PCR la presencia de la mutación del codón 12 de K-rasV₁₂ humano. La reacción se realizó con 100 ng de DNA genómico en 20 µl de la siguiente mezcla: 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmol/L de KCl, 2 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de los primers (5'-gactgaatataaacttggtagt-3' y 3'-ggacgaatatgatccaacaatag-5'). La desnaturalización inicial (5 minutos a 94°C) fue seguida por 40 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C, y 30 segundos a 72°C) y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). El resultado es un amplicón de 107 pb el cual se verificó por electroforesis en un gel al 2% de agarosa.

En el caso de los focos, la PCR se realizó de las células que fueron propagadas a partir de los focos formados después de los 28 días de exposición. Mientras que la PCR de las colonias se realizó a partir de las células propagadas a partir de las colonias que se extrajeron del ensayo en agar.

Microscopía de fluorescencia

Para marcar el fsDNA, se usaron 500 µl de la fracción fsDNA, a la cual se le agregó el colorante Quant-iT PicoGreen (en una proporción 1:200 con respecto al stock de Quant-iT PicoGreen; invitrogen) y se incubó 30 minutos a 37°C.

La fracción previamente marcada se agregó a las células NIH3T3 en una proporción 1:1 con medio de cultivo DMEM al 10% de SFB (90 000 células sobre un cubre objetos de 25 mm). Las células se incubaron en tiempos crecientes hasta los 90 minutos. Una vez que se cumplió con el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS, se fijaron en una solución al 4% de paraformaldehído y se procesaron para ser observadas bajo el microscopio confocal (Zeiss LSM 710 DUO, Oberkochen, Germany), se colectaron las imágenes de tres experimentos independientes.

Viabilidad celular

Para evaluar la proliferación celular de las células NIH3T3, éstas se sembraron en placas de 6 pozos, (Corning, Inc.) a una densidad de 5×10^4 por cada 9.5 cm². Las células se trataron con las fracciones del medio condicionado de SW480 (fsDNA y evDNA) tal y como se describió anteriormente. Después de 2, 4, 6 y 8 días, las células

se tiñeron con azul tripano al 0.4% y se cuantificaron en un contador automático de células (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Todos los ensayos, se realizaron por triplicado.

Citometría de flujo

Para realizar el análisis del ciclo celular, las células NIH3T3 se sembraron en placas de 6 pozos (Corning, Inc.) a una densidad de 5×10^4 células por cada 9.5 cm^2 de superficie, Las células se trataron con las diferentes fracciones del medio condicionado de SW480 tal y como se describió anteriormente (fsDNA y evDNA). Después de 2,4,6 y 8 días, se recolectaron las células y se tiñeron con yoduro de propidio por una hora (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). Se analizaron 20,000 células por muestra utilizando el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). El análisis de ciclo celular se realizó con el software ModFit LT v2.0 (Verity Software House, Inc.).

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad (versión 8.4.2). Los datos están representados con la media \pm la desviación estándar. Las diferencias se analizaron utilizando la prueba *t* de Student para muestras no apareadas. Mientras

que para comparaciones múltiples se utilizó ANOVA. Se consideró una $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Identificación de proteínas por MS/MS

Digestión de proteínas

Se tomaron 100 μg de proteína de la fracción fsDNA, los cuales se precipitaron con 9 volúmenes de etanol frío a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche. El sedimento se lavó 3 veces con etanol frío al 90%. Las proteínas precipitadas se solubilizaron en buffer de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5 %, bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 0,1 M, pH 8,0. Para la digestión de las proteínas se añadió tripsina en proporción 1:50 (enzima-sustrato), y las muestras se incubaron durante 16 horas a 37°C . El SDS se eliminó mediante extracción con acetato de etilo en condiciones ácidas (se añadió 1 volumen de acetato de etilo a la muestra y se acidificó con ácido trifluoroacético al 0,5 %). Después de agitar con vórtex y centrifugar, se descartó la fase orgánica y se realizó una extracción adicional con acetato de etilo. Finalmente, la mezcla de péptidos se desaló por cromatografía de fase inversa mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore).

LC MS/MS

La separación de los péptidos se realizó en una columna 300SB-C18, 2.1 X 50 mm, 3.5 μM (Agilent Technologies), a 300 nl /min, usando un gradiente lineal. Como fase

movil A, se utilizó agua con 0.1 % de AF(v/v) y como fase móvil B, ACN con 0.1% de AF. Las condiciones del gradiente fueron las descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de gradiente para la separación de los péptidos

| Minuto | A | B |
|---------------|----------|----------|
| 60 | 70% | 30% |
| 180 | 10% | 90% |
| 190 | 10% | 90% |

Los péptidos eluidos de la columna de cromatografía se introdujeron en un espectrómetro de masas QTOF 6545 (Agilent Technologies) con una fuente de ionización con electrospray (ESI).

Los datos provenientes de la espectrometría de masas, se procesaron en el software TPP (Trans Proteomic pipeline, Seattle Proteome Center). (Keller & Shteynberg, 2011). Para la identificación de proteínas, se utilizó la base de datos del proteoma humano de referencia UP000005640 del repositorio de Uniprot, descargado en abril del 2019. Se consideraron a las proteínas con al menos dos péptidos exclusivos y 80% de probabilidad de identidad.

Resultados

El DNA extracelular se encuentra en vesículas, así como en forma libre de vesículas en una conformación semejante a fragmentos de cromosomas.

Una vez obtenido el medio condicionado de la línea SW480, éste se sometió a una ultra centrifugación para separar dos fracciones celulares; una enriquecida con vesículas extracelulares (evDNA) y una fracción que quedó soluble después de la ultra centrifugación, que se consideró como fracción libre de vesículas (fsDNA)

Para demostrar que la separación física del medio condicionado se realizó de forma adecuada, se verificó la ausencia de marcadores de EVs en la fracción fsDNA, mediante un western blot dirigido a proteínas que se encuentran involucradas en la formación de vesículas extracelulares CD9 y CD81.

Cómo se puede observar en la **Figura 3 A**, en la fracción evDNA se identificó una banda muy intensa cerca de los 20 kDa la cual corresponde al peso molecular de CD9, así mismo se observó otra banda cerca de los 25kDa la cual corresponde al peso molecular de CD81. De forma contrastante, en la fracción de fsDNA no se observaron bandas que indicaran una señal positiva de estos marcadores.

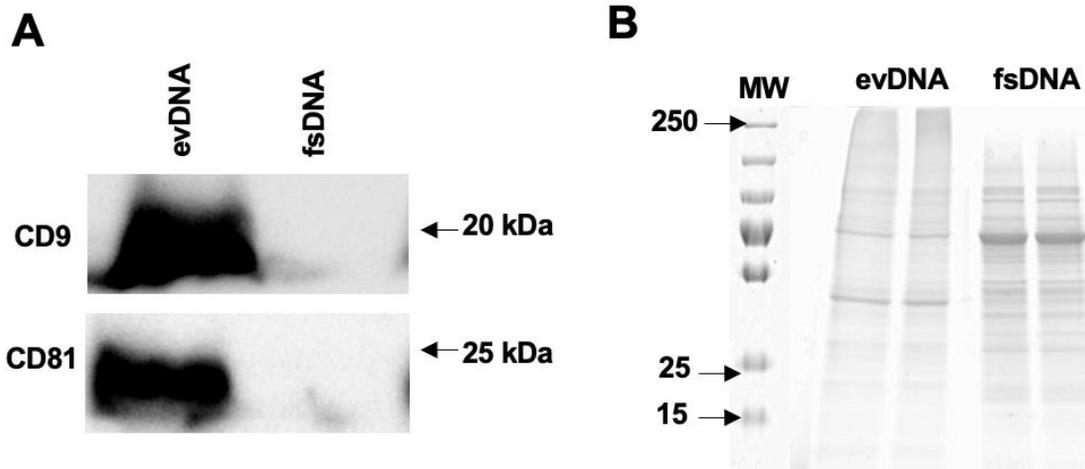


Figura 3. Identificación de proteínas asociadas a la formación de vesículas extracelulares. A. Western blot de las fracciones extracelulares evDNA y fsDNA con anticuerpos anti-CD9 y anti CD81. B. Gel SDS-PAGE utilizado como control de carga.

Se purificó y cuantificó el DNA, obtenido en las dos fracciones celulares, y se encontró mayor cantidad de DNA en evDNA ($18.76\text{ng} \pm 7.7 \text{ SD}$) en comparación con la fracción fsDNA ($3.63\text{ng} \pm 1.4 \text{ SD}$).

Para visualizar la estructura de las fracciones separadas (fsDNA y evDNA), las fracciones se procesaron para ser observadas por microscopía electrónica de transmisión. En la fracción de evDNA, se observaron cuerpos redondos con una medida de 30 a 100 nm de diámetro (**Figura 4A**), lo que corresponde con el tamaño de los exosomas. Así mismo, en la fracción de fsDNA (**Figura 4B**), se observaron estructuras que asemejan a fibras de DNA, semejantes a nucleosomas y fragmentos de cromosomas.

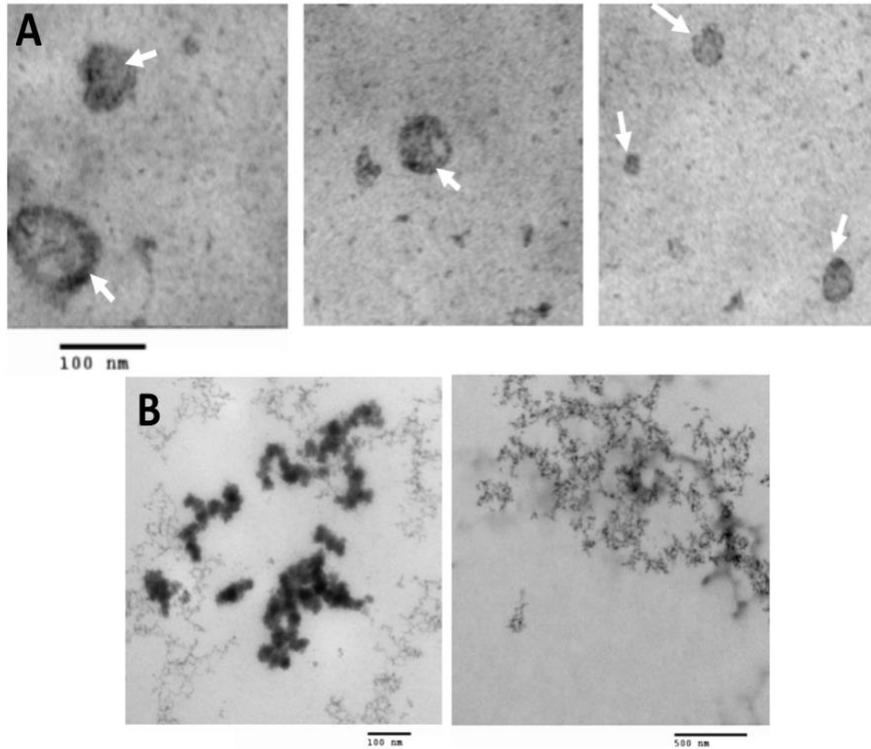


Figura 4. Microscopía electrónica de las dos fracciones extracelulares. A, micrografías de la fracción evDNA; B, micrografías de fracción fsDNA

El DNA presente en fsDNA es el que transforma a las células NIH3T3.

Se demostró que la mayor cantidad de DNA, se encuentra contenido en las vesículas extracelulares (evDNA); sin embargo, también se demostró que, aunque en menor cantidad, hay DNA en la fracción fsDNA.

Para determinar qué fracción de DNA era capaz de transferirse horizontalmente, además de ser el causante de la transformación celular, ambas fracciones aisladas

se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de transfección pasiva exponiendo cada una de ellas, a los fibroblastos inmortalizados de ratón (células NIH3T3). Además, se incluyeron como controles, medio condicionado de SW480 y medio reconstituido (evDNA + fsDNA). Se evaluó la transformación celular por cambios morfológicos (formación de focos), crecimiento independiente al anclaje (formación de colonias en agar blando) y la capacidad de generar tumores (crecimiento tumoral *in vivo*).

Con la formación de focos se analizó la pérdida de inhibición por contacto de las células, lo que da como resultado que estas dejen de crecer en mono capa y se aglomeren formando estructuras las cuales reciben el nombre de focos (**Figura 5**). Los focos resultantes se contabilizaron a los 28 días de exposición, y no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el número de focos generados por las células expuestas al medio condicionado de SW480 (10 ± 1 SD), las células expuestas al fsDNA (11 ± 3 SD); y las células expuestas al medio reconstituido (10 ± 3 SD). Por otro lado, cabe destacar que al igual que el control negativo, no hubo formación de focos en el cultivo de las células NIH3T3 expuestas a las evDNA.

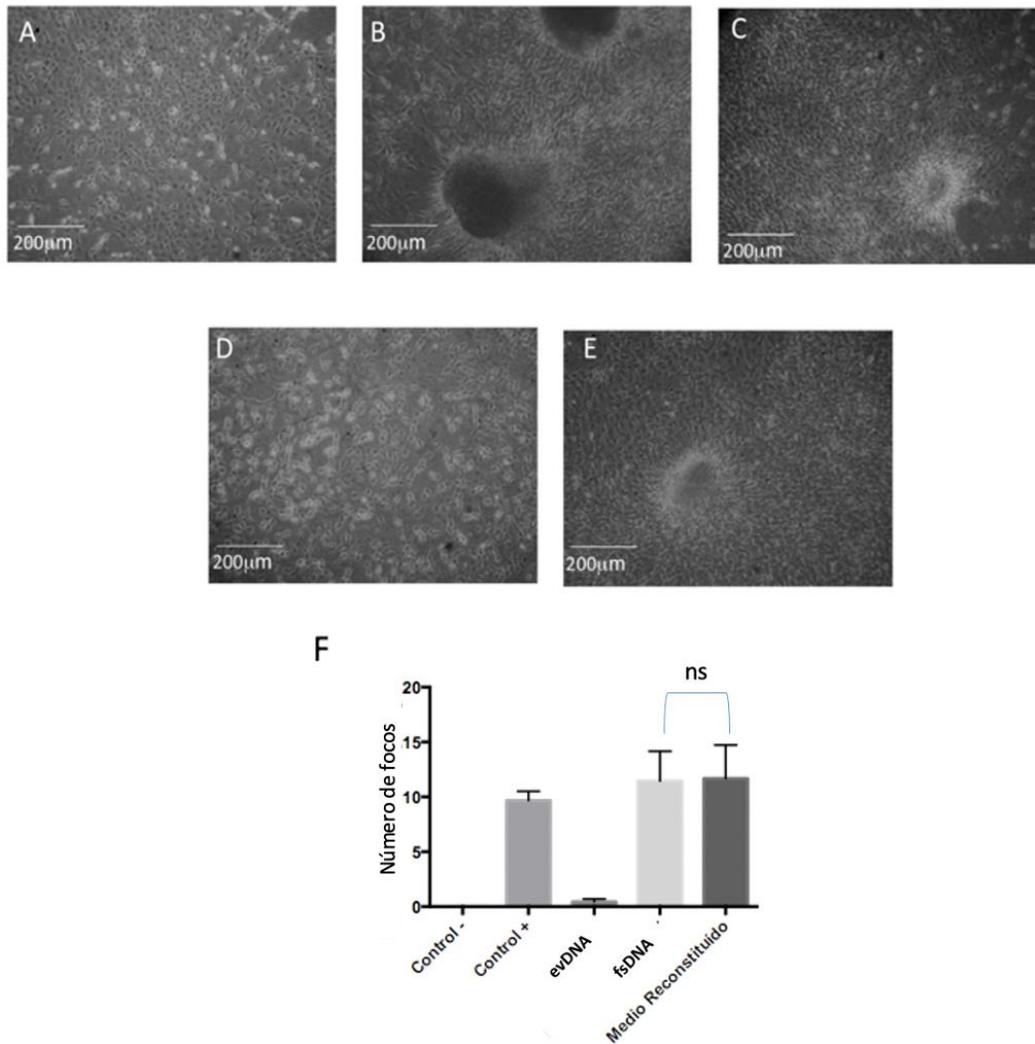


Figura 5. Formación de focos en el cultivo de las células murinas NIH3T3. A, cultivo de células NIH3T3 cultivadas en condiciones estándar sin exponer; B, cultivo de células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de SW480; C, células NIH3T3 expuestas a la fracción fsDNA; D, cultivo de células NIH3T3 expuestas a evDNA de la línea celular SW480; E, células NIH3T3 expuestas al medio condicionado reconstituido de la línea celular SW480; F, Promedio del número de focos formados por las células NIH3T3 expuestas a las diferentes condiciones. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado

Para demostrar la transferencia horizontal de información genética, se purificó el DNA genómico (intracelular) de las células NIH3T3 expuestas a las diferentes condiciones antes mencionadas y se buscó por PCR en punto final, un marcador genético de la línea celular SW480, la mutación de *KRAS*.

Como se observa en la **Figura 6**, las células murinas que fueron expuestas a evDNA no dieron una señal positiva para la secuencia de *KRAS* humano; mientras que las células que fueron expuestas al fsDNA, mostraron una señal positiva para la secuencia de *KRAS* humano, al igual que las células que fueron expuestas al medio condicionado de SW480 y al medio reconstituido que se utilizaron como controles; éstos resultados evidencian que el DNA independiente a las vesículas (FsDNA) es el que se transfiere horizontalmente.

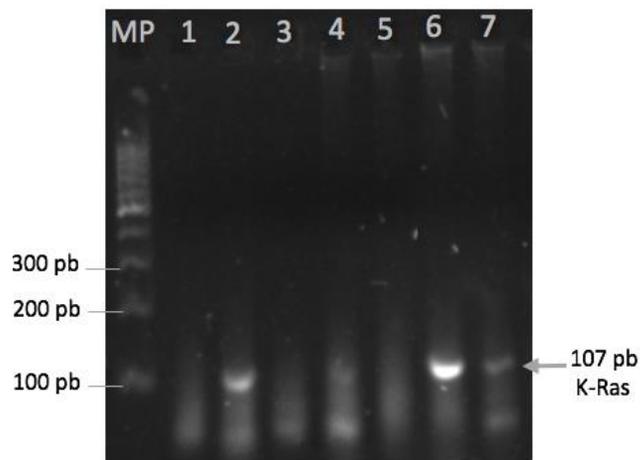


Figura 6. Amplificación de la secuencia *KRAS* en el DNA genómico de las células NIH3T3. Gel de Agarosa al 2%. 1, control negativo, agua; 2, control positivo, DNA genómico de la línea celular humana SW480; 3, control negativo, DNA genómico de la línea celular murina NIH3T3 sin exponer; 4, DNA genómico de las células NIH3T3 expuestas a fsDNA; 5, DNA genómico de células NIH3T3

expuestas a evDNA; 6, DNA genómico de células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de la línea celular SW480; 7, DNA genómico de células NIH3T3 expuestas al medio reconstituido.

Para evaluar la capacidad de crecimiento independiente del anclaje, se llevaron a cabo los ensayos en agar blando. Cuando las células son capaces de proliferar bajo estas condiciones, forman estructuras esféricas las cuales se conocen como colonias (**Figura 7**). Para ello, se aislaron los focos anteriormente obtenidos; se disgregaron y las células resultantes se sembraron en el agar suave. A los 21 días de realizada la siembra, se contó el número de colonias formadas por condición experimental y los resultados se muestran en la Figura 7E. Como se puede observar en los ensayos control, no se encontró diferencias entre el número de colonias formadas por las células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de SW480 (36 ± 3) y las células expuestas al medio reconstituido (37 ± 4). De forma interesante, el número de colonias formadas por las células NIH3T3 expuestas sólo a la fsDNA, disminuye casi a la mitad (17 ± 4), aunque es evidente la formación de las mismas. Cabe señalar que no se obtuvieron focos celulares para realizar esta prueba de transformación a partir de los fibroblastos expuestos a las evDNA.

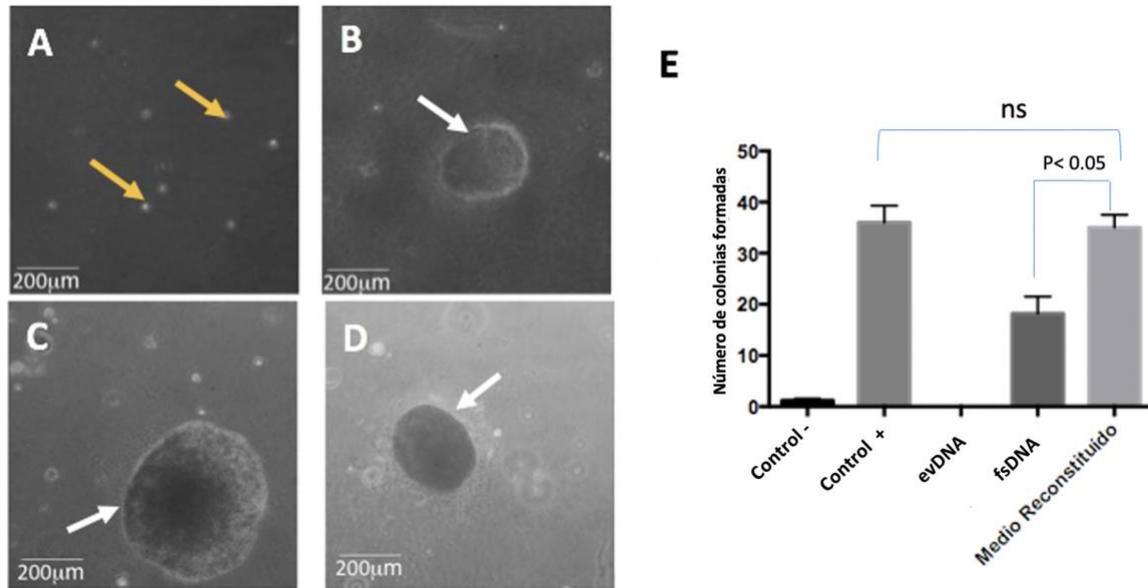


Figura 7. Colonias formadas en Agar blando. A, Células NIH3T3 cultivadas en condiciones estándar sin exponer; B, cultivo de células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de SW480; C, células NIH3T3 expuestas a la fracción fsDNA; D, células NIH3T3 expuestas al medio condicionado reconstituido de la línea celular SW480; E, promedio del número de colonias formadas por las células NIH3T3 expuestas a las diferentes condiciones. Se realizaron 2 experimentos independientes por triplicado.

De las colonias generadas de los experimentos anteriores, se tomaron 5 colonias al azar, por condición experimental y se verificó por PCR que fueran positivas para la secuencia de *KRAS* humano (figura 8).

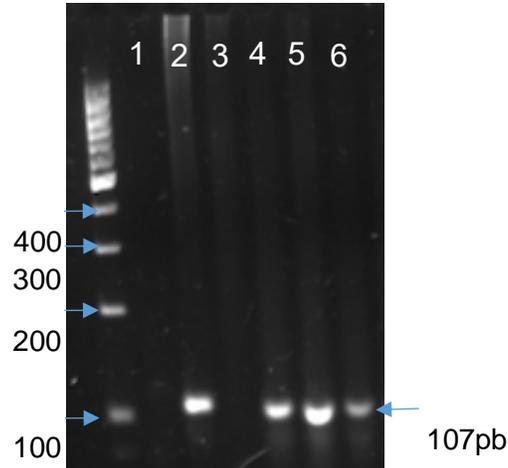


Figura 8. Amplificación de la secuencia KRAS en el DNA genómico de las colonias formadas por las células NIH3T3. Gel de Agarosa al 2%. 1, Control negativo, agua; 2, control positivo, DNA genómico de la línea celular humana SW480; 3, control negativo, DNA genómico de la línea celular murina NIH3T3 sin exponer; 4, DNA genómico de las células NIH3T3 expuestas la fracción de fsDNA; 5, DNA genómico de células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de la línea celular SW480; 6, DNA genómico de células NIH3T3 expuestas al medio reconstituido.

Posteriormente, se realizó un pool de las células provenientes de las 5 colonias seleccionadas y positivas para la secuencia de KRAS humano, se inocularon en ratones inmunocomprometidos, incluyendo los 5 grupos descritos en la tabla 1.

Tabla 2. Grupos de animales para el ensayo de crecimiento tumoral in vivo

| Grupo | Número de animales | Descripción |
|-------|--------------------|---|
| 1 | 8 | Células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de SW480 |
| 2 | 8 | Células NIH3T3 expuestas al FsDNA de SW480 |
| 3 | 8 | Células NIH3T3 expuestas al medio reconstituido |

| | | |
|------------------|---|----------------------------|
| Control negativo | 8 | Células NIH3T3 sin exponer |
| Control positivo | 4 | Células SW480 |

Como se observa en la figura 9, interesantemente hasta el día 91 no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el volumen tumoral de los ratones que fueron inoculados con las células expuestas al medio condicionado completo, a la fracción de DNA libre de vesículas(fsDNA) y el medio reconstituido. Mientras que los ratones que fueron inoculados con las células NIH3T3 crecidas en condiciones estándar, no generaron tumores.

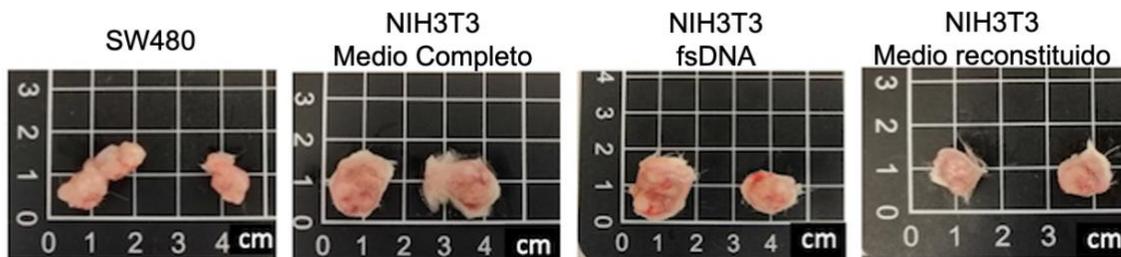
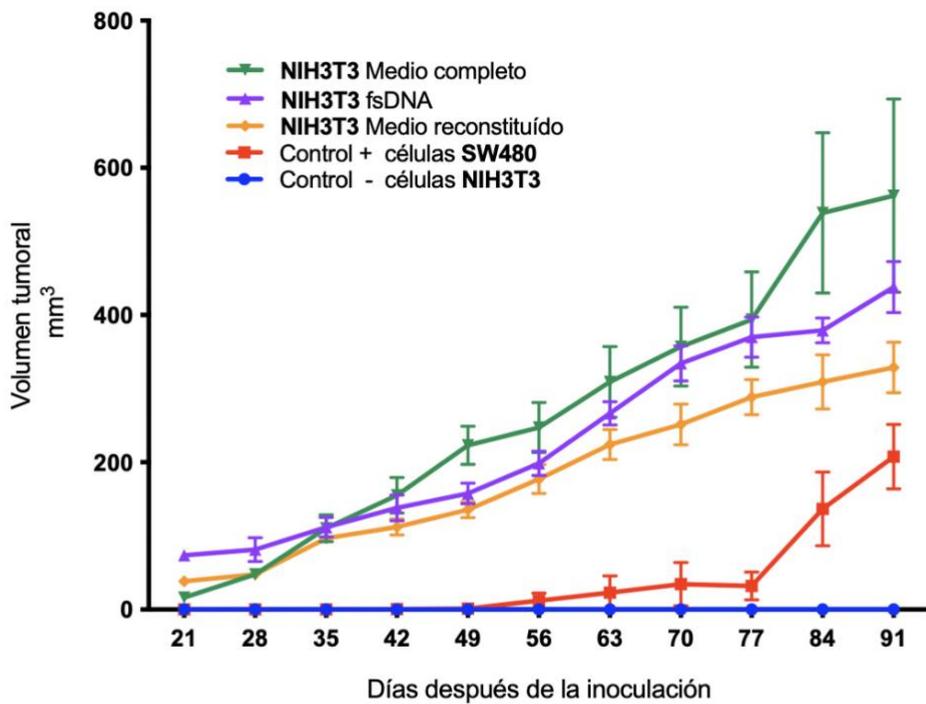


Figura 9. Formación de tumores en ratones NSG. A, desarrollo del volumen tumoral en los ratones inoculados con células NIH3T3 expuestas al medio condicionado de SW480, células NIH3T3 expuestas al fsDNA, células NIH3T3 expuestas al medio reconstituido, células SW480 y células NIH3T3 cultivadas en condiciones estándar, +/- desviación estándar, n=8; B, Imágenes representativas de los tumores formados en los ratones.

Estos resultados sugieren que el DNA que se encuentra fuera de cuerpos vesiculares, es el que favorece la transferencia horizontal de información genética y la adquisición de características de transformación celular por parte de los fibroblastos (NIH3T3).

El DNA libre de vesículas está asociado con Proteínas.

En una publicación anterior de nuestro grupo de investigación (Trejo-Becerril, 2012), se demostró que con el tratamiento de proteasas y DNasa I en el medio condicionado de SW480, se abate la capacidad de generar tumores de los fibroblastos inmortalizados de ratón que fueron expuestos a este medio condicionado de SW480 tratado con enzimas; es por ello que evaluamos la capacidad que tienen estas mismas enzimas de inhibir la formación de focos en la fracción fsDNA.

Para ello, la fracción fsDNA se trató con proteinasa K y/o DNasa I. para ser utilizado como medio de cultivo de las células NIH3T3, al igual que en los experimentos previos, después de 28 días de exposición, se contabilizó el número de focos formados por condición experimental (figura 10). Observamos que la fracción de fsDNA, tratada con la mezcla de enzimas disminuye drásticamente la formación de focos formados por parte de las células NIH3T3 . El tratamiento sólo con una de las enzimas ya sea DNasa I o bien proteinasa K, no tiene efecto en el número de focos

formados comparado con el control; es decir, el tratamiento con proteinasa K o con DNAsa I de la fracción FsDNA, no afecta en la formación de focos cuando se expone a las células NIH3T3.

Lo que sugiere que las proteínas que se encuentran acompañando al FsDNA son importantes para el proceso de transformación celular.

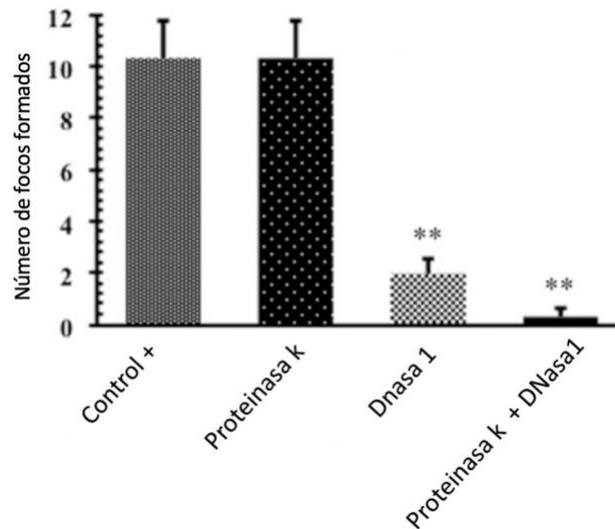


Figura 10. Formación de focos en el cultivo de las células murinas NIH3T3 expuestas a fsDNA tras el tratamiento enzimático.

Promedio del número de focos formados por las células NIH3T3 expuestas a las diferentes condiciones. Se realizaron 2 experimentos independientes por triplicado, +/- desviación estándar.

El DNA libre de vesículas (fsDNA) se introduce en las células NIH3T3.

Con el objetivo de visualizar la incorporación del fsDNA a las células NIH3T3, se realizó una tinción de esta fracción con picogreen (un colorante fluorescente que se une a DNA de doble cadena) y se monitoreo el proceso cada 15 minutos por espacio de 45 minutos.

Como se observa en la figura 11, a los 30 minutos de iniciada la incubación, las células empiezan a incorporar el fsDNA, observándose agregados en el citoplasma. Posteriormente, a los 45 minutos, los agregados fueron más abundantes mismos que no se observaron en el control.

Con el objetivo de corroborar que los agregados fluorescentes realmente se trataran de DNA, la fracción de fsDNA, fue tratada con la mezcla de la DNasa I y proteinasa K. Posterior al tratamiento, la fracción fue teñida con picogreen y se expuso a las células NIH3T3 por 45 minutos; enseguida las células se trataron para observarlas bajo el microscopio de fluorescencia. Cómo se observa en la figura 12, después del tratamiento enzimático no hay agregados fluorescentes, en comparación con el control el cual no fue sometido al tratamiento enzimático. Estos resultados demuestran que el fsDNA de la línea celular SW480, se introduce a las células NIH3T3 y esta incorporación se puede abatir con el tratamiento enzimático. Lo que sugiere que las moléculas de origen proteico que están unidas al fsDNA, son indispensables para la transferencia horizontal de información genéti

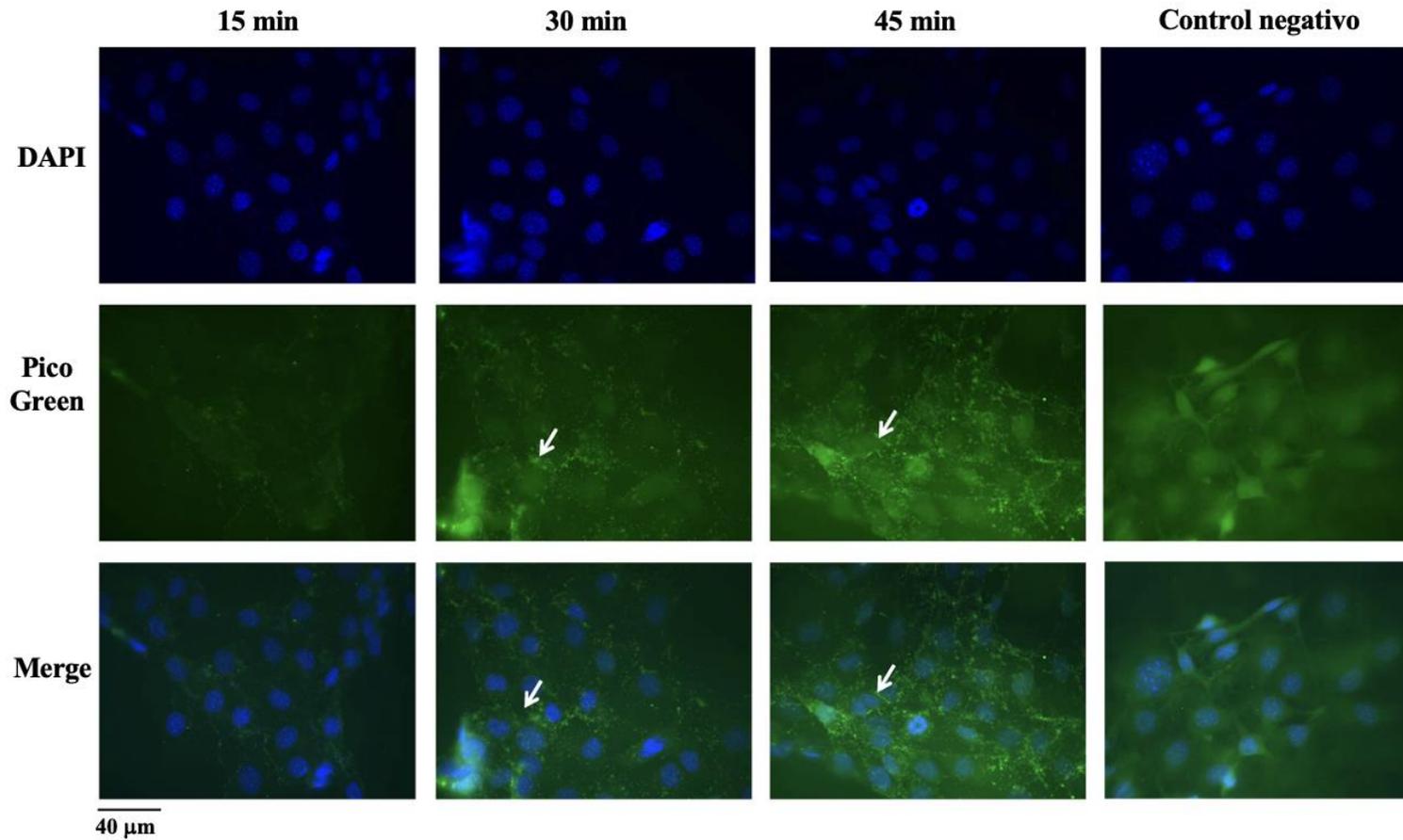


Figura 11. Células NIH3T3 expuestas al fsDNA de SW480 teñido con Picogreen. Azul, DAPI; Verde, picogreen. Con las flechas en color blanco se señalan los agregados en el citoplasma de las células.

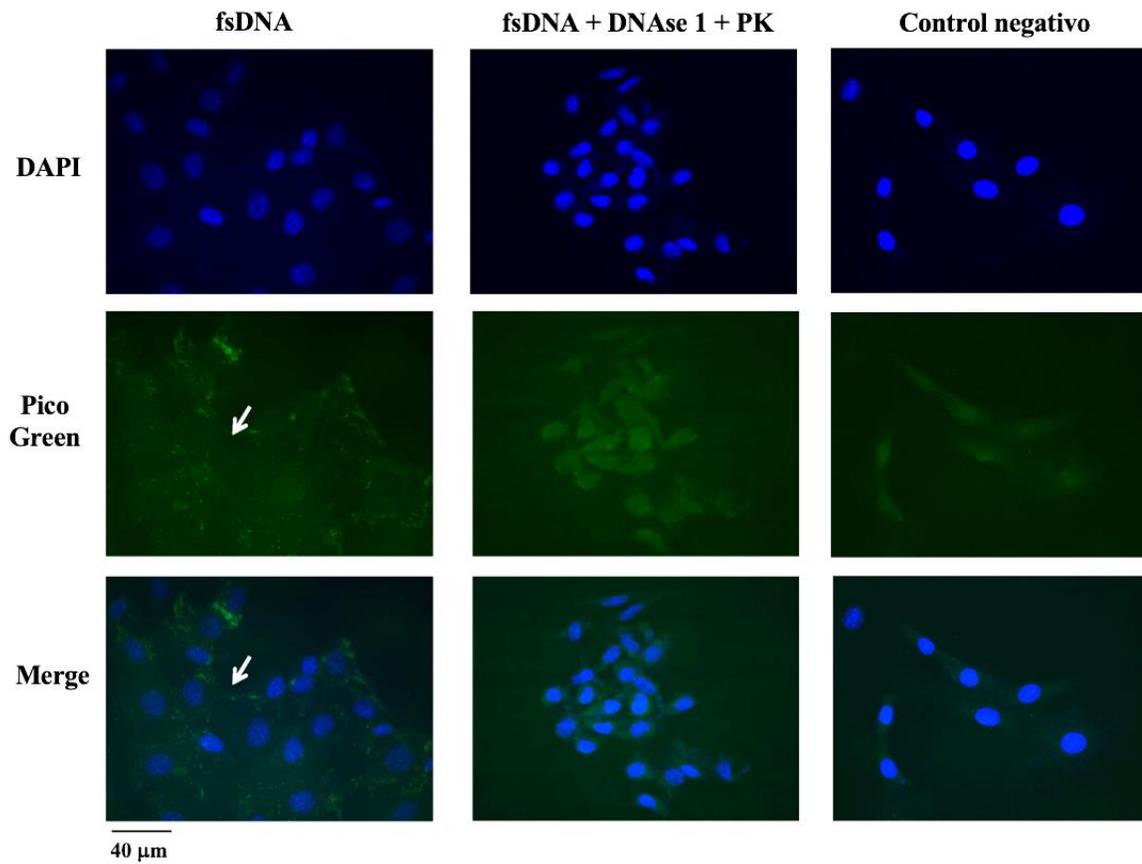


Figura 12. Células NIH3T3 expuestas a la fracción fsDNA de SW480 tratado con proteinasa k y DNasa I. Azul, DAPI; Verde, picogreen, con las flechas en color blanco se señalan los agregados en el citoplasma de las células.

El DNA extra vesicular (fsDNA) que proviene de las células de SW480 reduce la apoptosis de los fibroblastos NIH3T3 y aumenta el porcentaje de células que se encuentran en síntesis.

Se evaluó la capacidad que tenían las diferentes fracciones de medio condicionado de SW480 (FsDNA y evDNA) sobre la proliferación celular de las células NIH3T3. Para ello se expuso a las células NIH3T3 a las diferentes fracciones del medio condicionado, durante 8 días. Observamos que en el día ocho existe una tendencia a que aumente la población celular con respecto al control (Figura 13 A).

Se analizó por citometría de flujo la fase del ciclo celular en que se encontraban dichas células, observamos que, con respecto al control, las células murinas expuestas al evDNA aumentaban el porcentaje de células en apoptosis, así como el porcentaje de células en las fases G1 y G2, mientras que aquellas células que fueron expuestas al fsDNA presentaron una disminución en el porcentaje de células en apoptosis, así como en el porcentaje de células en G1 y G2 (Figura 13, B;C,D,E).

Estos resultados sugieren que el fsDNA favorece la proliferación celular y disminuye la apoptosis.

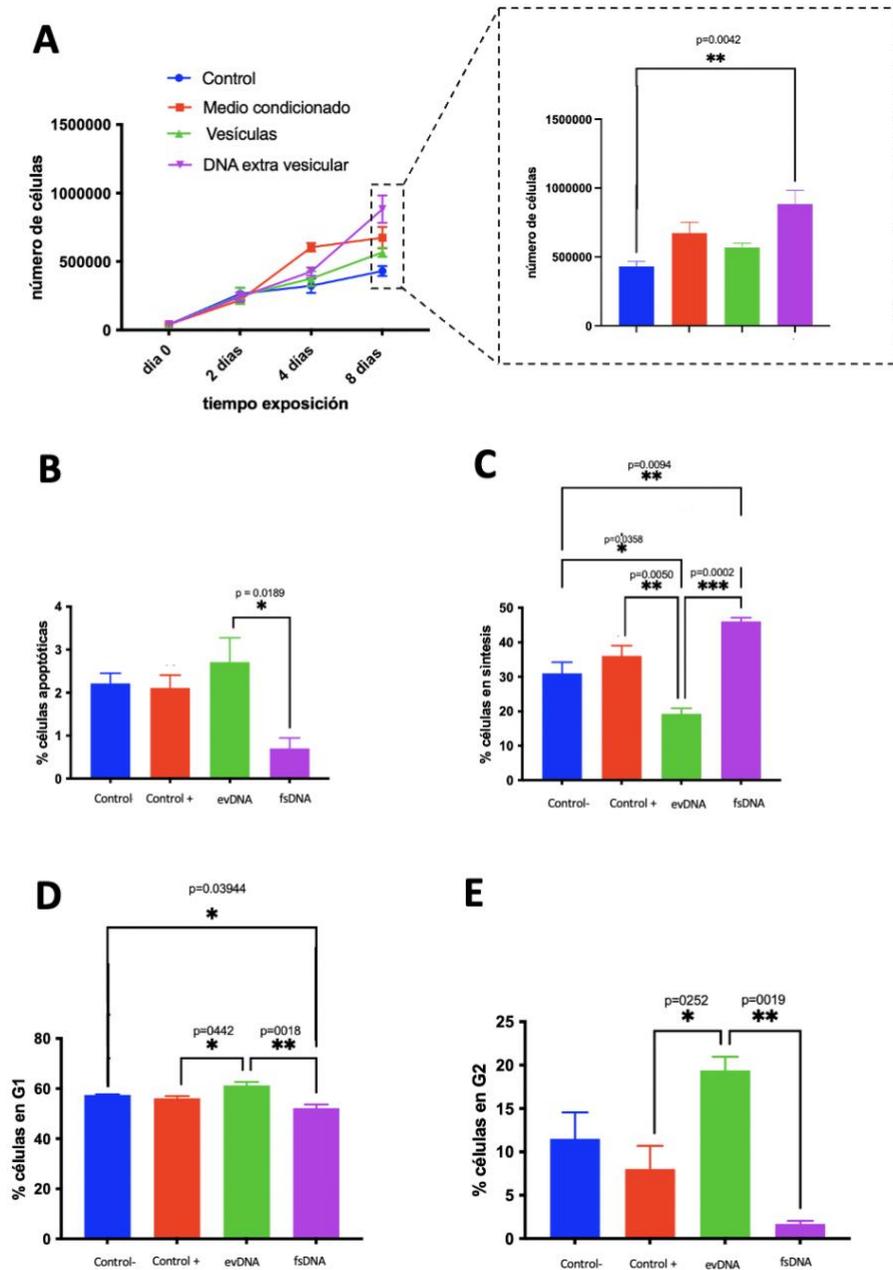


Figura 13. Proliferación de las células NIH3T3 expuestas a las diferentes fracciones del Medio condicionado de la línea celular SW480

Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas de la fracción FsDNA

Los datos provenientes de la espectrometría de masas, se utilizaron para identificar a las proteínas asociadas a la fracción fsDNA con el software TPP. El software logró identificar un total de 1273, se realizó una selección de los datos, donde se inició seleccionando únicamente a las proteínas que tenían al menos dos péptidos de coincidencia con un 80% de probabilidad, dando como resultado un total de 237 proteínas. Para identificar a las proteínas que pudieran estar unidas al DNA, se utilizó el software PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship) classification system (<http://www.pantherdb.org/>), realizando un segundo filtro, donde se le indicó que seleccionara sólo a las proteínas con sitios de unión a ácidos nucleicos dando como resultado 31 proteínas, la cuales se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Proteínas identificadas por Espectrometría de Masas de la fracción fsDNA

| ID Uniprot | Nombre | Función asociada |
|---------------|---|-------------------|
| P46100 | ATRX, Chromatin remodeler (ATRX) | Reparación de DNA |
| O60673 | REV3 like, DNA directed polymerase zeta catalytic subunit (REV3L) | Reparación de DNA |
| Q9Y5B9 | SPTL16 homolog, facilitates chromatin remodeling subunit (SUPT16H) | Reparación de DNA |
| Q01831 | XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor (XPC) | Reparación de DNA |
| Q13619 | Cullin 4A (CUL4A) | Reparación de DNA |
| Q7Z333 | Senataxin (SETX) | Reparación de DNA |

| | | |
|---------------|---|-----------------------------|
| P26358 | DNA methyltransferase (DNMT1) | Reguladores de la cromatina |
| Q9NQX1 | PR domain zinc finger protein 5 (PRDM5) | Reguladores de la cromatina |
| O75151 | PHD finger protein 2 (PHF2) | Reguladores de la cromatina |
| P28370 | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily a member 1 (SMARCA1) | Reguladores de la cromatina |
| Q8TBE0 | bromo adjacent homology domain containing 1 (BAHD1) | Reguladores de la cromatina |
| Q13547 | histone, deacetylase (HDAC1) | Reguladores de la cromatina |
| P51610 | Host cell factor C1 (HCFC1) | Reguladores de la cromatina |
| Q9BY66 | lysine demethylase 5D (KDM5D) | Reguladores de la cromatina |
| Q03164 | lysine methyltransferase 2A (KMT2A) | Reguladores de la cromatina |
| Q8NEZ4 | lysine methyltransferase 2c (KMT2C) | Reguladores de la cromatina |
| Q9Y483 | Metal response element binding transcription factor (MTF2) | Reguladores de la cromatina |
| Q96L73 | Nuclear receptor binding SET domain protein 1 (NSD1) | Reguladores de la cromatina |
| O14607 | Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked (UTY) | Reguladores de la cromatina |
| Q00839 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (HNRNPU) | Proteína de union a RNA |
| Q92771 | DEAD/H-box helicase 12, pseudogene (DDx12P) | Proteína de union a RNA |
| Q01844 | EWS RNA binding protein (EWSR1) | Proteína de union a RNA |

| | | |
|---------------|--|-------------------------|
| P42696 | RNA binding motif protein 34 (RBM34) | Proteína de unión a RNA |
| Q8N5C6 | S1 RNA binding protein (SRBD1) | Proteína de unión a RNA |
| Q96MU7 | YTH domain containing 1 (YTHDC1) | Proteína de unión a RNA |
| Q96T58 | Spen family transcriptional repressor (SPEN) | Proteína de unión a RNA |
| O75494 | serine and arginine rich splicing factor 10 (SRSF10) | Proteína de unión a RNA |
| P09543 | 2', 3'- cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (CNP) | Proteína de unión a RNA |
| P49588 | Alanyl-tRNA synthetase (AARs) | Proteína de unión a RNA |
| Q9Y3A4 | Ribosomal RNA processing 7 homolog A (RRP7A) | Proteína de unión a RNA |
| RANBP2 | RAN binding protein 2 (RANBP2) | Proteína de unión a RNA |

Discusión

Debido a la heterogeneidad que existe en las formas de liberación del DNA extracelular, se han descrito diversas estructuras en las que se puede encontrar el DNA extracelular, ya sea en forma de vesículas grandes o pequeñas también conocidas como exosomas, o microvesículas; asociado a complejos macromoleculares (complejos de nucleosomas, otros lípidos y proteínas) y DNA circulante unido a la superficie celular (Aucamp et al., 2018; Bebelman et al., 2018; Cataldi & Viola-Magni, 2016; Eguchi et al., 2019; Fernando et al., 2017; Hu et al., 2021) .

En este trabajo, nosotros logramos separar dos estructuras extra celulares que contienen DNA (Vesículas y DNA no asociado a vesículas) del medio condicionado de células provenientes de carcinoma de colon humano (línea celular SW480). Al observar estas dos estructuras bajo el microscopio electrónico, encontramos que la fracción que por los métodos utilizados en la separación se observaron cuerpos redondos (figura 4A), que correspondían con el tamaño de los exosomas reportado en la literatura (evDNA) (Fernando et al., 2017), mientras que en la fracción de DNA no asociado a vesículas (figura 4B), se observaron estructuras que, asemejan fibras de DNA, como nucleosomas y fragmentos de cromosomas(Ou et al., 2017). Previamente, ya se había reportado la presencia de nucleosomas en el suero de pacientes con cáncer(Holdenrieder et al., 2001; Trejo-Becerril et al., 2003) sin embargo, existen pocos trabajos donde se visualicen estas estructuras en el medio extracelular. El grupo de Thierry y colaboradores realizó una caracterización mediante microscopía de fuerza atómica del DNA extracelular en el suero de

pacientes con cáncer de colon, ellos describieron estructuras similares a las que nosotros encontramos (Mouliere et al., 2014; Pang et al., 2015).

Por otro lado, observamos que al normalizar por número de células (2×10^7), se encontró mayor cantidad de DNA en la fracción de evDNA ($18.76\text{ng} \pm 7.7 \text{ SD}$) comparado la fracción FsDNA ($3.63\text{ng} \pm 1.4 \text{ SD}$), estos resultados son consistentes con lo descrito en la literatura, que la mayor cantidad de DNA extracelular se encuentra contenido en exosomas tanto en suero de pacientes con cáncer (Fernando et al., 2017) como en el medio condicionado (Wang et al., 2017a).

Las células tumorales liberan mayor cantidad de exosomas/ microvesículas que las células normales (Bronkhorst et al., 2016), éstos tienen un papel importante en la biología del cáncer, como portadoras de material genético y proteínas que participan activamente en el crecimiento del tumor (Abdouh et al., 2017; Aucamp et al., 2016), así como alterando el microambiente tumoral (Choi et al., 2012; Colombo et al., 2014; Ilkhani et al., 2020). Hamam y cols, confirmaron lo anterior, al evaluar la capacidad de transformar fibroblastos humanos BRCA1-KO (Hamam et al., 2016), con exosomas provenientes de la células de cáncer de colon humano HT29 y del DNA no asociado a exosomas de la misma línea celular; ellos observaron que al realizar un tratamiento con DNAsas en las vesículas aisladas y en el medio condicionado de la misma línea celular, se disminuyó el volumen tumoral por parte de las células expuestas al medio condicionado, en comparación con las células expuestas a las vesículas, proponiendo que el DNA no asociado a las vesículas, no participa en el proceso de transformación celular, sin embargo, la formación de tumor no se abatió por completo, dejando ver que el DNA no asociado a las

vesículas tiene cierta capacidad de transformación (Abdouh et al., 2019b); a diferencia de este grupo, nosotros utilizamos el modelo de transformación celular establecido por Anker en 1994 (P Anker et al., 1994), utilizado por García-Olmo en el 2010 (D. C. García-Olmo et al., 2010) y Trejo Becerril en el 2012 (Trejo-Becerril et al., 2012), donde se utiliza como células donadoras de DNAex, células humanas de cáncer colorectal (línea celular SW480) y como células blanco, fibroblastos inmortalizados de ratón (línea celular NIH3T3).

La transformación maligna de las células es un proceso de múltiples pasos que requiere de varios cambios en el comportamiento celular (Stepanenko & Kavsan, 2012), en este trabajo nosotros evaluamos en las células NIH3T3, sólo 3 características de transformación, la inhibición de crecimiento por contacto con la formación de focos en las placas de cultivo; la capacidad de proliferar independientes al anclaje con el crecimiento en agar blando y finalmente la formación de tumores. Nuestros resultados indicaron que el DNA proveniente de la fracción fsDNA es el que favorece la transformación celular.

Previamente nuestro grupo de investigación demostró que, con un tratamiento enzimático de DNasa I y proteasas, se inhibe la capacidad de generar tumores por parte de fibroblastos inmortalizados de ratón expuestos a medio condicionado de SW480; estos resultados proponen que el DNA extracelular se encontraba protegido por una estructura proteica (Trejo-Becerril et al., 2012, 2016) Por otro lado Mitra y colaboradores observaron que el DNA asociado a proteínas (cromatina) aislado de pacientes con cáncer o de voluntarios sanos, era capaz de transferirse en una variedad de células en cultivo y eran detectables en el núcleo de la célula

hospedera (Mitra et al., 2015). Estas evidencias sugieren que las proteínas que están asociadas son importantes en el proceso de transformación celular.

Nosotros observamos que, sólo el fsDNA es el que favorece la adquisición de características de transformación celular, se evaluó la importancia de las proteínas que protegen al fsDNA en el proceso de transformación celular y la incorporación en la célula hospedera; y observamos que, al realizar un tratamiento enzimático (proteínasa k y DNAsa I) se inhibe la formación de focos (figura 10) y se evita la incorporación del fsDNA hacia el interior de la célula hospedera (figura 12), al analizar la misma preparación bajo el microscopio electrónico observamos que estas estructuras se encontraban a la misma distancia focal que el núcleo, corroborando la incorporación dentro de la célula. Estos resultados confirman que el fsDNA se encuentra protegido con proteínas (Gahan & Stroun, 2010), que se requiere del complejo de ácidos nucleicos y proteínas para la incorporación del DNAex y la transformación celular.

El DNAex puede estimular la síntesis de citocinas proinflamatorias, activando diferentes vías de señalización entre ellas, vías de proliferación celular (Konkova et al., 2019), el grupo de Wang y cols. observaron que al tratar a células de cáncer de mama (T47-D, MDA-MB-231 y MCF7) con DNAex proveniente de células MDA-MB-231, se estimula la proliferación celular y existe una disminución de células en la fase G1 (Wang et al., 2017). Nosotros observamos que comparado con nuestro control positivo, las células que fueron expuestas al fsDNA aumentan el número de células que están en la fase de síntesis, mientras que las que fueron expuestas al evDNA no muestran este aumento. Por otro lado, parece ser que las células

expuestas al fsDNA inhiben a la apoptosis, ya que observamos que hay una disminución de células que se encuentran en esta fase comparado con las células que fueron expuestas al resto de las fracciones (figura 13). Para concluir con ello, aún se tendría que corroborar que las células expuestas al fsDNA expresan a la baja proteínas de la vía de señalización de la apoptosis.

Lo que en este trabajo describimos como fracción de DNA libre de vesículas (fsDNA), concuerda con lo que otros autores han descrito como el virtosoma (Gahan & Stroun, 2010), un complejo de ácidos nucleicos, asociados a proteínas responsable del proceso de genometástasis, término que se ha utilizado para explicar la metástasis a través de la transfección de células susceptibles ubicadas en órganos diana distantes con oncogenes que se derivan del tumor primario y circula en el torrente sanguíneo (Damián García-Olmo et al., 2012; Damián García-Olmo & García-Olmo, 2001).

En los pocos estudios que se han realizado sobre las proteínas asociadas al DNA en circulación, concuerdan que el DNA tendría que estar asociado a proteínas del suero, en mayor cantidad a la albúmina y las inmunoglobulinas, como a proteínas sanguíneas menores, como la fibronectina y el componente Cq1 del complemento (TAMKOVICH et al., 2006). Otros autores plantean que proteínas del sistema de la cascada de coagulación podrían tener sitios de unión al DNA (Yan et al., 2005). Es por ello que, para evitar la contaminación con proteínas del suero sanguíneo, y evaluar sólo lo que estaba siendo secretado por las células, diseñamos los experimento *in vitro* libres de SFB.

El grupo de investigación de Liu y realizaron un estudio de en un estudio de la actividad de disopsonina de las proteínas de unión al ADN sérico, en su análisis destacaron la histona H4, PF4, ACTB, ALB, HBA, HBB1, THSD1 y las proteínas similares a las histonas. Los autores muestran que tales proteínas son capaces de formar complejos con el ADN *in vivo*, protegiéndolo de la degradación.(Liu et al., 2010) Así mismo Tutanov y colaboradores, realizaron un análisis proteómico de cromatografía de afinidad, donde se identificaron 111 complejos de nucleoproteínas y 56 proteínas aisladas de la sangre de donantes de control y pacientes con cáncer de mama, respectivamente. Las proteínas más abundantes fueron HOXC5, GPR22 e IDE, mientras que el 40 % de las proteínas identificadas eran características de unión de ácido nucleico/nucleótido y contenían varios motivos de unión de ADN (ocho dedos de zinc multidominio, dos dedos de zinc y cinco cremalleras de leucina)(Tutanov et al., 2022).

Estos resultados, son semejantes a lo que nosotros encontramos, ya que, dentro de las proteínas identificadas, encontramos dedos de zinc, factores de transcripción y remodeladores de la cromatina, estos hallazgos podrían sugerir que el fsDNA va acompañado de proteínas que favorecen su integración en el genoma, modificando el comportamiento de las células receptoras.

Cabe destacar que el análisis que nosotros presentamos, es el producto de un análisis exploratorio. Para enriquecer el resultado, es necesario repetir el análisis utilizando una columna analítica de mayor longitud, para aumentar la resolución en los espectros de masas, por otro lado al tratarse del análisis de una muestra tan compleja como lo es parte del secretoma de la una línea celular, se recomienda

realizar un pre-fraccionamiento de la muestra, ya que acuerdo con lo reportado en la literatura bajo estas condiciones, se asegura una mayor identificación en el número de péptidos, y con ello el aumento en la cobertura de proteínas identificadas (Solovyeva et al., 2018).

Continuar con la identificación concluyente de las proteínas que interactúan con el fsDNA es de suma importancia ya que proporcionará una mejor comprensión de las interacciones que tiene con las células receptoras.

Conclusión

Pese a que ya había estudios previos sobre el efecto del DNA extracelular de células tumorales sobre células no tumorigénicas, por primera vez se realizó una separación, caracterización y comparación de dos fuentes diferentes de DNA extracelular (DNA contenido en vesículas y DNA no asociado a vesículas). Nuestros resultados demostraron que con el modelo de transfección pasiva utilizado en el grupo de trabajo, el DNA no asociado a vesículas, es decir el fsDNA, favorece que las células receptoras entren en fase de síntesis, y adquieran algunas características típicas de células transformadas, como lo son la inhibición del crecimiento por contacto, el crecimiento independiente al anclaje y la formación de tumores.

Así mismo, al tratar a la fracción fsDNA con proteinasa k, perdió la capacidad de introducirse en las células receptoras, así como la capacidad de favorecer que las células adquieran características de transformación celular por lo demostramos que las proteínas que se encuentran asociadas son importantes en el proceso de transformación.

Lo que nosotros llamamos fsDNA, concuerda con lo que otros autores han descrito como virtosoma, con nuestros resultados podemos inferir que el virtosoma es un complejo núcleo proteico no asociado a vesículas extracelulares, dentro de las proteínas que lo conforman se encuentran dedos de zinc, factores de transcripción y remodeladores de la cromatina

Referencias bibliográficas

- Aarthy, R., Mani, S., Velusami, S., Sundarsingh, S., & Rajkumar, T. (2015). Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 19(6), 339–350. <https://doi.org/10.1007/s40291-015-0167-y>
- Abdouh, M., Floris, M., Gao, Z. H., Arena, V., Arena, M., & Arena, G. O. (2019a). Colorectal cancer-derived extracellular vesicles induce transformation of fibroblasts into colon carcinoma cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1248-2>
- Abdouh, M., Floris, M., Gao, Z.-H., Arena, V., Arena, M., & Arena, G. O. (2019b). Colorectal cancer-derived extracellular vesicles induce transformation of fibroblasts into colon carcinoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1248-2>
- Abdouh, M., Hamam, D., Gao, Z. H., Arena, V., Arena, M., & Arena, G. O. (2017). Exosomes isolated from cancer patients' sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to oncosuppressor-mutated cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0587-0>
- Abdouh, M., Zhou, S., Arena, V., Arena, M., Lazaris, A., Onerheim, R., Metrakos, P., & Arena, G. (2014). Transfer of malignant trait to immortalized human cells following exposure to human cancer serum. *Journal of Experimental & Clinical*

Cancer Research, 33(1). <https://doi.org/10.1186/preaccept-6395752331415020>

Adigun, R., Basit, H., & Murray, J. (2022). *Cell Liquefactive Necrosis*.

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.

Anker, Philippe, Mulcahy, H., Qi Chen, X., & Stroun, M. (1999). Circulating DNA in plasma or serum. *Cancer and Metastasis Reviews*, 18(1), 65–73. <https://doi.org/10.1023/A:1006260319913>

Anker, Philippe, Stroun, M., & Maurice, P. (1975). Spontaneous Release of DNA by Human Blood Lymphocytes as Shown in an in Vitro System. *Cancer Research*, 9(35), 2375–2382.

Antwi-Baffour, S. S. (2015). Molecular characterisation of plasma membrane-derived vesicles. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 22, Number 1). <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0174-7>

Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J. M., Mornet, S., & Brisson, A. R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(5). <https://doi.org/10.1111/jth.12554>

- 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*, 73(23), 4355–4381. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2370-3>
- Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S., & Pretorius, P. J. (2018). The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews*, 93(3), 1649–1683. <https://doi.org/10.1111/brv.12413>
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>
- Beyer, C., Stearns, N. A., Giessler, A., Distler, J. H., Schett, G., & Pisetsky, D. S. (2012). The extracellular release of DNA and HMGB1 from Jurkat T cells during *in vitro* necrotic cell death. *Innate Immunity*, 18(5), 727–737. <https://doi.org/10.1177/1753425912437981>

- Bhagirath, V. C., Dwivedi, D. J., & Liaw, P. C. (2015). Comparison of the Proinflammatory and Procoagulant Properties of Nuclear, Mitochondrial, and Bacterial DNA. *Shock*, *44*(3). <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000397>
- Breitbach, S., Tug, S., Helmig, S., Zahn, D., Kubiak, T., Michal, M., Gori, T., Ehlert, T., Beiter, T., & Simon, P. (2014). Direct Quantification of Cell-Free, Circulating DNA from Unpurified Plasma. *PLoS ONE*, *9*(3), e87838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087838>
- 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 (BBA) - Molecular Cell Research*, *1863*(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.022>
- Cataldi, S., & Viola-Magni, M. (2016). Components of the cytosolic and released virtosomes from stimulated and non-stimulated human lymphocytes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.04.006>
- Chen, Z., Fadiel, A., Naftolin, F., Eichenbaum, K. D., & Xia, Y. (2005). Circulation DNA: Biological implications for cancer metastasis and immunology. *Medical Hypotheses*, *65*(5). <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.04.042>
- Cheng, C., Omura-Minamisawa, M., Kang, Y., Hara, T., Koike, I., & Inoue, T. (2009). Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients

during radiation therapy. *Cancer Science*, 100(2), 303–309.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01021.x>

Choi, D.-S., Yang, J.-S., Choi, E.-J., Jang, S. C., Park, S., Kim, O. Y., Hwang, D., Kim, K. P., Kim, Y.-K., Kim, S., & Gho, Y. S. (2012). The Protein Interaction Network of Extracellular Vesicles Derived from Human Colorectal Cancer Cells. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 1144–1151.
<https://doi.org/10.1021/pr200842h>

Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*.
<https://doi.org/10.1242/jcs.128868>

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 255–289.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>

Eguchi, A., Kostallari, E., Feldstein, A. E., & Shah, V. H. (2019). Extracellular vesicles, the liquid biopsy of the future. In *Journal of Hepatology* (Vol. 70, Number 6). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.030>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

- Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D., & Ryan, W. L. (2017). New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLOS ONE*, 12(8), e0183915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183915>
- Gahan, P. B., & Stroun, M. (2010). The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. In *Cell Biochemistry and Function* (Vol. 28, Number 7). <https://doi.org/10.1002/cbf.1690>
- Gajos-Michniewicz, A., Duechler, M., & Czyz, M. (2014). MiRNA in melanoma-derived exosomes. In *Cancer Letters* (Vol. 347, Number 1). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.004>
- Garcia-Arranz, M., Garcia-Olmo, D., Vega-Clemente, L., & Stroun, M. (2017). A Preliminary Study of the Action of Virtosomes from Non-dividing Cells on Tumour Cell Replication in vitro and in vivo. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(10). <https://doi.org/10.2174/1871520617666170213110536>
- García-Olmo, D. C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J. M., & García-Olmo, D. (2010). Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Research*, 70(2). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3513>
- García-Olmo, D., Ontañón, J., Martínez, E., & Vallejo, M. (1999). Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the

genometastasis. *Histology and Histopathology*, 14(4).
<https://doi.org/10.14670/HH-14.1159>

García-Olmo, Damián, & García-Olmo, D. C. (2001). Functionality of circulating DNA: The hypothesis of genometastasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03895.x>

García-Olmo, Damián, García-Olmo, D. C., Domínguez-Berzosa, C., Guadalajara, H., Vega, L., & García-Arranz, M. (2012). Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genometastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: A pilot study. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1517/14712598.2012.685151>

Goebel, G., Zitt, M., Zitt, M., & Müller, H. M. (2005). Circulating Nucleic Acids in Plasma or Serum (CNAPS) as Prognostic and Predictive Markers in Patients with Solid Neoplasias. *Disease Markers*, 21(3), 105–120.
<https://doi.org/10.1155/2005/218759>

Hamam, D., Abdouh, M., Gao, Z. H., Arena, V., Arena, M., & Arena, G. O. (2016). Transfer of malignant trait to BRCA1 deficient human fibroblasts following exposure to serum of cancer patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0360-9>

Holdenrieder, S., Stieber, P., Bodenmüller, H., Busch, M., Fertig, G., Först, H., Schalhorn, A., Schmeller, N., Untch, M., & Seidel, D. (2001). Nucleosomes in

serum of patients with benign and malignant diseases. *International Journal of Cancer*, 95(2), 114–120. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010320\)95:2<114::AID-IJC1020>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010320)95:2<114::AID-IJC1020>3.0.CO;2-Q)

Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., & Gu, Y. (2021). The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103166. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166>

Hunter, K., Crawford, N. P., & Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research Volume* , 10(1).

Ilkhani, K., Bastami, M., Delgir, S., Safi, A., Talebian, S., & Alivand, M.-R. (2020). The Engaged Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metabolism: Focusing on Cancer-Associated Fibroblast and Exosome Mediators. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(2), 254–266. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200910123428>

Jahr, S. ; H. H. E. S. H. D. F. F. ; H. R.-D. K. R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research* , 61(4), 1659–1665.

Keller, A., & Shteynberg, D. (2011). *Software Pipeline and Data Analysis for MS/MS Proteomics: The Trans-Proteomic Pipeline* (pp. 169–189). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-977-2_12

- Konkova, M. S., Kaliyanov, A. A., Sergeeva, V. A., Abramova, M. S., & Kostyuk, S. v. (2019). Oxidized Cell-Free DNA Is a Factor of Stress Signaling in Radiation-Induced Bystander Effects in Different Types of Human Cells. *International Journal of Genomics*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/9467029>
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 20, Number 8). <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
- Leon, 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).
- Liu, F., Frick, A., Yuan, X., & Huang, L. (2010). Dysopsonin Activity of Serum DNA-Binding Proteins Favorable for Gene Delivery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 500–504. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159541>
- MANDEL, P., & METAIS, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Biologie et de Ses Filiales*, 142(3–4).
- Meddeb, R., Dache, Z. A. A., Thezenas, S., Otandault, A., Tanos, R., Pastor, B., Sanchez, C., Azzi, J., Tusch, G., Azan, S., Mollevi, C., Adenis, A., el Messaoudi, S., Blache, P., & Thierry, A. R. (2019). Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific Reports*, 9(1), 5220. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41593-4>

- Mitra, I., Khare, N. K., Raghuram, G. V., Chaubal, R., Khambatti, F., Gupta, D., Gaikwad, A., Prasannan, P., Singh, A., Iyer, A., Singh, A., Upadhyay, P., Nair, N. K., Mishra, P. K., & Dutt, A. (2015). Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *Journal of Biosciences*, *40*(1), 91–111. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9508-6>
- Moeinzadeh, L., Razeghian-Jahromi, I., Zarei-Behjani, Z., Bagheri, Z., & Razmkhah, M. (2022). Composition, Biogenesis, and Role of Exosomes in Tumor Development. In *Stem Cells International* (Vol. 2022). <https://doi.org/10.1155/2022/8392509>
- Morozkin, E. S., Babochkina, T. I., Vlassov, V. v., & Laktionov, P. P. (2008). The Effect of Protein Transport Inhibitors on the Production of Extracellular DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1137*(1), 31–35. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.026>
- Mouliere, F., el Messaoudi, S., Pang, D., Dritschilo, A., & Thierry, A. R. (2014). Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Molecular Oncology*, *8*(5), 927–941. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.02.005>
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*, *19*(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>

- Ou, H. D., Phan, S., Deerinck, T. J., Thor, A., Ellisman, M. H., & O'Shea, C. C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*, 357(6349). <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>
- Pang, D., Thierry, A. R., & Dritschilo, A. (2015). DNA studies using atomic force microscopy: capabilities for measurement of short DNA fragments. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00001>
- Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R., & Coyle, A. J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 28). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132603>
- Skvortsova, T. E., Bryzgunova, O. E., Lebedeva, A. O., Mak, V. v., Vlassov, V. v., & Laktionov, P. P. (2010). Methylated Cell-Free DNA In Vitro and In Vivo. In *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum* (pp. 185–194). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9382-0_25
- Solovyeva, E. M., Lobas, A. A., Kopylov, A. T., Ilina, I. Y., Levitsky, L. I., Moshkovskii, S. A., & Gorshkov, M. V. (2018). FractionOptimizer: a method for optimal peptide fractionation in bottom-up proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(16). <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1054-2>
- Stepanenko, A. A., & Kavsan, V. M. (2012). immortalization and malignant transformation of Eukaryotic cells. *Cytology and Genetics*, 46(2), 96–129. <https://doi.org/10.3103/S0095452712020041>

Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*, 313(1–2), 139–142. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00665-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00665-9)

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. <https://doi.org/10.1196/annals.1368.026>

Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., ... Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766–769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>

Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P., & Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(3). <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>

Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S. Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L. L., Audoly, L., La Rosa, G., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M. K., Fitzgerald, K. A., ... Coyle, A. J. (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-

containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunology*, 8(5). <https://doi.org/10.1038/ni1457>

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>

Trejo-Becerril, C., Pérez-Cardenas, 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). <https://doi.org/10.1177/1534735416631102>

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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052754>

Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Treviño-Cuevas, H., Taja-Chayeb, L., García-López, P., Segura-Pacheco, B., Chávez-Blanco, A., Lizano-Soberon, M., González-Fierro, A., Mariscal, I., Wegman-Ostrosky, T., & Dueñas-González, A. (2003). Circulating nucleosomes and response to chemotherapy:

An *in vitro* , *in vivo* and clinical study on cervical cancer patients. *International Journal of Cancer*, 104(6), 663–668. <https://doi.org/10.1002/ijc.11003>

Tutanov, O., Shtam, T., Grigor'eva, A., Tupikin, A., Tsentalovich, Y., & Tamkovich, S. (2022). Blood Plasma Exosomes Contain Circulating DNA in Their Crown. *Diagnostics*, 12(4), 854. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040854>

Vanpouille-Box, C., Demaria, S., Formenti, S. C., & Galluzzi, L. (2018). Cytosolic DNA Sensing in Organismal Tumor Control. In *Cancer Cell* (Vol. 34, Number 3). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.013>

Wang, W., Kong, P., Ma, G., Li, L., Zhu, J., Xia, T., Xie, H., Zhou, W., & Wang, S. (2017a). Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(26), 43180–43191. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17858>

Wang, W., Kong, P., Ma, G., Li, L., Zhu, J., Xia, T., Xie, H., Zhou, W., & Wang, S. (2017b). Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(26), 43180–43191. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17858>

Whiteside, T. L. (2016). Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 74). <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.005>

Xu, Y., Song, Y., Chang, J., Zhou, X., Qi, Q., Tian, X., Li, M., Zeng, X., Xu, M., Zhang, W., Cram, D. S., & Liu, J. (2018). High levels of circulating cell-free DNA are a

biomarker of active SLE. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(11), e13015. <https://doi.org/10.1111/eci.13015>

Yan, X., Scherphof, G. L., & Kamps, J. A. A. M. (2005). Liposome Opsonization. *Journal of Liposome Research*, 15(1–2), 109–139. <https://doi.org/10.1081/LPR-64971>