



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BUSQUEDA DE SECUENCIAS ONCOGENICAS EN DNA EXTRACELULAR DE LINEAS CELULARES DE CANCER, METASTASICAS Y NO METASTASICAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

AMERICA VANOYE CARLO



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO MUÑOZ GONZALEZ

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2004

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE JURE



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
 GOBIERNO FEDERAL  
 SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
 INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
 "Busqueda de secuencias oncogénicas en DNA extracelular de líneas  
 celulares de cáncer, metastásicas y no metastásicas"

realizado por América Vanoye Carlo con número de cuenta 09955244-4

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dr. Alfonso Dueñas González

Propietario

M. en C. Catalina Trejo Becerril

Propietario

M. en C. Emilio Córdova Alarcón

Suplente

Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente

Dra. Rosario Rodríguez Arnaíz

**Consejo Departamental de Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
 DE BIOLOGÍA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: América Vanoye Carlo

FECHA: 19 Marzo 2004

FIRMA: 

“La vida es un abismo”

Victor Hugo

## **Agradecimientos**

Agradezco al ser supremo de cuya existencia estoy segura

A mi madre quien de quien he recibido apoyo en todo lo que me propongo

A mi padre por enseñarme que existe este camino

A mis hermanas por estar ahí

A mis niños por su enorme nobleza

A mis amigos, por su cariño, apoyo y aliento, en las buenas y en las malas

A quienes me dieron la oportunidad de desarrollar este trabajo: Alfonso y Caty. Y a quienes me ayudaron en todo momento: Aurora y Alma

A Rafael por todo lo que hemos vivido juntos...

**GRACIAS**

*... A mi madre quien me ha enseñado el significado de la palabra fortaleza*

**“Búsqueda de secuencias oncogénicas en DNA extracelular de líneas celulares de cáncer, metastásicas y no metastásicas”**

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	2
2.1 DNA .....	2
2.2 Cromatina .....	4
2.3 Cáncer .....	8
2.3.1 Biología del Cáncer .....	9
2.4 Metástasis .....	14
2.5 DNA circulante .....	18
2.5.1 DNA circulante en pacientes con cáncer .....	18
2.5.2 Origen tumoral del DNA circulante en pacientes con cáncer .....	19
2.6 Mecanismos de liberación del DNA por los tumores .....	21
2.6.1 Lisis de células malignas en circulación .....	21
2.6.2 Apoptosis de células malignas .....	22
2.6.3 Liberación de DNA por células malignas viables .....	23
2.7 Genometástasis .....	23
3. Justificación .....	26
4. Hipótesis .....	27
5. Objetivos .....	27
5.1 Objetivo general .....	27
5.2 Objetivos particulares .....	27

6. Materiales y Métodos .....	28
6.1 Cultivo celular .....	28
6.2 Extracción de DNA .....	29
6.2.1 Extracción de DNA sobrenadante .....	29
6.2.2 Extracción de DNA celular .....	29
6.3 Cuantificación de DNA .....	30
6.3.1 DNA sobrenadante .....	30
6.3.2 DNA celular .....	30
6.4 PCR cualitativo .....	31
6.4.1 Diseño de Oligos .....	31
6.4.2 Amplificación por PCR .....	32
6.5 Clonación de genes .....	32
6.5.1 Miniprep .....	33
6.6 Arresto Celular .....	33
6.7 PCR Tiempo Real .....	34
7. Resultados .....	36
7.1 Niveles de DNA extracelular y potencial metastásico de las células .....	36
7.2 Progresión del ciclo celular y liberación de DNA extracelular .....	39
7.3 Identificación de secuencias oncogénicas en DNA extracelular .....	41
8. Discusión .....	45
9. Conclusiones .....	55
10 Bibliografía .....	56

11 Anexo I: técnicas .....	62
9 Anexo II .....	66

## **1 Resumen**

Antes de que el modelo de la doble hélice de DNA propuesto por Watson y Crick fuera dilucidado, Mendel y Metáís reportaron la existencia de DNA en circulación. Este fenómeno no recibió más atención y no fue retomado hasta después de 3 décadas de su descubrimiento. Durante los años 70's y 80's los estudios de algunos grupos de investigación hallaron que la cantidad de DNA en plasma y suero de personas con enfermedades autoinmunes y cáncer es mayor que en individuos normales y se enfocaron a investigar el origen del DNA extracelular, sin embargo a partir de los años 90's el estudio de éste fenómeno se centró en su aplicación clínica como factor pronóstico y diagnóstico de enfermedades, principalmente en cáncer.

La importancia biológica del DNA en circulación ha recibido poca atención. En el presente trabajo hemos demostrado en líneas celulares que la cantidad de DNA extracelular está relacionado con el potencial metastático de las células, además de encontrar indicios claros de que el DNA fuera de la célula es producto de una secreción activa por parte de la célula y que existe una presencia diferencial de secuencias génicas hacia el medio extracelular siendo éstas principalmente de tipo oncogénico.

## 2 Introducción

### 2.1 DNA

El material genético de todos los organismos conocidos son los ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA); estas moléculas portan y transmiten la información genética en todos los organismos y participan activamente en la lectura y transmisión de información almacenada dentro de la célula, de una célula a otra y de generación en generación (Lehninger, 2001).

El flujo de la información genética constituye el dogma central de la biología, los flujos que ocurren en la mayor parte de los organismos son de DNA a DNA, de DNA a RNA y de éste a proteínas, sin embargo también podemos encontrar transmisión de RNA a RNA y de RNA a DNA. La transmisión de información genética de DNA a DNA es llamada replicación, mientras que transcripción es el término utilizado para indicar que el flujo de esta información va de DNA a RNA, finalmente la traducción es el paso de esta información de RNA a proteína (Alberts, 2002).

Los ácidos nucleicos son, desde un punto de vista bioquímico, polímeros lineales o circulares de alto peso molecular cuya unidad estructural son los nucleótidos, los cuales están formados por una base púrica (adenina y guanina) o pirimídica (timina, uracilo y citosina), una pentosa (D-ribofuranosa o 2 desoxi-D-ribofuranosa) y un fosfato. El DNA es un polímero formado por dos cadenas complementarias y constituídas por las bases adenina, guanina, timina y citosina y la pentosa 2-desoxi-D-ribofuranosa; mientras que el RNA es un polímero de una sola cadena compuesta por las bases adenina, guanina, citosina y uracilo y la pentosa D-ribofuranosa. (Voet y Voet, 1995).

Aunque en 1868 Miescher logró aislar el DNA por primera vez (Saenger, 1984) fue hasta 1944 con los experimentos de transformación genética de *Streptococcus pneumoniae* de

Avery, Mac Cleod y Mac Carty que se demostró su función como molécula transmisora de la información genética en los organismos.

En 1953 James Watson y Francis Crick propusieron el modelo de la doble hélice para el DNA según el cual la doble hélice del DNA está formada por dos cadenas de polidesoxirribonucleótidos que se enrollan con giro hacia la derecha alrededor de un eje central formando una hélice de  $20 \text{ \AA}$  de diámetro; las cadenas son antiparalelas, de modo que los enlaces fosfodiéster  $C3' - C5'$  de cada una están orientados en direcciones opuestas (Lewin, 2000).

Las bases púricas y pirimídicas son hidrofóbicas por lo que se encuentran en el centro de la hélice y las cadenas de pentosa-fosfato se encuentran en la periferia; las bases son planas por la resonancia de los dobles enlaces de sus anillos aromáticos y se localizan casi perpendiculares al eje de la hélice, la cual contiene 10 pares de bases (pb) por cada vuelta con un giro de  $36^\circ$  por cada par de bases. La interacción de las bases nitrogenadas de cada cadena se lleva a cabo de forma complementaria a través de puentes de hidrógeno, de modo que una base púrica se une a una base pirimídica, lo que hace constante el diámetro de la hélice ( $20 \text{ \AA}$ ). Los pares formados corresponden a adenina (A) - timina (T) y guanina (G) - citosina (C) de tal forma que una cadena tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de la otra cadena. La estructura de los ácidos nucleicos se encuentra estabilizada por efecto hidrofóbico de las bases nitrogenadas, fuerzas de van der Waals entre las bases apiladas, puentes de hidrógeno entre bases complementarias e interacciones iónicas e hidrofílicas de los ácidos con iones y el medio acuoso; estas interacciones se ponen de manifiesto en la desnaturalización y renaturalización del DNA (Lehninger, 2001; Voet y Voet, 1995).

En su estado nativo, el DNA presenta un espectro de absorción en el ultravioleta que va de 230 a 300 nm con un pico máximo en 260 nm, que se debe a las propiedades de los anillos aromáticos de sus bases púrica y pirimídicas. Si una solución de DNA es sometida a altas temperaturas, la estructura de doble enlace se desestabiliza, las dos cadenas

complementarias se separan y enrollan al azar lo cual produce desorganización de las interacciones que mantienen la estructura de DNA y se produce un aumento del 40% en su absorción UV en todas las longitudes de onda a lo que se conoce como efecto hipercrómico (Voet y Voet, 1995).

En un organismo la información genética que le define se encuentra codificada en genes, que son segmentos de DNA que contiene información para la síntesis de una proteína (Lewin, 2000). Los genes llevan esta información en una secuencia lineal de nucleótidos, el número posible de secuencias de nucleótidos que puede haber en un DNA de  $n$  nucleótidos es  $4^n$  por lo que la variedad biológica es muy grande y cada organismo puede poseer una secuencia única con respecto a otros.

## **2.2 Cromatina**

En las células el DNA está organizado en estructuras compactas. El genoma de procariontes, generalmente, se encuentra en una sola molécula circular de DNA mientras que el genoma de organismos eucariontes se halla distribuido en varias moléculas de DNA denominados cromosomas. Los cromosomas de eucariontes se encuentran compuestos por cromatina la cual es un complejo de DNA, RNA y proteínas, y son entidades dinámicas cuya estructura en el núcleo varía de acuerdo a la fase del ciclo celular (Lewin, 2000; Jiménez, 2003).

Los cromosomas no son visibles durante interfase (etapa del ciclo celular de actividad transcripcional y duplicación del DNA), durante ésta pueden observarse algunos cúmulos de cromatina cuyo tamaño y disposición varía de acuerdo al nivel de compactación de ésta. Citológicamente, pueden distinguirse dos tipos de cromatina: una variedad menos densa llamada eucromatina y una variedad bastante densa llamada heterocromatina. Se sabe que los genes situados en la cromatina compacta o heterocromatina, no se expresan, mientras que los genes que se localizan en la cromatina con arreglo laxo tienen un mayor potencial

de transcripción y por tanto de expresión (Jiménez, 2003). Existen dos tipos de heterocromatina, la heterocromatina facultativa que contiene regiones del cromosoma que pueden estar activas en algunas formas celulares o inactivas en otros tipos celulares del mismo organismo; y la heterocromatina constitutiva, que corresponde a regiones cromosómicas siempre compactas en todas las células del organismo (Alberts, 2002).

El componente proteico de la cromatina comprende un poco más de la mitad de la masa total y son en su mayoría histonas. Existen 5 clases de estas proteínas: Histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4. La masa de estas proteínas oscila entre 11 y 21 kd y poseen una gran proporción de residuos cargados positivamente, aproximadamente uno de cada cuatro aminoácidos que las compone es lisina o arginina; esta característica les permite unirse al DNA cargado negativamente por los grupos fosfato. Cada una de las histonas puede presentar modificaciones post-traduccionales de determinadas cadenas laterales de los aminoácidos que las conforman, de modo que se encuentran acetiladas, metiladas, ADP-ribosiladas o fosforiladas. Estas modificaciones resultan en la modulación de la carga, la capacidad de formar puentes de hidrógeno y la estructura de las histonas, que juegan un papel importante en el empaquetamiento del DNA así como la regulación de su replicación y transcripción (Stryer, 1995).

El 1974, Roger Kornberg, propuso que la cromatina estaba constituida por unidades repetitivas, cada una de las cuales constaba de 200 pb de DNA y de dos histonas de los tipos H2A, H2B, H3 y H4; a estas unidades repetitivas les llamó nucleosomas, La mayor parte del DNA está enrollado por el exterior del núcleo (core) de histonas, el resto une los nucleosomas contiguos y contribuye a dar flexibilidad a la fibra de cromatina y es llamada conexión (linker) (Voet, 1995; Stryer, 1995).

El DNA contenido en cada núcleo del nucleosoma oscila entre 160 y 240 pb entre diferentes organismos. Experimentos con nucleasa micrococcal demuestran que los nucleosomas pueden digerirse hasta llegar a una partícula núcleo de alrededor de 140 pb independientemente de la cantidad inicial de DNA del nucleosoma. Este DNA de 140 pb es

inaccesible para la enzima en su enlace forfodiéster ya que se une a un octámero de histonas constituido por 2 histonas de cada tipo (Lewin, 2000).

A través de análisis con rayos X y microscopía electrónica, Aarón Klug y John Finch dieron a conocer que el núcleo nucleosómico es una partícula aplanada de  $110 \times 110 \times 55 \text{ \AA}$ ; donde los 140 pares de bases se encuentran enrollados por fuera de las histonas para formar una vuelta y  $\frac{3}{4}$  de superhélice levógira con un paso de  $28 \text{ \AA}$ . Estudios subsecuentes sugirieron que el tetrámero formado por dos pares histonas H3 y dos H4 ocupa el centro del nucleosoma flanqueado en cada extremo por un dímero de H2A-H2B (Voet, 1995).

Los contactos entre DNA e histonas ocurren aproximadamente cada vuelta de la doble hélice de DNA, y están restringidos a la cara interna de la superhélice; los contactos más importantes se producen entre el tetrámero H3-H4 y la parte central de la doble hélice de DNA. Las histonas pueden interactuar con la mayor parte de las secuencias de DNA lo que permite mantener un dispositivo de empaquetamiento adecuado. Por otro lado los dímeros H2A-H2B están sujetos a cada terminal expuesta del tetrámero H3-H4 y su unión con los últimos semigiros de la superhélice estabiliza más al núcleo del nucleosoma. La disociación de un nucleosoma, evento necesario para acceder al DNA, es posiblemente iniciada por la separación de un dímero H2A-H2B. El enrollamiento del DNA alrededor de un núcleo de nucleosoma contribuye al empaquetamiento del DNA porque disminuye su longitud; el grado de empaquetamiento del DNA en nucleosomas disminuye aproximadamente 7 veces la longitud de la cadena. La replicación *in vivo* del DNA en eucariontes está acompañada por el empaquetamiento de las cadenas resultantes en cromatina. Aparentemente, los octámeros presentes en el DNA parental son distribuidos, azarosamente entre las cadenas hijas, se ha visto que estos octámeros durante la replicación del DNA permanecen unidos a la cadena original y posteriormente se distribuyen entre las cadenas generadas, de modo que los nucleosomas permiten el paso de la maquinaria de replicación o son transferidos, a la cadena hija frente al avance del asa de replicación (Jiménez, 2003; Voet, 1995; Lewin, 2000).

La histona H1 interviene en el siguiente nivel de organización del cromosoma, ya que funciona como puente entre nucleosomas adyacentes. La H1 está localizada en la parte externa del nucleosoma, cerca del DNA enlazante donde interacciona con las subunidades H2A de cada nucleosoma. La H1 se separa del DNA cuando este es recortado de 160 a 140pb, esta proteína difiere en su estequiometría con respecto al resto de las histonas ya que existe una molécula por nucleosoma frente a las dos de cada una de las otras histonas. Es conocido que la histona H1 es fosforilada antes del comienzo de la mitosis y desfosforilada cuando ésta termina, lo cual implica que esta modificación covalente regula la capacidad de compactación del DNA (Stryer, 1995).

La estructura de la cromatina estabilizada por la histona H1 se conoce como solenoide, el cual posee alrededor de 6 nucleosomas por vuelta y una inclinación de  $11 \text{ A}^\circ$  equivalente al diámetro de un nucleosoma. Este modelo es consistente con el patrón de difracción de rayos X del filamento de  $300 \text{ A}^\circ$ , el cual posee un grado de compactación de aproximadamente 40.

El plegamiento de estos solenoides en forma de lazos parece ser el siguiente nivel de compactación de la cromatina y se ha propuesto que una serie de proteínas no histónicas estabilicen en los cromosomas estructuras de orden superior. De esta forma los cromosomas en metafase muestran un armazón proteico central rodeado de lazos muy largos de DNA (los cuales posiblemente se hallan unidos al armazón) donde pueden observarse lazos que entran y salen del mismo punto, con una longitud de 15 a  $30 \mu\text{m}$ , lo que corresponde de 40-95 kb que al ser condensados como filamentos de  $300 \text{ A}^\circ$  pueden medir  $0.6 \mu\text{m}$ . La presencia de topoisomerasa II en este andamiaje indica que los cambios en el superenrollamiento son importantes ya que alteran la arquitectura y accesibilidad de segmentos largos de DNA durante la división celular (Jiménez, 2003; Lewin, 2000).

## 2.3 Cáncer

La habilidad de las células para producir réplicas exactas de sí mismas es un componente esencial de la vida. El comportamiento normal de las células en organismos multicelulares está controlado por una compleja red de rutas de señalización que asegura que las células proliferen solo cuando el organismo lo requiere. La maquinaria molecular utilizada para controlar el ciclo de división celular es altamente organizada y conservada a través de la evolución. El cáncer surge por alteraciones en el DNA que resultan en aumento del número de células (Collins, 2001) y ocurre cuando la regulación del crecimiento en células normales se rompe, usualmente por defectos en mecanismos de señalización (Downward, 2003).

Cáncer es el término aplicado a las neoplasias que desde un punto de vista clínico presenta características biológicas similares como son la capacidad de invadir y destruir los tejidos vecinos, la resistencia al tratamiento y la capacidad de producir metástasis que finalmente es la causa de muerte en la mayoría de los casos. Estas características clínicas son el reflejo de que las células tumorales han perdido la capacidad de regulación de los procesos de proliferación, diferenciación, adhesión, migración, angiogénesis y muerte celular programada (Hakem, 2001; Cotran, 1999).

Desde el punto de vista puramente celular, el cáncer se considera una enfermedad genética en el sentido de que las células originalmente alteradas dan origen a células hijas que poseen y continúan transmitiendo las alteraciones en sus genes (Dutta, 1997).

La etiología del cáncer es multifactorial. En términos generales se puede concluir que factores ambientales o exógenos dentro de los cuales se encuentran los agentes químicos, físicos y biológicos (infecciones virales y parasitarias) actuando en conjunto con factores endógenos como son la constitución genética (genes del metabolismo a xenobióticos y genes de reparación del daño al DNA), y factores endocrinos contribuyen a la generación de alteraciones en el genoma de las células. Estas alteraciones se van acumulando hasta que

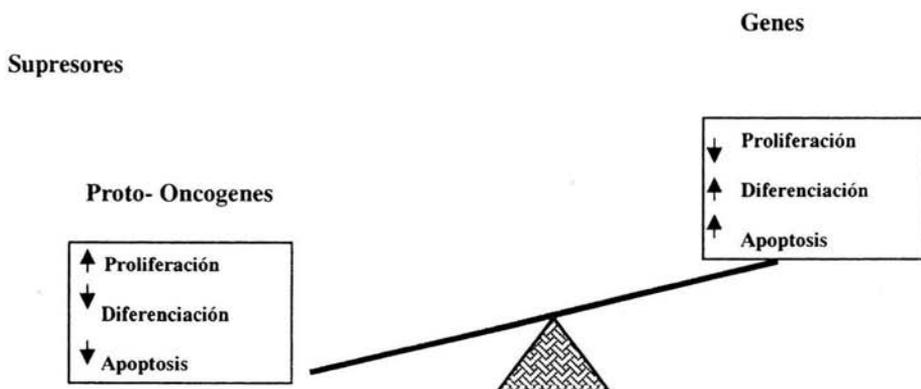
las células adquieren el fenotipo tumoral que alcanza su máxima plenitud cuando los tumores invaden localmente, se diseminan a distancia y adquieren resistencia al tratamiento (Cotran, 1999).

El estudio de la carcinogénesis es complejo. En un afán simplista, se han desarrollado modelos de carcinogénesis basados inicialmente en observaciones de que ciertos agentes químicos y físicos pueden producir cáncer. El desarrollo del cáncer ocurre a través de la interacción de las células y estos agentes, en un lapso de tiempo variable. Así el modelo actual de carcinogénesis implica en una primera etapa (iniciación) la interacción de un agente carcinógeno con las células, el cual se comporta como iniciador al producir daño a DNA; posteriormente otros agentes llamados promotores actúan sobre las células ya “iniciadas” y el daño al material genético se transmite de generación en generación expandiendo de manera clonal, el número de células susceptibles a adquirir más daños en su genoma; finalmente, con la interacción o no de otros agentes, sucede la progresión, etapa en la que la acumulación de daños al material genético permite el establecimiento de una neoplasia de carácter maligno (de Vita, 2001; Jiménez, 2003).

### ***2.3.1 Biología del cáncer***

El estudio de la carcinogénesis ha permitido generar hipótesis sobre la biología tumoral y así proponer modelos de su desarrollo. El principio fundamental del cáncer es que es un fenómeno de múltiples pasos. Es decir, las alteraciones genéticas se van acumulando y diversificando lo que en un sentido “Darwiniano” van proporcionando a la célula tumoral ventajas evolutivas de tal manera que finalmente, la población que ha adquirido mayores “ventajas” genotípicas y fenotípicas es la que produce en sí los tumores malignos.

## CÁNCER. Bases Moleculares



La carcinogénesis es un proceso multifactorial tanto a nivel fenotípico como a nivel genotípico.

**Fig. a.** El cáncer se puede originar por un desbalance en las funciones de los Oncogenes y Genes supresores debido a alteraciones genéticas que permiten la activación oncogénica de los proto-oncogenes y la inactivación de la función de los genes supresores. Este desbalance, en el que ganan peso los oncogenes, induce a un aumento en la proliferación celular y consecuentemente, una disminución en la diferenciación y en la tasa de apoptosis, favoreciendo así el desarrollo del cáncer (de Vita, 2001).

Para facilitar el estudio de la biología tumoral, los genes que intervienen en su origen y desarrollo se han clasificado como genes del cáncer que se dividen en oncogenes (causantes del cáncer) que derivan de protooncogenes –genes que promueven la diferenciación y crecimiento normal de la célula- y los genes supresores de tumores –genes que regulan de manera negativa el crecimiento celular- (Cotran, 1999). Es lógico suponer entonces, que tanto unos como los otros, dentro de una célula normal se encargan de

regular funciones importantes como son la proliferación celular, diferenciación, migración, adhesión, formación de nuevos vasos, sistema inmune y muerte celular programada. En la tabla 1 se muestran la localización celular y función de diversos genes cuya participación en el desarrollo de cáncer ha sido estudiada.

La activación de los oncogenes puede ocurrir por cambios en la propia estructura del gen que da como resultado la producción de una proteína anormal, o por cambios en la regulación de la expresión génica dando lugar a una producción inapropiada, en cantidad, del producto del gen (Cotran, 1999; Maki, 2002; de Vita 2001). En el caso de los genes supresores mecanismos semejantes pueden desactivar la función de éstos (de Vita 2001) (Fig. b)

**Tabla 1.** Lista de algunos de los oncogenes y genes supresores más estudiados. En el cuadro se indica la localización celular del producto proteico de los oncogenes y genes supresores así como la función mas importante que se conoce para cada uno de ellos (Cotran, 1999; Kanduc, 2002; de Vita, 2001)

### ***I. PROTO-ONCOGENES***

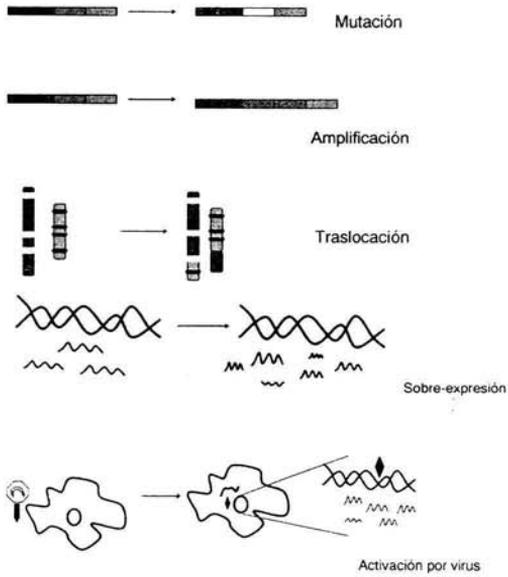
<b>Gen</b>	<b>Localización Celular</b>	<b>Función</b>	<b>Proteína que codifica</b>
<i>erb-A</i>	Nuclear	Receptor	Receptor de la hormona Tiroidea
<i>erb-B</i>	Membrana plasmática	Tirosina-Cinasa	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
<i>fms</i>	Membrana plasmática	Receptor	Receptor del CSF-1
<i>sis</i>	Membrana plasmática	Receptor	PDGF-R
<i>ros</i>	Membrana plasmática	Receptor	Receptor de Insulina
<i>src</i>	Citoplasma	Tirosina-Cinasa	Cinasa
<i>abl</i>	Citoplasma	Tirosina-Cinasa	Cinasa
<i>mos</i>	Citoplasma	Serina-Treonin-cinasa	Cinasa

<i>raf</i>	Citoplasma	Serina-Treonin-cinasa	Cinasa
<i>Ha-ras</i>	Membrana plasmática	GTPasa	Proteína G
<i>K-ras</i>	Membrana plasmática	GTPasa	Proteína G
<i>N-ras</i>	Membrana plasmática	GTPasa	Proteína G
<i>jun</i>	Núcleo	Factor de Transcripción	Factor AP-1
<i>fos</i>	Núcleo	Factor de Transcripción	Factor AP-1
<i>myc</i>	Núcleo	Factor de Transcripción	Myc
<i>rel</i>	Núcleo	Factor de Transcripción	Rel
<i>bcl-2</i>	Núcleo	Gen antiapoptótico	Bcl-2

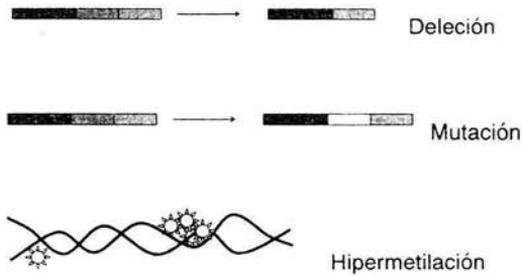
## II. GENES SUPRESORES DE TUMORES

Gen	Localización Celular	Función	Proteína que codifica
<i>rb</i>	Núcleo	Factor de transcripción	pRB
<i>p53</i>	Núcleo	Factor de Transcripción	p53
<i>WT-1</i>	Núcleo	Factor de Transcripción	WT-1
<i>p16</i>	Núcleo	Inhibidor de ciclinas	p16
<i>APC</i>	Citoplasma	Control de adhesión, transmisión de señales	APC
<i>TGFβRII</i>	Membrana	Receptor a factor de crecimiento	TGFβRII

### Proto-oncogenes



### Genes supresores



**Figura b.** Principales mecanismos de activación e inactivación (funcional o estructural) de oncogenes y genes supresores respectivamente.

## 2.4 Metástasis

La metástasis (*methistemi* = remover o dejar libre) es la principal causa de muerte entre los individuos con cáncer. Una de las características que distinguen a las células malignas de las células normales es la capacidad de invadir tejidos adyacentes normales a través de los sistemas linfático y sanguíneo a los órganos distantes, proceso conocido como metástasis. Durante este proceso las células tumorales abandonan el tumor primario y colonizan órganos blanco (Chambers, 2002).

El modelo que hasta el momento explica la metástasis se basa en ensayos experimentales de animales en los que líneas celulares poco metastásicas pueden desplegar una gama de variantes altamente metastásicas. Este modelo sostiene que la mayor parte de las células que constituyen el tumor primario poseen un potencial metastásico bajo. Se ha estimado que algunas células, alrededor de una en diez millones, adquieren capacidad metastásica a través de mutaciones somáticas (Bergers, 2003)

El desarrollo de la diversidad biológica en células tumorales es atribuido a la inestabilidad genética, que permite altas tasas de mutación y el establecimiento de una población celular heterogénea. Las tasas de mutación elevadas favorecen la alteración de genes que confieren capacidades metastásicas a estas células. Para varios tipos de tumores, la población celular neoplásica debe expandirse considerablemente antes de que los procesos metastásicos e invasivos ocurran, esta expansión puede ser clonal y limitada principalmente a una subpoblación de células malignas más agresiva, a lo que se conoce como dominancia clonal. El fenotipo de las células metastásicas está dado por la habilidad de migrar a partir del tumor primario, sobrevivir en circulación sanguínea o linfática e invadir tejidos distantes estableciendo nódulos metastásicos (Friedl, 2003). La metástasis ha sido descrita como una serie compleja de procesos secuenciales que involucran (Patterns, 2003):

- Evento transformante inicial o activación de oncogenes
- Proliferación de las células transformadas
- Establecimiento de una extensa red de capilares (angiogénesis) por liberación de factores angiogénicos si la masa tumoral excede los 2mm de diámetro
- Invasión y destrucción local de los componentes de la matriz extracelular y células parenquimatosas
- Migración de las células tumorales fuera de la masa tumorigénica primaria
- Penetración de las células malignas a través de las paredes de los vasos sanguíneos
- Embolización de pequeños agregados celulares, la mayor parte de las células son destruidas
- Arresto celular en el lumen de los vasos sanguíneos o linfáticos
- Las células quedan atrapadas en los capilares de órganos
- Extravasación de las células tumorigénicas en órganos blanco
- Formación de masa tumorigénica secundaria

Las células establecidas en un tumor secundario pueden invadir la matriz extracelular penetrar vasos sanguíneos o linfáticos y entrar a circulación para producir nuevas metástasis, a lo que se ha llamado “metástasis de metástasis” (Wolf, 2003).

A nivel citológico el proceso de metástasis ha sido ampliamente estudiado, no así a nivel molecular, aunque ya se cuentan con algunos estudios de expresión génica en nódulos metastásicos y líneas celulares con capacidad de metástasis. El desarrollo de metástasis involucra múltiples interacciones entre las células malignas y el microambiente hospedero, por lo que se ha propuesto que la expresión génica en las células malignas cambia durante la metástasis. (Steege, 2003).

El papel de diferentes componentes celulares ha sido investigado a fin de caracterizar cada uno de los eventos involucrados en la metástasis. Uno de los factores celulares más

importantes en el desarrollo de las metástasis, son las moléculas de adhesión celular. Se ha observado que las moléculas de adhesión dependientes de Calcio (CAM) de la familia caderina poseen un papel represor en el proceso metastásico. Se han identificado tres tipos de caderinas en mamíferos (E-caderina, P-caderina y N-caderina) y demostrado que su expresión se encuentra disminuida en células malignas lo que permite la pérdida de la adhesión intercelular. La caderina-E es una proteína de 120 kDa con un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular, este último se encuentra conectado a un grupo de proteínas denominado cateninas, las cuales funcionan como refuerzo de la capacidad adhesiva de la caderina-E al conectarse con el citoesqueleto por medio de su unión a actina, esta interacción sugiere que caderina-E puede estar implicada en transducción de señales. Se ha reportado también que la expresión de proteínas de la familia catenina es anormal en células malignas, miembros de la superfamilia de Inmunoglobulinas (Ig) han sido estudiadas por su papel putativo en invasión relacionada a adhesiones célula-célula homotrópicas (Patterns, 2003).

Otro tipo de moléculas implicadas en la metástasis son las proteínas integrales de membrana, las cuales se unen a componentes específicos de la matriz extracelular (ECM). Las integrinas son receptores heterodiméricos para moléculas de adhesión, cada receptor puede unirse a más de un componente de la MEC (matriz extracelular) y el citoesqueleto, además de que existe señalización entre integrinas y proteasas. En melanoma se ha identificado un incremento en el número de receptores para vitronectina (avb3 integrin), el cual ha sido correlacionado positivamente con la producción de la forma activa de la metaloproteínasa MMP-2 y una elevada expresión de los niveles de mRNA de MT-1-MMP y TIMP-2, además la sobre-expresión de este receptor parece ser necesaria para una migración eficiente de las células de melanoma por vitronectina y fibronectina (Kalluri, 2003).

Varios factores de movilidad han sido descritos para las células malignas, incluyendo el factor autócrino de movilidad (AMF) el cual estimula la quimioquinesis y la quimiotaxis de las células de melanoma en un diseño autócrino: el ligando para el receptor codificado por

el gen c-met (Scatter factor/hepatocyte growth factor) que puede actuar como un factor de crecimiento positivo o negativo; TGF- $\alpha$  y EGF, ligandos de EGFR; y los factores de crecimiento tipo insulina que estimulan la quimiocinesis y la quimiotaxis, entre otros (Kalluri, 2003; Rosso 2002; Hendrix, 2003).

La matriz extracelular representa una barrera física que las células metastásicas deberán ser capaces de traspasar para poder migrar. Se han descrito al menos cuatro tipos de proteinasas y metaloproteinias (serina, cisteína, aspártico) involucradas en el proceso invasivo. La teoría de invasión por proteinasas está sustentada en el hecho de que células invasivas normales como los macrófagos y las células del trofoblasto producen niveles elevados de proteinasas en comparación con células no invasivas. Las metaloproteinias son una familia de endopeptidasas dependientes de metales, que una vez activadas degradan una gran variedad de componentes celulares. Se han purificado MMPs secretadas de tumores con especificidad para colágenas intersticiales (tipo I-III), membrana basal (tipo IV) o colágena (tipo V). La transformación de hiperplasia preneoplásica a carcinoma ha sido asociada con un incremento en la actividad de MMP, por lo que se ha propuesto que esta transformación involucra penetración del tumor en la membrana basal que rodea los vasos sanguíneos mediada por gelatinasa A y B (Hendrix, 2003; Rosso, 2002).

El establecimiento de nuevos vasos sanguíneos en cáncer es necesario ya que permite el crecimiento de la masa tumoral, debido a que el aporte de oxígeno empieza a ser un factor limitante. El factor de crecimiento endotelial y permeabilidad vascular (Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability) está considerado como el factor responsable de la angiogénesis tumoral, es decir el establecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Bergers, 2003). La remodelación de la membrana basal de los vasos sanguíneos ocurre al inicio de la angiogénesis y parece ser dependiente de la activación de metaloproteinias en la matriz extracelular, principalmente gelatinasa A y colágenasa intersticial. La angiogénesis tumoral requiere de la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea a los vasos sanguíneos; la quimiotaxis celular hacia el estímulo angiogénico; la proliferación de células endoteliales y la remodelación de la membrana basal conforme los nuevos vasos

sanguíneos se forman. Se han identificado una gran variedad de factores reguladores de angiogénesis, tales como VEGF/VPF, FGFs, angiopoietin, EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PGE2, TNF- $\alpha$ , PD-ECGF, angiogenina e IL-8. De estos factores VEGF/VPF y los FGFs son considerados los estimuladores más importantes de la angiogénesis en cáncer (Friedl, 2003).

## **2.5 DNA circulante**

La presencia de ácidos nucleicos en plasma sanguíneo de seres humanos fue reportado hace más de 55 años por Mendel y Métais, quienes en 1948 reportaron el aislamiento de RNA y DNA, a través del método de precipitación con ácido perclórico, a partir de plasma de sujetos normales y pacientes que presentaban varias enfermedades. La cantidad obtenida de DNA en estos ensayos fue aproximadamente de 1mg/l, el equivalente a 1 $\mu$ g/ml (Anker, 1999). El siguiente reporte de la presencia de ácidos nucleicos en componentes sanguíneos fue hasta los años 1960's cuando Tan y colaboradores aislaron DNA a partir de suero de pacientes con Lupus eritematoso sistémico (SLE) (Tan, 1966). Otros estudios demostraron que en pacientes con otro tipo de enfermedades principalmente de tipo inflamatorio tales como glomerulonefritis, artritis reumatoide, pancreatitis, colecistitis, úlceras pépticas, hepatitis y esofagitis presentaban DNA en suero (Koffler et al, 1973; Steinman, 1975; Li, 1989; Rumore, 1990). Los niveles encontrados en sujetos normales fueron de 10-30 ng/ml en plasma, mientras que en individuos con alguna de estas enfermedades sobrepasaba los 100 ng/ml (Steinman, 1975).

### ***2.5.1 DNA circulante en pacientes con cáncer***

En 1975 Leon y colaboradores reportaron la presencia de DNA en sangre en pacientes con cáncer, los niveles encontrados fueron mayores que aquellos reportados para enfermedades no malignas. La cuantificación del DNA circulante en estos pacientes se realizó a través de radionunoensayos utilizando el suero de pacientes con Lupus Eritematoso como fuente

de anticuerpo contra el DNA. La concentración de este ácido nucleico en individuos sanos fue de 13 ng/ml mientras que en pacientes con cáncer la media fue de 180ng/ml, aunque no se correlacionó el nivel de DNA encontrado en circulación con el tamaño y sitio del tumor primario, se encontraron altos niveles de DNA en el suero de pacientes con metástasis en comparación con los niveles encontrados en pacientes con tumor localizado. Los niveles de DNA en los pacientes cuyos tumores respondieron a la radioterapia disminuyeron hasta en un 90% principalmente en pacientes con tumores de pulmón, ovario, útero y cervix uterino, adicionalmente se encontró que en pacientes sin respuesta a tratamiento los niveles de DNA no se alteraron (Leon, 1975, Leon, 1977).

### ***2.5.2 Origen tumoral del DNA circulante en pacientes con cáncer***

La caracterización biofísica de DNA de células malignas hecha por Beljanski y colaboradores en 1981, muestra que las propiedades generales del DNA se encuentran alteradas, particularmente la estabilidad de la doble hélice se encuentra disminuida y por tanto la exposición de este DNA inestable a carcinógenos químicos permite separar la doble cadena y registrar un aumento en absorbancia con luz UV a lo que se conoce como efecto hipercrómico. Las primeras evidencias del origen tumoral del DNA circulante se derivaron de estas observaciones. Por ejemplo, el DNA extraído de plasma de pacientes con cáncer presenta un efecto hipercrómico a temperatura ambiente cuando los carcinógenos se añaden, tal como ocurre con DNA de células malignas, lo que permitió establecer que al menos un parte del DNA que se encuentra en circulación pertenece a las células tumorales (Stroun, 1989).

Evidencias mas recientes del origen tumoral del DNA circulante en pacientes con cáncer se derivan de estudios reportados en la década de los noventa en donde se encuentra que el DNA circulante presenta las mismas alteraciones genéticas (mutaciones, pérdida de heterocigosis, microsátélites, etc.) que el tumor primario. El primer estudio de éste tipo se realizó en pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemias agudas donde se detectaron mutaciones en *N-ras* en el DNA circulante (Vasioukhin, 1994). En un estudio posterior en

pacientes con adenocarcinoma pancreático se detectó la mutación del gen *K-ras* (Sorenson, 1994). A partir de estos estudios se han reportado la presencia de alteraciones epigenéticas y genéticas en el plasma y suero de pacientes con cáncer (Tabla 3) (Ziegler, 2002).

**Tabla 3.** Mutaciones encontradas en los genes *ras* y *p53* en DNA circulante aislado de plasma o suero en pacientes con diferentes tipos de cáncer ( Ziegler, 2002). MDS (síndrome mielodisplásico); AML (Leucemia mieloide aguda).

Gen	Tipo de cáncer	Fuente	Correlación clínica
<i>ras</i>	MDS	Plasma y suero	Correlación con estadios del tumor
	AML		Potencial para detección temprana
	Páncreas	Plasma y suero	Asociación con riesgo de cáncer colorectal
	Colorectal		Potencial para detección temprana
	Gastrointestinal	plasma	
<i>p53</i>	Mama	plasma	Correlación con tamaño y estadio del tumor; metástasis a nódulos linfáticos y estado de receptores estrógeno
	Hígado	plasma	Potencial para diagnóstico temprano
	Colorectal	plasma	Potencial para detección de tumores pequeños

Otro tipo de ácidos nucleicos encontrados en circulación en pacientes con cáncer es DNA viral, el cual pertenece a agentes etiológicos relacionados con cáncer como son el virus humano de papiloma (HPV) (Dong, 2002) y el virus Epstein Barr (EBV). Se ha propuesto que las secuencias virales encontradas en plasma sanguíneo tienen origen en células que, posterior a la infección viral, han sufrido procesos apoptóticos o que liberan activamente DNA al medio extracelular. EBV se ha asociado con el desarrollo de diversos tipos de carcinoma especialmente nasofaríngeo, el cual es frecuente en Asia, y se ha detectado en

siero y plasma de alrededor de 60% de los pacientes (Shotelersuk, 2000). Se ha observado también que los pacientes que responden a radioterapia no presentan DNA viral en plasma mientras que aquellos con regresión incompleta del desarrollo de metástasis mantienen los niveles de DNA viral en circulación (Lo, 1999).

## **2.6 Mecanismos de liberación del DNA por los tumores**

Los trabajos anteriormente mencionados permitieron definir que en los pacientes con cáncer, al menos una proporción importante del DNA circulante se origina de las células tumorales, sin embargo se desconoce la manera en la cual este DNA es expulsado de la célula.

Se ha planteado que este DNA tumoral podría derivarse de la lisis de las células malignas en circulación, de las células apoptóticas, o alterativamente que es liberado por células malignas viables. Estos supuestos mecanismos no serían excluyentes y podría ser posible que se originara por una combinación de ellos (Ziegler, 2002).

### *2.6.1 Lisis de células malignas en circulación.*

La propuesta de que el DNA extracelular tiene su origen en la lisis de células malignas en circulación, se apoya en las observaciones de los altos niveles de DNA en circulación que se han encontrado en pacientes con neoplasias avanzadas y/o metastásicas en donde puede esperarse que exista una mayor probabilidad de células malignas circulantes. Sin embargo estos hallazgos no justifican los niveles de DNA en plasma encontrados en las primeras etapas de la enfermedad, que si bien, no son tan elevados como en las etapas finales, si superan por mucho los niveles en individuos normales. Otro argumento en contra de esta hipótesis, es que la cantidad de DNA encontrada en plasma no corresponde con la cantidad de células en circulación. La relación calculada por Sorenson con relación a la cantidad de

DNA en plasma de pacientes con cáncer de páncreas estima que si el origen de éste es la lisis de células en circulación, entonces debería haber cerca de mil células por mililitro de plasma, lo cual sobrepasa por mucho el número de células encontradas en circulación (Anker, 1999).

### *2.6.2 Apoptosis de células malignas*

En los últimos años se ha dado gran énfasis a la posibilidad de que el DNA en circulación tenga su origen en procesos de muerte celular programada o apoptosis, diferentes características de este DNA apuntan a su origen apoptótico. El DNA aislado de plasma de individuos normales y analizado mediante electroforesis, presenta bandas de tamaño equivalente a múltiplos de 1 a 5X de DNA nucleosomal lo que corresponde de 185-1000 pb. Además el DNA extraído de plasma de pacientes con cáncer de páncreas muestra un patrón de andamiaje más pronunciado. Con base en estos datos, se sugirió que la mayor parte del DNA en circulación proviene de células neoplásicas apoptóticas (Anker, 1999; Ziegler, 2002)

Por otra parte, estudios realizados con la técnica de ELISA, utilizando un anticuerpo contra la fracción del DNA y otro contra la fracción histona del nucleosoma han demostrado que una proporción del DNA circulante existe en forma de nucleosomas (Fournié, 1992; Kuroi, 2001; Trejo-Becerril, 2003). Un hallazgo general de esos estudios es que la cantidad de nucleosomas en circulación es mayor en individuos con cáncer que en personas sanas o con enfermedades inflamatorias y que existe una correlación entre el estadio clínico o la carga tumoral con el nivel de nucleosomas. Aunado a que después del tratamiento, ya sea quimioterapia o radioterapia, existe un rápido incremento del número de nucleosomas, lo que probablemente refleja muerte celular en respuesta al tratamiento, para después (entre uno y siete días) ocurrir una disminución de los niveles en aquellos pacientes que responden a la terapia instituida. Por otro lado, en un modelo murino se ha demostrado que los nucleosomas se originan de células tumorales ya que los niveles se incrementan en

aquellos animales a los cuales se les ha injertado un tumor en comparación con aquellos sin tumor (Trejo-Becerril, 2003 ).

### *2.6.3 Liberación de DNA por células malignas viables.*

La liberación de DNA por células malignas viables es una hipótesis atractiva, sin embargo, la información existente es menor. Esta propuesta surgió desde hace varios años basada en estudios en los que se describió la liberación de DNA por linfocitos activados con fitohemaglutinina. La activación por fitohemaglutinina induce la replicación selectiva de solo una parte del genoma, la cual es liberada mayoritariamente al medio extracelular, en tanto que una porción menor se une a la membrana plasmática (Rogers, 1972; Distelhorst, 1979; Rogers, 1981). Aunque se ha explorado poco esta posibilidad, si las células son capaces de secretar DNA al ambiente extracelular, esta capacidad no está limitada a las células tumorales, ya que en individuos normales se ha encontrado DNA en plasma en niveles bajos. Un estudio reciente reporta el hallazgo de secuencias pertenecientes al cromosoma Y en suero y plasma de pacientes que han recibido trasplantes de médula ósea y que el DNA en circulación fue identificado en su mayor parte como perteneciente al donador (Lui, 2002). Observaciones semejantes se han hecho en mujeres embarazadas cuyo producto es de sexo masculino, en quienes se ha detectado el gen SRY del cromosoma Y en circulación en el torrente sanguíneo de la madre (Lo, 1998).

## **2.7 Genometástasis**

La presencia de algunas células tumorales en tejido sano distante al sitio del tumor primario correlaciona clínicamente con el desarrollo de metástasis. El mecanismo por el cual ocurre la metástasis ha sido ampliamente estudiado y aceptado. Sin embargo han surgido estudios que demuestran la ineficiencia de este proceso en la diseminación de cáncer ya que de las células tumorales liberadas a la circulación sólo algunas son capaces de establecer

micrometástasis y pocas de éstas continúan proliferando hasta establecer focos metastáticos (0.01%). Se ha demostrado que cerca del 80% de las células tumorales sobreviven, la sobrevivencia en el torrente sanguíneo va de horas a días, la mayor parte las cuales después de establecerse en el tejido sano entran en latencia. Las pocas células que comienzan a proliferar forman micrometástasis que en muchos casos no llegan a formar focos metastáticos.

Estudios en ratón y embriones de pollo muestran que las células tumorales que llegan a otros tejidos presentan apoptosis en proporciones muy bajas que van de 0-3% mientras que los sitios de micrometástasis presentan muerte celular muy alta de la que alrededor del 90% es por apoptosis y el resto por necrosis. En estudios de metástasis a pulmón en ratón se ha reportado que la distribución de las células tumorales en el tejido sano es aleatoria, no así el desarrollo de focos metastáticos. Aún cuando no se conoce que determina la proliferación preferencial de las células tumorales en tejido sano, se ha podido determinar que la formación de sitios metastáticos es ineficiente (Cameron, 2000; Guba, 2001; Luzzi, 1998; García-Olmo, 2003).

Recientemente García-Olmo y colaboradores con base en sus estudios con células DHD transfectadas con el plásmido pCDNA3.1CAT y la detección de oncogenes en suero y plasma de pacientes con cáncer, sugieren que el DNA que se encuentra libre en plasma sanguíneo puede incorporarse al genoma de otras células y han propuesto la metástasis puede ser resultado de la transfección, de células de órganos distantes al tumor primario, con secuencias oncogénicas presentes en el plasma y que derivan del tumor primario.

Evidencias a favor de la teoría de la genometástasis provienen de varias líneas de investigación desde los años 80's en los que se desarrollaron estudios de transmisión del fenotipo maligno de células tumorales a células normales por transfección con DNA genómico purificado, lo que hace parecer posible que el DNA que se encuentra en circulación pueda entrar directamente en las células. Las lesiones metastásicas pueden ser genéticamente diferentes a los tumores primarios lo cual puede explicarse por una

transfección parcial de las células por el DNA en circulación en tejidos sanos. Se ha reportado también que la administración de desoxirribonucleasas en ratones previene la metástasis a hueso, lo cual apoya la idea de que la transfección de células normales no se lleva a cabo al ser, el DNA en circulación, degradado por estas nucleasas. El grupo de García-Olmo en estudios de metástasis a pulmón ha utilizado el gen CAT como reportero encontrando que se encuentra presente en células de pulmón aún sin encontrar células tumorales las cuales son detectadas frecuentemente en hígado pero no en pulmón. Adicionalmente Ander y colaboradores han descrito la transformación de fibroblastos de ratón mediante la incubación de éstas células con sobrenadante de células SW480 en cultivo. (García-Olmo, 2003; Anker, 1994).

### **3 Justificación**

Ha pasado mucho tiempo desde el descubrimiento de que las células pueden liberar material genético al medio en el que se encuentran (Mendel y Metáís, 1948), el redescubrimiento de este hecho ha llevado a especular sobre el papel biológico de los ácidos nucleicos en circulación y especialmente de su participación en la inducción de cáncer. Philippe Anker ha propuesto que el DNA en circulación tiene una acción transformante (Anker, 1994), y es en este contexto en el que se ha desarrollado el presente trabajo, el cual forma parte de un proyecto general denominado “Importancia del DNA circulante en el desarrollo de cáncer” dirigido a estudiar el papel biológico del DNA en circulación.

## **4 Hipótesis**

Si las líneas metastásicas tienen mayor producción y liberación de material genético, a causa de su rápida proliferación, en comparación con líneas celulares no metastásicas, los niveles de DNA encontrados en el medio o sobrenadantes correlacionarán con su potencial metastásico.

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar si existe una correlación entre la cantidad de DNA liberado al sobrenadante por líneas celulares en cultivo y el potencial metastático de las mismas.

### **5.2 Objetivos particulares**

- I. Demostrar que las líneas metastásicas B16F10 y J20 liberan mayor cantidad de DNA al medio de cultivo, en comparación con sus respectivas líneas parentales B16F0 y N5.
- II. Investigar si la liberación de DNA de células en cultivo se relaciona con el arresto del ciclo celular.
- III. Determinar si existen diferencias con respecto al número de copias y tipo de secuencias oncogénicas, liberadas al medio de cultivo, entre las líneas metastásicas y no metastásicas

## 6 Material y Métodos

### 6.1 Cultivo Celular

Se utilizaron 5 líneas celulares murinas, B16F0, B16F10, N5, C4 y J20. Las líneas B16F0 y B16F10 son células de melanoma, la primera corresponde a la línea parental con bajo potencial metastásico, mientras que B16F10 es la línea derivada con mayor potencial metastásico. Las líneas celulares N5, C4 y J20 son la línea murina NIH3T3 transfectadas con el plásmido pNeo y el gen humano *H-ras*; N5 contiene el plásmido sin la secuencia de interés mientras que C4 fue transfectada con *H-ras* humano normal, y J20 con la versión oncogénica (*H-ras*<sup>v12</sup>).

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en cajas de 75 cm<sup>2</sup> con 10 ml de Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) con suero fetal bovino (SFB) al 10% en una atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5% y una temperatura de 37°C. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 hrs por medio fresco.

De cada línea celular se montaron 6 cajas de 75 cm<sup>2</sup> iniciando con 200 000 células en DMEM SFB 10%, el medio se reemplazó en dos ocasiones cada 48 hrs para posteriormente disminuir la dosis de SFB al 2%. El nuevo medio de cultivo también fue reemplazado cada 48 hrs hasta que las células alcanzaron entre el 70 y 80% de confluencia. A continuación el medio fue colectado y centrifugado en tubos Falcon a 1200 rpm (400 G) durante 10 minutos a fin de precipitar las células que pudieran haberse colectado. El medio recuperado fue filtrado con poro de 0.2 micras y almacenado a 4 °C.

Posteriormente las células fueron despegadas con 2 ml de PBS-EDTA 10 mM y tripsina 0.05% por cada ml de PBS-EDTA utilizado, las células se incubaron alrededor de 5 minutos a 37°C y fueron colectadas y centrifugadas en tubos Falcon a 1500 rpm. El botón obtenido se resuspendió en medio de cultivo y las células fueron cuantificadas por cámara

de Neubauer, además la viabilidad de los cultivos se determinó mediante azul tripano. Las células se centrifugaron nuevamente y el pellet se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **6.2 Extracción de DNA**

### *6.2.1 Extracción de DNA de sobrenadante*

La extracción del DNA del medio de cultivo se llevó a cabo a través de una modificación de la técnica fenol:cloroformo. De cada medio de cultivo recolectado fue aproximadamente de 9 ml, a cada tubo se le colocaron 500  $\mu\text{l}$  se agregó un volumen igual de buffer de lisis más 100  $\mu\text{g/ml}$  de proteinasa K, y se incubaron a  $56^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al final de la incubación se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) . La mezcla fue centrifugada a 7500 rpm durante 10 minutos y la fase superior se recuperó en un tubo nuevo donde se agregó cloroformo en proporción 1:1, se mezcló por vortex y centrifugó a 5000 rpm. Se recuperó nuevamente el sobrenadante y el procedimiento con cloroformo se repitió. Finalmente el DNA se precipitó con incubación a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche con un volumen igual de isopropanol frío y 0.2M de NaCl. El DNA fue empastillado a 14000 rpm durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , el botón obtenido fue limpiado con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% y se dejó secar el botón para ser resuspendió en 100 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O bidestilada.

### *6.2.2 Extracción de DNA celular*

El DNA celular se extrajo por la técnica de fenol:cloroformo. El botón de células obtenido de los cultivos celulares se resuspendió en 4 ml de buffer de lisis y 100 $\mu\text{g/ml}$  de proteinasa K e incubó a  $56^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Después de la incubación se agregó fenol:cloroformo (1:1) y la mezcla fue centrifugada a 7500 rpm durante 10 minutos; la fase superior se recuperó y se llevó a un tubo nuevo al cual se agregó cloroformo en una proporción 1:1. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm y la fase superior nuevamente fue recuperada, se procedió con un segundo tratamiento con cloroformo. El DNA fue precipitado con isopropanol 1:1 y 0.2 M de NaCl, la mezcla fue incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Posterior a

la incubación la mezcla fue centrifugada a 5000rpm durante 10 minutos a 4°C y el botón obtenido se trató con etanol 70% para ser resuspendido en 1 ml de agua bidestilada.

### **6.3 Cuantificación de DNA**

#### *6.3.1 DNA sobrenadante*

La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un fluorómetro mediante el uso de picogreen, el cual es un agente fluorescente de tinción de ácidos nucleicos en solución y detecta hasta 25 pg/mL de DNA de doble cadena. La cuantificación se llevó a cabo por duplicado y el aparato se calibró con una curva de marcador de peso molecular de 1 Kb que incluye los siguientes puntos: 200ng/ml, 100ng/ml, 50 ng/ml, 20ng/ml, 10ng/ml y un blanco.

Se tomaron 5 µl de cada muestra, se llevaron a 30 µl con TE y se agregaron 30 µl de solución picogreen 1:200 diluido en TE, la onda de excitación utilizada fue 465-485 nm y la onda de emisión fue de 515-575 nm.

#### *6.3.2 DNA celular*

El DNA celular que se extrajo por la técnica fenol: cloroformo también fue cuantificado a través de fluorómetro con picogreen utilizando una dilución de 1:3000 en TE. De los DNAs celulares obtenidos se tomó una alícuota y se diluyó 1:100, de esta dilución se tomó una alícuota para diluir 1:30, en 30 µl a las cuales se agregaron 30 µl de solución picogreen 1:200 y se cuantificó por fluorómetro con una onda de excitación de 465-485 nm y la onda de emisión fue de 515-575 nm.

## 6.4 PCR cualitativo

### 6.4.1 Diseño de Oligonucleótidos

Para las líneas murinas de melanoma B16F0 y B16F10 se diseñaron oligonucleótidos específicos para los siguientes genes: *perlecan*,  *$\beta$ -catenina* y *c-Fos*. Para el estudio de las líneas murinas N5, C4 y J20 se utilizaron los primers específicos para H-ras humano reportados por Suzuki (1990). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para exon el 4 del gen constitutivo *dhfr* para ser utilizado como control de un gen constitutivo. El diseño de los oligonucleótidos se realizó en el programa computacional de BIO RAD a partir de las secuencias obtenidas en el genebank y se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Fragmentos amplificados de los genes *c-fos*, *perlecan*,  *$\beta$ -catenina* y *dhfr* en DNA celular y extracelular de líneas celulares murinas y primers utilizados para la PCR.

Gen	Fragmento (pb)	Secuencia (5'-3')
<i>c-fos</i>	129	GACAGCCATCTCCACCAGC
		GCGTAAGCCCCAGCAGAC
<i>perlecan</i>	209	TTGTAAGAGACTGAGGCAAGGC
		CAGGGAAAGGGATGGGAACAG
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	102	CTGAGTGGCAAGGGCAACC
		TACTTGCTCTTGCGTGAAGGAC
<i>dhfr</i>	120	GAGAACCACACGAGGAGC
		AACAGAACTGCCTCCGACTATC

#### 6.4.2 Amplificación por PCR

La amplificación de los distintos fragmentos génicos fue realizada con el kit de amplificación Perkin Elmer, con buffer de PCR 1X, DNTP's 200  $\mu$ M, oligos 0.75  $\mu$ M, DNA 100 ng para DNA celular y 5ng para DNA de sobrenadante, y Taq 2 U por reacción en reacciones de 20  $\mu$ l, la concentración de  $MgCl_2$  fue diferente para cada gen.

El gen *dhfr* fue amplificado en DNA celular y DNA de sobrenadante de las cinco líneas celulares con una concentración de  $MgCl_2$  de 1.5mM y temperatura de alineamiento de 59°C. *perlecan*, *c-fos* y  *$\beta$ -catenina* fueron amplificados para DNA celular y DNA de sobrenadante de las líneas celulares B16F0 y B16F10 con una temperatura de alineamiento y concentración de  $MgCl_2$  de 60°C y 1.5mM, 62°C y 1mM, 56°C y 1mM respectivamente. El programa de PCR utilizado fue 94°C 4 minutos para desnaturalización, 35 ciclos para DNA celular y 45 ciclos para DNA de sobrenadante de 94°C 30 segundos, temperatura de alineamiento 30 segundos, 72°C 30 segundos; y una extensión de 4 minutos a 72°C.

#### 6.5 Clonación de genes

Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial QIAGEN, la ligación de los productos de PCR al plásmido pcR4Topo se realizó con el TOPO TA kit para clonación de productos de PCR de la marca Invitrogen, y la transformación de células competentes se realizó por choque térmico con incubación de las células competentes con los productos de PCR ligados al vector 30 minutos en hielo y choque térmico a 42°C 30 seg, las células se recuperaron 1hora a 37°C en medio SOC.

Las células transformadas se sembraron en placas con medio LB sólido conteniendo ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se eligieron tres colonias

positivas a transformación de cada gen y se crecieron en 5 ml de medio LB líquido a 37°C toda la noche.

### *6.5.1 Miniprep*

Las células transformadas y cultivadas en suspensión fueron centrifugadas 2 minutos a 6000 rpm, el botón fue decantado y se resuspendió en 100 µl solución I (ver anexo II) y 200 µl de solución II, la mezcla se incubó 5 minutos en hielo. Se agregaron 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, la mezcla se incubó en hielo 5 minutos y a 37° C 30 minutos con RNAasa 20µg/ml y se centrifugó 5 minutos a 14 000rpm. La extracción del plásmido se realizó con el método para extracción de DNA por fenol:cloroformo y se resuspendió en 60 µl de TE 1X.

## **6.6 Arresto Celular**

Se sembraron 1 millón de células, por pozo, de las líneas B16F0 y B16F10 en cajas de 6 pozos con 3 ml de DMEM y 2% de SFB. Después de 4 hrs se retiró el medio de cultivo y cada pozo fue lavado con PBS al menos 2 veces, se agregó medio fresco sin suero fetal bovino, el medio fue reemplazado cada 24 hrs (García-López, 2003). A las 72 hrs se agregó 18 mM de cis platino en DMEM sin suero, 8 hrs después se reemplazó el medio por medio fresco con suero fetal bovino 2% después de lavar con PBS a fin de retirar la droga; 36 hrs después el sobrenadante se retiró, centrifugó y filtró para la posterior extracción y cuantificación de DNA en el fluorómetro. Las células fueron despegadas de la caja con PBS-EDTA y tripsina y contadas por cámara de Neubauer en dilución 1:5 resuspendidas en 1 ml de medio. El arresto de las células en G2 fue corroborado por citometría de flujo (Vindelov, 1994).

El arresto de las las líneas celulares N5, C4 y J20 se llevó a cabo sembrando 500 mil células por pozo en cajas de 6 pozos con DMEM SFB 10%, al llegar a confluencia fueron lavadas con PBS y se agregó medio sin suero con 1mM de hidroxiquina; 12 horas después se lavaron con PBS y se adicionó DMEM SFB 2%, a las 24 hrs se retiró el sobrenadante el cual fue centrifugado y filtrado para extraer y cuantificar el DNA contenido en él por fluorómetro. Las células también fueron despegadas por medio de PBS-EDTA y tripsina y cuantificadas por hemocitómetro. El arresto celular fue corroborado en G0 por citometría de flujo.

## 6.7 PCR Tiempo Real

La cuantificación de copias de los genes c-Fos, Perlecan y B-catenina en las líneas celulares B16F0 y B16F10; y Dhfr en las 5 líneas celulares (B16F0, B16F10, N5, C4 y J20) se realizó por PCR-tiempo real con el fluoróforo SYBRGREEN. Las curvas Standard se realizaron con los genes clonados en el vector TOPO-TA usando las siguientes diluciones:  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^1$  copias en reacción de 20  $\mu$ l.

Para las reacciones de PCR se utilizaron 4  $\mu$ l de cada DNA de sobrenadante extraído (3 muestras por línea celular), 10  $\mu$ l de Supermix SYBRGREEN, 1  $\mu$ l de cada primer (20 $\mu$ M) en reacción de 20  $\mu$ l totales. Los programas usados fueron los ya descritos para PCR con 40 ciclos de amplificación.

El número de copias obtenido para cada gen se estandarizó por equivalentes a través de la siguiente fórmula:

$$C = Q \times (V_{DNA}/V_{PCR}) \times (1/V_{ext})$$

Donde C representa el número de copias del por ml de suero o sobrenadante, Q el número de copias determinado por PCR-tiempo real en una reacción,  $V_{DNA}$  el volumen total de

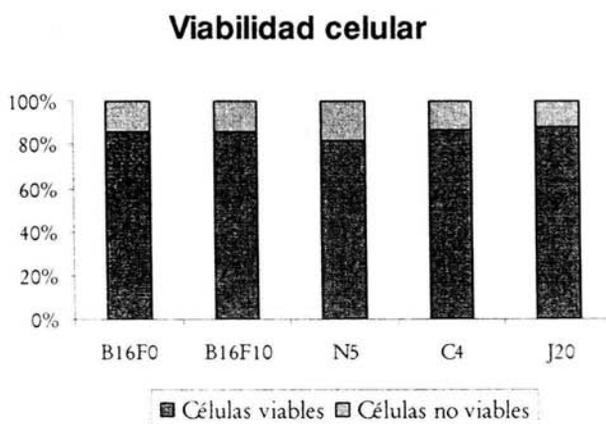
DNA obtenido por extracción,  $V_{PCR}$  el volumen de este DNA en cada reacción de PCR y  $V_{ext}$  el volumen total de suero o sobrenadante del cual se extrajo el DNA (Dong,2002)

## 7 Resultados

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares B16F0 (parental) y B16F10 (metastásica) además de la línea celular NIH 3T3 transfectada con neo (N5), H-ras humano normal (C4) y *H-ras* humano mutado (J20) las cuales poseen potencial metastático diferencial. La selección anterior responde a la necesidad de contar con líneas de cáncer con potencial metastático diferencial, lo que permitirá determinar si la secreción de DNA al medio extracelular se encuentra asociada al potencial metastático de las células.

### 7.1 Niveles de DNA extracelular y el potencial metastático de las células

De los cultivos celulares realizados con cada línea celular se determinó la viabilidad de las células mediante su tinción con azul tripano y su cuantificación en cámara de Neubauer. Se encontró que los cultivos celulares presentan un índice de células no viables, de alrededor del 15% (Fig 1)



**Figura 1.** Viabilidad celular. Se muestra el resultado de la cuantificación de células viables por tinción con azul tripano de 6 cultivos diferentes. El porcentaje de células muertas en las diferentes líneas celulares fue osciló entre 14 y 16 %.

Con el fin de determinar si una línea celular metastásica presenta una mayor cantidad de DNA extracelular en sobrenadante la cuantificación de éste se llevó a cabo en el sobrenadante de 6 cultivos diferentes de B16F0, B16F10 y J20 y en 4 muestras de C4 y N5. Se encontró que existen diferencias en cuanto a la cantidad normalizada por número de células de DNA extracelular que presenta cada línea. La cantidad de DNA extracelular en la línea celular B16F0 asciende en promedio a cerca de 1  $\mu\text{g}$  por millón de células, mientras que para la línea celular B16F10, la cual presenta mayor potencial metastático, la cantidad de DNA extracelular por millón de células es visiblemente mayor, alrededor del 3  $\mu\text{g}$ , que la registrada para la línea parental de melanoma. En el caso de las líneas celulares N5, C4 y J20 también se encontraron diferencia importantes. De acuerdo a lo esperado la línea celular N5 presenta la menor cantidad de DNA extracelular por millón de células (0.5  $\mu\text{g}$ ), mientras que la línea celular C4 (transfectada con *H-ras* humano normal) presenta un valor menor de DNA extracelular por millón de células, cerca de 1.5  $\mu\text{g}$  y la línea celular J20 muestra alrededor de 5 veces más DNA extracelular por millón de células (Fig. 2).

De las células recuperadas de cada cultivo celular se extrajo el DNA celular a fin de determinar el porcentaje que representa el DNA extracelular del DNA genómico en cada línea celular. Se encontró que la cantidad de DNA genómico por millón de células de la línea B16F0 es ligeramente menor en comparación con la cantidad de DNA genómico de la línea celular B16F10, el porcentaje que representa el DNA extracelular por millón de células es también mayor en las muestras obtenidas de la línea celular B16F10. De igual forma encontramos que en las líneas celulares N5, J20 y C4 se presenta una mayor cantidad de DNA genómico para J20 y C4 en comparación con N5, es notable que la cantidad de DNA celular por millón de células en estas líneas celulares es muy similar (Fig. 3). El porcentaje de DNA extracelular con respecto al DNA genómico en cada línea varía considerablemente, sin embargo la cantidad de DNA celular es muy similar.

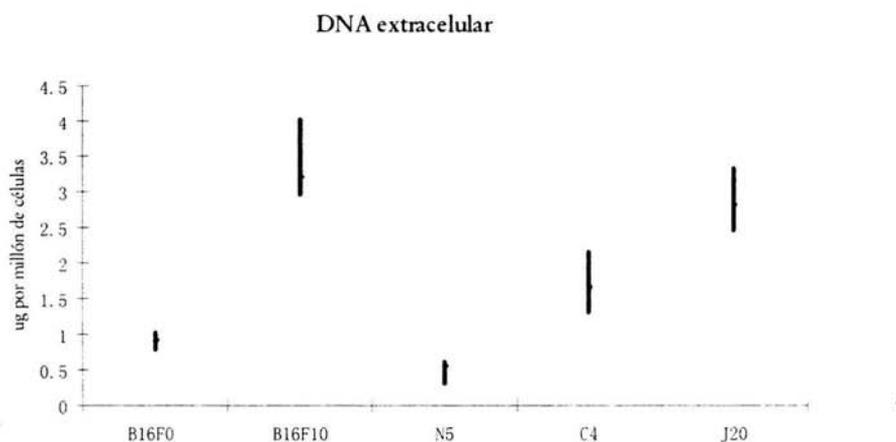
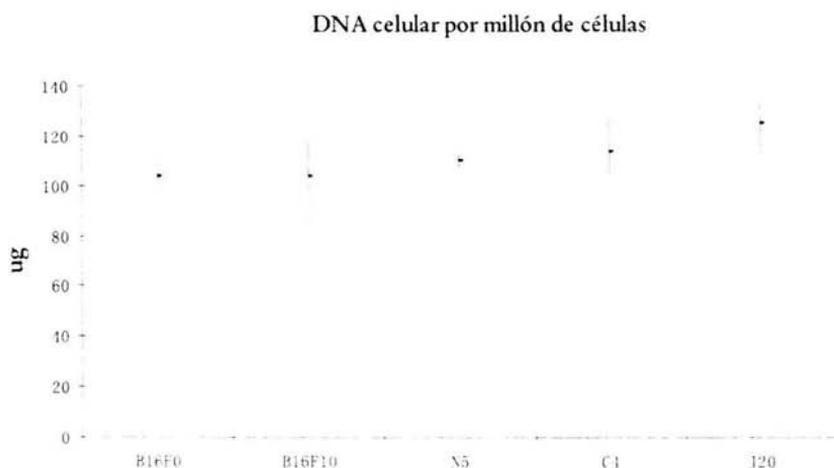
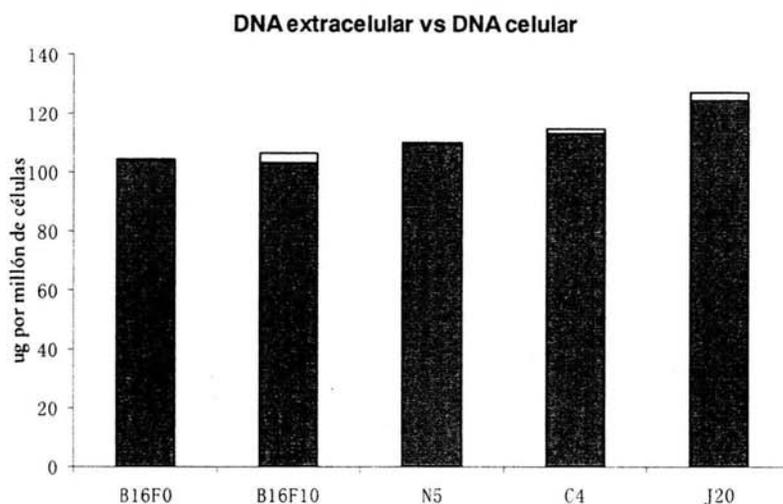


Figura 2. **Comparación de la cantidad de DNA extracelular en cada línea celular estudiada ( $\mu\text{g}$  por millón de células).** La cuantificación de DNA extracelular en cultivos de las diferentes líneas celulares se realizó por fluorómetro, en la gráfica se muestra el promedio obtenido para 6 cultivos distintos con su respectiva desviación estándar. La mayor cantidad de DNA extracelular se registró para las líneas celulares con mayor potencial metastático (B16F0 y J20)

a.



b.



**Figura 3. DNA celular y extracelular.** a) La gráfica muestra la cantidad de DNA celular expresado en  $\mu\text{g}$  por millón de células para cada línea celular en 6 cultivos diferentes, no se aprecian diferencias importantes entre las cinco líneas utilizadas. b) Representación de el DNA celular por millón de células de cada línea en 6 cultivos diferentes y la proporción del DNA extracelular en cada caso; la mayor secreción de DNA al medio se da en las líneas celulares más metastásicas.

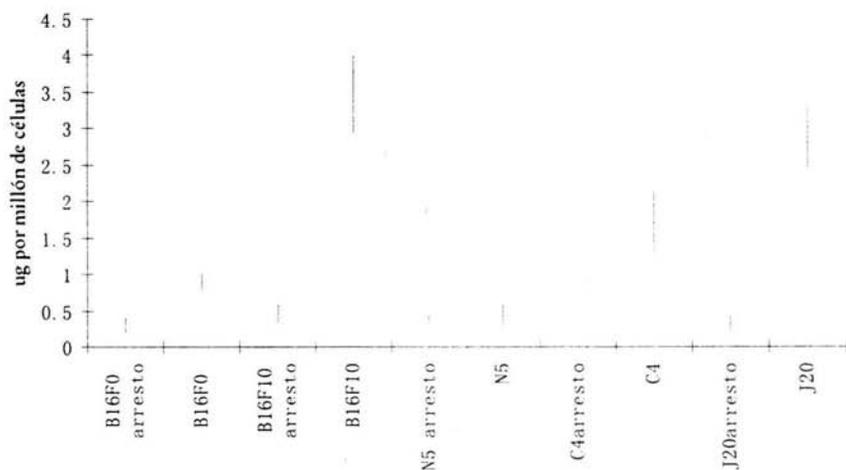
## 7.2 Progresión del ciclo celular y liberación de DNA extracelular

Con el fin de determinar si la presencia de DNA extracelular se debe a una secreción activa por parte de las células se llevaron a cabo experimentos de arresto celular. Las líneas celulares B16F0 y B16F10 fueron arrestadas en G2/M a través de su exposición a cisplatino en una concentración 18  $\mu\text{M}$  por 8 hrs, mientras que las líneas celulares fueron arrestadas en G0/G1 mediante su exposición a hidroximetiluracilo durante 12 hrs a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 4). Estos resultados muestran que cuando las células se encuentran arrestadas la secreción de DNA al medio extracelular es fuertemente inhibida. Cuando los cultivos celulares son arrestados en alguna fase del ciclo celular, las diferencias

**Falta página**

**N° 40**

ciclo normal de cultivos de la línea celular C4 (c) muestra alrededor de 60% de células en fase G0-G1, el tratamiento con hidroximetilurea 1 mM induce arresto en esta misma fase para alrededor de 80% de las células (d)



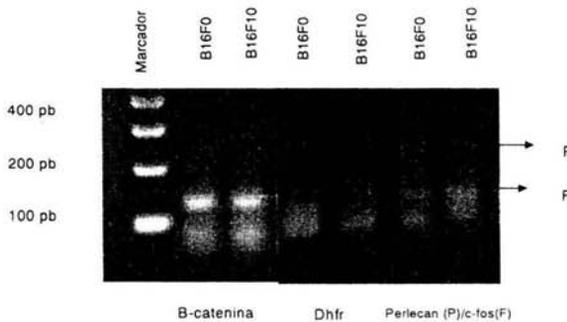
**Figura 5. DNA extracelular en arresto.** Las líneas celulares fueron arrestadas en fase G2/M con cis platino 18mM en el caso de B16F0 y B16F10 y en fase G0/G1 con hidroximetilurea para las líneas derivadas de NIH3T3. Se observa que la secreción de DNA extracelular disminuye considerablemente en comparación con los niveles normales de DNA extracelular (en la misma gráfica).

### 7.3 Identificación de secuencias oncogénicas en DNA extracelular

Debido a que en el DNA de suero de pacientes con cáncer se ha demostrado la presencia de secuencias correspondientes a genes involucrados en el desarrollo del tumor, por ejemplo mutaciones en ras en cáncer de páncreas y leucemia aguda mieloide y mutaciones en p53 en cáncer de hígado y mama (Ziegler, 2002). En melanoma se ha reportado la sobre-

expresión de algunos genes involucrados principalmente en metástasis tales como c-Fos, perlecan y b-catenina, por lo que se evaluó la presencia de éstos en DNA extracelular de las líneas murinas de melanoma B16F0 y B16F10. Además se determinó si existe una secreción diferencial en cuanto al número copias de cada gen entre estas dos líneas celulares.

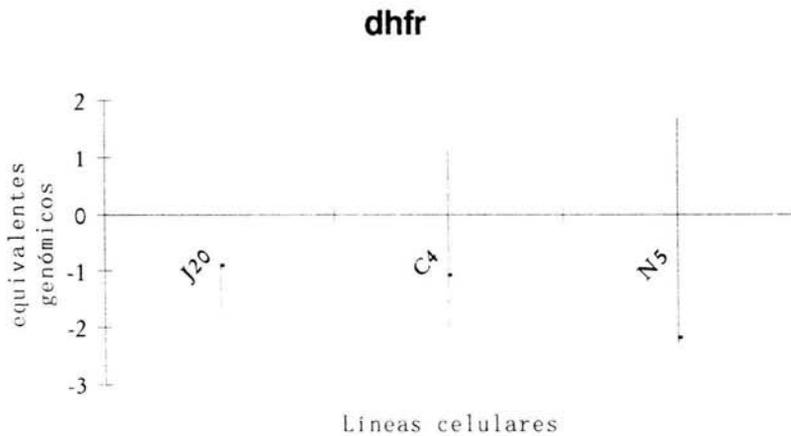
La presencia de los genes *c-fos*, *perlecan* y  *$\beta$ -catenina* en DNA extracelular se analizó cualitativamente por PCR para lo cual fue necesario diseñar oligos a partir de las secuencias de cDNA reportadas en el Gene Bank que amplificaron un fragmento menor a 300pb de cada gen para asegurar la especificidad. Los genes fueron amplificados en el DNA extracelular extraído de 3 diferentes cultivos por la técnica fenol:cloroformo (ver metodología). Se obtuvo el producto esperado en las muestras de DNA extracelular de B16F0 y B16F10. Adicionalmente se buscó una secuencia de 120pb del gen *dhfr* (gen constitutivo) en las distintas líneas celulares estudiadas como control interno (Fig 6)



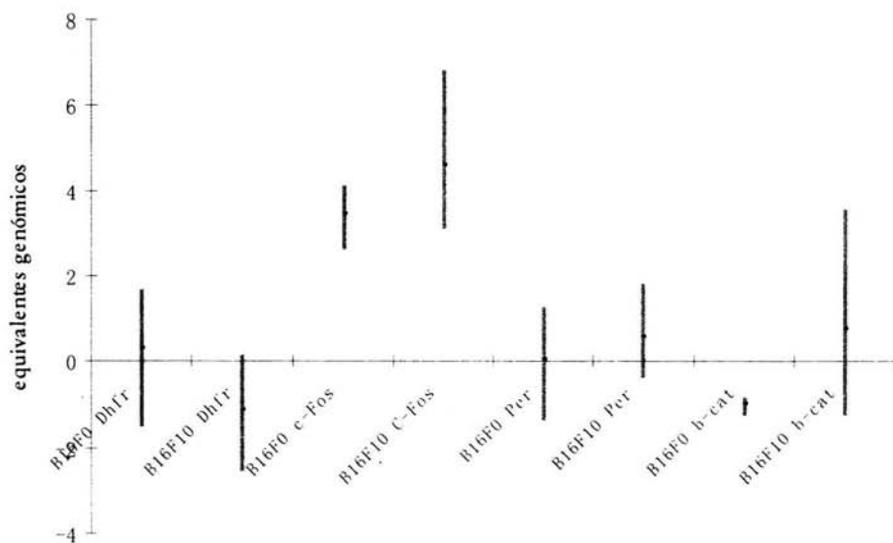
**Figura 6. Amplificación por PCR de oncogenes.** Amplificación de  *$\beta$ -catenina*, *dhfr*, *c-fos* y *perlecan* en DNA extracelular las líneas B16F0 y B16F10.

Para analizar cuantitativamente la presencia de los genes antes mencionados se utilizó PCR-tiempo real con el fluoróforo SYBRGREEN, el cual reporta a través de un aumento en la fluorescencia de cada doble cadena obtenida al intercalarse entre las bases del DNA. La cuantificación de estos genes en DNA extracelular muestra que hay mayor presencia de copias de ellos en las muestras de cultivos celulares de la línea celular de melanoma con mayor potencial metastático (B16F10) en comparación con la línea con menor potencial metastático (B16F0), la cantidad de *dhfr* (gen constitutivo) como control interno permanece similar en las muestras de ambas líneas. Para las líneas celulares N5, C4 y J20 la cantidad de copias en DNA extracelular del gen constitutivo *dhfr* sigue la misma tendencia que para las líneas murinas de melanoma (Figura 7).

a.



b.



**Figura 7.** Equivalentes genómicos detectados en DNA extracelulares de diferentes líneas celulares por PCR tiempo real a) *dhfr* amplificado por PCR tiempo real en las líneas derivadas de NIH3T3. b) Evaluación de los genes  $\beta$ -catenina, *c-fos* y *perlecan* en B16F0 y B16F10, el control utilizado fue el gen constitutivo *dhfr*.

## 8 Discusión

La presencia de ácidos nucleicos extracelulares en circulación ha sido detectada en plasma y suero de individuos normales, sin embargo, se ha comprobado la existencia de cantidades mayores en individuos que presentan enfermedades de carácter inflamatorio como son glomerulonefritis, pancreatitis, hepatitis, entre otras, y en enfermedades de carácter autoinmune tales como lupus eritematosos y artritis reumatoide. La investigación en este campo ha abierto la posibilidad de utilizar este fenómeno en diagnóstico y pronóstico en cáncer ya que se han correlacionado altos niveles de DNA en circulación con un mal pronóstico en la enfermedad y el desarrollo de metástasis (León, 1977; Shapiro, 1983; Ziegler, 2002)

Sin embargo, hasta el momento, el estudio del DNA circulante en pacientes con cáncer se ha enfocado más hacia la parte diagnóstica, es decir, a la investigación de la presencia de las anormalidades cualitativas y/o cuantitativas del DNA con el objetivo de determinar su utilidad en varios aspectos del cáncer como son el diagnóstico temprano de la enfermedad y su valor como factor predictivo de respuesta o pronóstico en los pacientes (Ziegler, 2002; Ander, 2002; Ander, 1999; Chiu, 2003; Johnson, 2002). Desde el punto de vista biológico, son pocos los estudios sobre las implicaciones del DNA en circulación, por lo que su significado y mecanismo de liberación se desconocen hasta el momento.

En un afán por conocer el significado biológico del DNA liberado por las células en cultivo, en este trabajo nos preguntamos si el fenómeno de liberación de DNA está asociado a las características genotípicas y fenotípicas celulares (metastásicas *versus* no metastásicas), si la liberación de DNA está relacionada al estado proliferativo de las células y si existe una presencia diferencial de secuencias oncogénicas en el DNA extracelular de cultivos de líneas celulares con características diferentes.

Con base en lo anterior se decidió utilizar las líneas celulares B16F0 (parental poco metastásica) y la línea B16F10 (metastásica). Estas líneas se caracterizan por una alta

colonización de pulmón, hígado, ovario y cerebro. La línea B16F0 fue obtenida del melanoma murino C57BL/6, la línea metastásica (B16F10) deriva de diez selecciones sucesivas por metástasis a pulmón por inyección de células de la línea B16F1 establecida a partir de focos metastáticos en pulmón producidos por inyección de células B16F0, por lo que la línea celular B16F10 presenta un alto potencial metastático en comparación con la línea parental B16F0 (Ishiguro, 1996).

La línea celular J20 fue obtenida a partir de la transfección de NIH3T3 con el oncogen *H-ras* humano mutado en el codón 12, mientras que las líneas N5 y C4 derivan de la misma línea NIH3T3 transfectada con un plásmido que le confiere resistencia a neomicina (vector vacío) y éste plásmido con el encogen *H-ras* humano normal respectivamente. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la línea celular J20 posee un alto potencial metastático, mientras que las líneas N5 y C4 no (Pérez-Cárdenas, 2002).

En éste estudio se reporta una correlación entre la concentración de DNA extracelular en cultivos de líneas celulares de cáncer murinas y su potencial metastático. La determinación de la concentración de DNA en el sobrenadante de los cultivos celulares muestra que existe una mayor cantidad de DNA por cada millón de células en cultivo en las líneas celulares con mayor capacidad metastásica en comparación con las líneas parentales o transfectadas con la versión normal del gen *H-ras* o vector vacío. Así, la cuantificación de DNA en sobrenadante por millón de células en cultivo registró los mayores niveles en cultivos de la línea metastásica B16F10 (3.3µg) contra la línea B16F0 en la que se encontró una cantidad de 1µg. En forma interesante, la misma tendencia se encontró en las líneas NIH3T3 transfectadas, en éstas J20 presentó una cantidad cercana a 4 µg, seguida de C4 (2µg) y por último N5 (< 1µg). Para demostrar que la cantidad total de DNA presente en el sobrenadante no está relacionada a la cantidad de DNA celular total, se cuantificó el DNA celular de las 5 líneas, a la par, en las mismas condiciones de cultivo, demostrándose que a diferencia del DNA en el sobrenadante, no hay variaciones significativas en la cantidad de DNA celular ( $p=0.05$ ) el cual se encontró en un rango 100-120 µg siendo la menor cantidad en la línea B16F0 (100µg) y la mayor para J20 (120 µg)

Si bien se ha propuesto que el DNA circulante de los pacientes con cáncer proviene de las células tumorales que han sufrido lisis en la circulación, y/o apoptosis de las células tumorales, nuestros resultados indican que el DNA secretado al sobrenadante no proviene de las células en apoptosis bajo las condiciones normales de cultivo ya que la viabilidad (evaluada mediante tinción con azul tripano) observada en nuestros cultivos al tiempo de recolección de sobrenadante y extracción de DNA extracelular fue en todos los casos de 85% (Fig. 1), el encontrar la misma viabilidad independientemente de el tipo de células que se cultiven indica que las diferencias encontradas en la concentración de DNA extracelular en los sobrenadantes de los cultivos por millón de células no depende de el porcentaje de células que se encuentren en procesos de muerte celular.

Se ha demostrado que los linfocitos en cultivo y activados por fitohematoglutina son capaces de liberar DNA activamente (Rogers, 1972; Ziegler, 2002) lo que sugiere que esta secreción de DNA se encuentra de alguna forma conectada a la proliferación celular. En éste trabajo se indujo arresto celular en los cultivos celulares de las líneas B16F0, B16F10, N5, C4 y J20; se encontró que los niveles de DNA extracelular por millón de células en cultivo disminuye drásticamente sin importar el potencial metastático de la línea celular; los fármacos utilizados para inducir arresto celular detuvieron alrededor del 80% de las células en cultivo en fase G0/G1 para las líneas derivadas de NIH3T3 y G2/M para las líneas de melanoma. El haber encontrado disminución del DNA extracelular independientemente del fármaco y del tiempo de arresto del ciclo, sugiere que la secreción de DNA está acoplada a la progresión del ciclo celular. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Sasvari-Szekely y colaboradores, quienes en 1984 reportaron que los linfocitos grandes aislados de amígdalas cuando se cultivan por 48 horas sin estimulación, revierten a linfocitos pequeños y este fenómeno está acompañado de pérdida de DNA de alto peso molecular, el cual se secreta al sobrenadante y no es resultado de la muerte celular. Sin embargo, esta asociación entre proliferación celular y secreción de DNA al sobrenadante no parece ser el único factor determinante de dicha secreción ya que en las líneas estudiadas no se observa una correlación entre el tiempo de doblaje de cada una de

ellas con la cantidad de DNA encontrada en sobrenadante, por ejemplo la línea B16F10 (metastásica) tiene un tiempo de duplicación mayor a la línea parental B16F0 (poco metastásica) y pese a ello secreta más DNA, por el contrario el tiempo de duplicación de la línea J20 es menor al de la línea parental N5 y se encontró más DNA en el sobrenadante de cultivos celulares de la primera, éstas observaciones permiten suponer que no hay relación entre el tiempo de doblaje y la cantidad de DNA en sobrenadante. Lo anteriormente descrito sugiere que la capacidad de secretar DNA por las células podía ser una característica intrínseca del fenotipo y que podría existir una correlación directa entre el grado de agresividad biológica de las células malignas y la capacidad de secretar DNA, aunque se necesitan estudios con mayor número de líneas celulares (primarias, inmortales, no metastásicas y metastásicas) para confirmar ésta hipótesis.

La metástasis es un fenómeno muy estudiado desde hace varios años en el que, las células tumorales del tumor primario a través de mecanismos recientemente descritos y observados incluyendo microscopía en tiempo real (Cameron, 2000; Guba, 2001; Luzzi, 1998) migran, invaden, se adhieren y proliferan en órganos y tejidos distantes. Sin embargo, se ha sugerido que este proceso es ineficiente para la producción de neoplasias debido a que la sobrevivencia de estas células en circulación es de cerca del 1% y que solo alrededor de 10 células tumorales viables se pueden encontrar por cada 2 ml de sangre después de un procedimiento quirúrgico (Friedl, 2003; Glavies, 1988). Además, solo una pequeña proporción de las células ya implantadas (micrometástasis) llegan a crecer y manifestarse clínicamente como metástasis.

La transferencia de genes entre organismos que pertenecen a diferentes dominios biológicos se ha estudiado entre Archea y eubacteria, E. coli y levadura y endosimbiosis entre eucariontes y procariontes. Se han relacionado secuencias de transposones, fagos y RNAt entre ambos dominios, además se han encontrado bloques de genes colineales entre ambos dominio como es el caso de *Aquifex* y *Thermotoga* ambos organismos bacterias extremófilas que contienen el 16 y 24% respectivamente de genes presentes en arquea; en el caso opuesto *Archaeoglobus fulgidis* presenta genes bacterianos del metabolismo de los

ácidos grasos. El caso más llamativo que se conoce de transferencia horizontal de genes entre dominios es la transferencia de secuencias de *Agrobacterium tumefaciens* a plantas, la infección en plantas por *A. tumefaciens* resulta en el desarrollo de tumores en diferentes sitios del árbol, la formación de esta estructura está mediada por la transferencia de segmentos de T-DNA a la planta, el nombre dado a estas secuencias hace referencia a la formación de tumores en la planta, estas secuencias se encuentran codificadas en el plásmido inductor de tumores Ti (Tumor inducing) de la bacteria el cual presenta una longitud de 140-500Kb y contiene genes de T-DNA y genes cuyos productos son necesarios para la transferencia de T-DNA denominados genes de virulencia (Bushman, 2002)

Es conocido que existe transferencia horizontal de genes entre los seres vivos, esta transferencia lateral de secuencias génicas ha sido descrita en tres mecanismos generales: Transducción, transformación y conjugación. Los procesos de transformación involucran la incorporación de DNA en el medio por la célula y la expresión de estas secuencias. Este mecanismo se encuentra bien estudiado en bacterias, el caso de los plásmidos es el tal vez el más conocido; las bacterias incorporan moléculas circulares de DNA de algunos cientos de pares de bases que se replican independientemente del cromosoma del huésped ya que poseen un origen de replicación donde se ensambla el complejo para síntesis de DNA. Generalmente se puede encontrar en el plásmido una región que codifica para la proteína Rep que se une al DNA original y facilita la adquisición de factores de replicación. Se conocen algunos mecanismos por medio de los cuales el DNA transferido se integra a la célula receptora y puede ser segregado en generaciones futuras, tales como recombinación homóloga, recombinación específica y en sistemas más complejos reparación de DNA (Lewin,1997)

Derivada de los hallazgos anteriormente descritos, en los últimos años se ha desarrollado la teoría de la genometástasis la cual sugiere que las secuencias oncogénicas derivadas del tumor primario podría estar implicada en el desarrollo de las metástasis, en donde la transfección pasiva de dichas secuencias podría acelerar el desarrollo de las

micrometástasis. La evidencia más sólida en este campo surge de estudios en transformación por cuerpos apoptóticos derivados de fibroblastos de rata transfectados con los oncogenes humanos *c-myc* y *H-ras*<sup>v12</sup>, fagocitados por fibroblastos de ratón, los fibroblastos de ratón después de estar en contacto con los cuerpos apoptóticos mostraron formación de focos los cuales fueron positivos para *H-ras* y *c-myc* humanos detectados por PCR. También se identificaron por hibridización in situ fluorescente cromosomas de rata en las células de ratón (Bergsmeth, 2001). Además Abker y colaboradores han reportado desde hace varios años la inmortalización de linfocitos humanos con secuencias génicas derivadas de citoplastos, células enucleadas, de células L929 de ratón y la posibilidad de que exista una vía citoplásmica de síntesis de DNA, la cual podría ser una fuente de DNA extracelular (Abken, 1988; Abken, 1993)

Como un primer abordaje a este respecto, otro de los objetivos en este trabajo fue investigar si podría existir una secreción o presencia diferencial de secuencias oncogénicas en relación a genes constitutivos en el DNA del sobrenadante. A fin de contestar esta pregunta se decidió evaluar en las líneas de melanoma los genes *perlecan*, *c-fos* y *b-catenina* como oncogenes y el gen *dhfr* como constitutivo.

El gen *perlecan* HSPG, cuyo producto es una proteína con un núcleo de alrededor de 400 kD unido a tres cadenas heparan sulfato forma parte de la membrana basal vascular (BM), componente importante de vasos sanguíneos y capilares, es sintetizado por varios tipos de células en proliferación y se encuentra significativamente sobreexpresado en melanoma invasivo humano en líneas celulares metastásicas murinas. Las células tumorales producen componentes de BM que promueven angiogénesis, diferentes isoformas de colágena tipo IV, laminina y HSPG proveen especificidad a los componentes de membrana basal asociados con diferentes tipos de tejidos. Se ha encontrado que Perlecan induce eficientemente la presentación de los receptores para bFGF, estimulando el crecimiento tumoral y angiogénesis por incremento de la acumulación de bFGF y presentación de los receptores a este (Adatia, 1997; Kalluri, 2003).

En la línea celular murina B16F10 también se ha detectado la sobreexpresión de c-Fos, un gen implicado en la activación de genes relacionados con metástasis como son genes que codifican para metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-1, MMP-3 y MMP-10), uPA y *Vega/Vpf*. Además se ha reportado que la transcripción de este gen se encuentra inducida en fases tempranas de metástasis (Shioda, 1997).

Se cree que una elevada expresión de *β-catenina* está involucrada en el desarrollo de una gran variedad de cánceres humanos por inducción de la activación de genes que contribuyen a la tumoración (Polakis, 2000). La familia de proteínas *Wnt* son proteínas ricas en cisteínas sin péptido señal hidrofóbico, cuyo peso molecular oscila entre los 38-45 kDa y sufren glicosilaciones postraduccionales. Estas proteínas están asociadas a superficies celulares y matriz extracelular, e implicadas en señalización vía la familia de receptores Frizzled. *Wnt* se une a el receptor Frizzled induciendo hiperfosforilación de el gen disheveled y por tanto su activación el cual inhibe la actividad de la serina treonina cinasa GSK3-β y permite la estabilización de *β-catenina* que se acumula en el núcleo alterando la estructura de la cromatina activando la expresión constitutiva de sus genes blanco entre los que se encuentran reguladores positivos de proliferación celular como la ciclina D1, c-myc y WISP-1. Se ha reportado que expresión de B-catenina se encuentra elevada en células de melanoma y uno de sus principales blanco es la proteína Nr-CAM, una proteína transmembranal de adhesión celular principalmente expresada en células del sistema nervioso cuyo incremento en melanocitos y células de colon promueve el desarrollo de melanoma y cáncer de colon respectivamente (Weeraratna, 2002; Conacci-Sorrell, 2002; Hussien, 2003)

Los genes anteriormente descritos fueron evaluados en DNA extracelular de las líneas celulares de melanoma B16F0 y B16F10, se incluyó el gen Dihidrofolato reductasa (*dhfr*) en el estudio como un control constitutivo ya que este gen codifica para la enzima citosólica del mismo nombre, cuya función es reducir dihidrofolato a tetrahidrofolato un cofactor esencial en la síntesis del precursor de DNA ácido timidílico, y fue evaluado

también en las líneas celulares N5, J20 y C4 a fin de comparar el número de copias en DNA extracelular de estas líneas con el encontrado en las líneas problema

Conforme a lo esperado se encontró que en ambas líneas celulares de melanoma hay una mayor cantidad de copias de los genes implicados en metástasis que del gen constitutivo (*Dhfr*), ya que los equivalentes genómicos en DNA extracelular de *Dhfr* en las líneas B16F10 y B16F0 es muy similar, de igual modo que entre las líneas derivadas de NIH3T3.

Se observó también que existe una tendencia general de la línea B16F10 a presentar un mayor número equivalentes genómicos de los genes implicados en desarrollo de cáncer (*Perlecan*,  *$\beta$ -catenina* y *c-Fos*) en comparación con la línea parental B16F0 lo cual correlaciona con su potencial metastático (Fig 7). El mayor número de equivalente genómicos se registró para el gen *c-Fos*. Estos resultados sugieren que el número de copias de genes implicados en el desarrollo de cáncer es mayor en líneas celulares con mayor potencial metastático por lo que puede existir una relación directa entre la capacidad metastásica de las líneas celulares y de la composición del DNA extracelular. Los resultados obtenidos muestran que entre las líneas B16F0 y B16F10 existen diferencias en cuanto a la composición cuantitativa del DNA extracelular, en el DNA extracelular de ambas líneas se amplificaron los mismos genes, sin embargo, por PCR-tiempo real se pudo determinar que estos genes se presentan en mayor cantidad en el DNA extracelular de la línea B16F10 en comparación con la línea parental, de igual forma se observó que el número de equivalente genómicos del gen constitutivo *dhfr* es mayor en la línea B16F0 y menor en B16F10 al contrario de lo que ocurre con los oncogenes evaluados.

No existe una explicación satisfactoria del significado biológico de las observaciones realizadas sobre la secreción diferencial de secuencias oncogénicas en el sobrenadante de las líneas celulares y su correlación con la capacidad metastásica. Es conocido que la regulación de la expresión génica tanto en la célula normal como la tumoral es esencial para el desarrollo de las funciones celulares. Los mecanismos de la regulación de la expresión génica son complejos y aún en la célula tumoral debe existir un balance delicado

en el grado de expresión de oncogenes y genes supresores importante para la proliferación de la estirpe celular y también para otros procesos como son diferenciación, senescencia y apoptosis, de modo que la sobreexpresión de un oncogen puede tener tan diversos efectos dependiendo del balance génico de cada tipo celular como son la estimulación del crecimiento y proliferación o la inducción de apoptosis (Weinstein, 2002).

Hasta dónde la sobre-expresión y/o amplificación de un gen es necesaria para iniciar el desarrollo de un tumor o mantenerlo no se conoce, sin embargo se sabe que las células cancerosas son fisiológicamente dependientes de genes para continuar con sus actividades y mantener su fenotipo maligno. Esta dependencia hacia algún gen puede llevar a un desequilibrio en el balance establecido para la célula, uno de los mecanismos responsables de mantener ese equilibrio en la célula que se ha propuesto es la eliminación selectiva de secuencias oncogénicas. Estudios en leucemia promielocítica HL-60, líneas de neuroblastoma y glioblastoma han demostrado que las células tumorales son capaces de contrarrestar sus fenotipos por eliminación de oncogenes amplificados en “double minutes” acéntricos, por el contrario la presencia estable de estas estructuras en células tumorales favorece la expresión de genes amplificados en ellos, generalmente genes de resistencia a drogas, lo cual correlaciona con un pronóstico pobre para los pacientes (Shimizu, 2000; Valent, 2001).

Nuestros resultados apoyan la idea de que este DNA es secretado al exterior de la célula como un mecanismo para mantener el equilibrio celular en la expresión de oncogenes y genes supresores y mantener así su fenotipo y proliferación sin llegar a la muerte. Las implicaciones biológicas de DNA en circulación en pacientes con cáncer no se han dilucidado, sin embargo, existe la hipótesis de que este DNA extracelular pudiese estar jugando un papel importante en la transformación de células de tejidos distantes al sitio de la tumoración primaria y por tanto participar activamente en el proceso de metástasis.

Los datos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo apoyan la teoría de la genomestásis en el sentido de que encontramos una mayor secreción de DNA al medio

celular en líneas celulares con mayor potencial metastático con respecto al DNA secretado por sus respectivas líneas parentales. Los niveles de DNA extracelular reportados para células arrestadas indican que las células tienen un papel activo en secreción de este DNA apoyando la hipótesis de que la presencia de DNA extracelular está dada por secreción activa de las células y no por cuerpos apoptóticos, y finalmente una presencia diferencial en el número de copias de secuencias oncogénicas en DNA extracelular de líneas metastásicas y no metastásicas indica que podría existir una relación directa entre este fenómeno y el potencial metastático de las células. El grupo de investigación ha demostrado transformación celular asociada a la transferencia horizontal de genes y al momento la investigación se centra en la identificación de secuencias oncogénicas presentes en el DNA en circulación.

## 9 Conclusiones

- Existe una mayor cantidad de DNA extracelular en cultivos de células con mayor potencial metastático en comparación con líneas celulares con menor potencial metastático.
- La progresión del ciclo celular es necesaria para que haya una liberación de DNA al medio de cultivo en las líneas celulares utilizadas durante el desarrollo de éste trabajo.
- La disminución de DNA extracelular en cultivos arrestados sugiere una secreción activa del material genético, al medio extracelular, por parte de las células.
- Algunas secuencias de genes que participan en el desarrollo y progresión del cáncer, tales como *c-fos*, *perlecan* y  *$\beta$ -catenina*, están presentes en el DNA extracelular de los cultivos de células.
- El número de copias de los oncogenes presentes en DNA extracelular es mayor en relación al de copias del gen constitutivo *dhfr*.

## 10. Bibliografía

Abken H, Bützler C, Willecke K. Immortalization of human lymphocytes by transfection with DNA from mouse L929 cytoplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, 85: 468-472.

Abken H, Hegger R, Bützler C & Willecke K. Short DNA sequences from the cytoplasm of mouse tumor cells induce immortalization of human lymphocytes *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. 90:6518-6522.

Adatia R, Albin A, Carlone S. 1997. Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-perlecan cDNA. Annals of Oncology. 8; 1257-1261.

Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Co. New York.

Anker, P, Stroun M, Maurice P. 1975. Spontaneous Release of DNA by Human Blood Lymphocytes as shown in a *in vitro* System. Cancer Research, 35: 2375-2382.

Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C y Stroun M. 1994. Transformation de cellules NIH/3T3 et cellules SW 480 porteuses d'une mutation K-ras. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life science, 317 : 869-74.

Anker P, Mulcahy, Qi Chen X, Strun M. 1999. Detection of circulating tumor DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. Cancer and Metastasis Reviews, 18: 65-73.

Bergers G y Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nature Cancer Reviews. 2003, 3: 401-410.

Bushman, F. 2002. Lateral DNA Transfer. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 448.

Chambers A, Groom A & MacDonald I. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Cancer Reviews*. 2002, 2: 563-570.

Cameron D, Schmidt E, Kerkvliet N, Nadkerni K, Morris V, Groom A, Chambers A & MacDonald I. Temporal progression of Metastasis in Lung: Cell Survival, Dormancy and Location Dependence of Metastatic Inefficiency. *Cancer Research*. 2000, 60: 2541-2546.

Collins, F, Trent, J. *Cancer Genetics* en : Harrison, T. 2001. *Principles of Internal Medicine*. Mc Graw Hill. pp 503.

Conacci-Sorrell M, Ben-Yedidia T, Shtutman M, et al. Nr-CAM is a target gene of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway in the melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes & Dev*. 2002, 16: 2058-2072.

Distelhorst C, Rogers J. Glucocorticoids inhibit trypsin-induced DNA release from phytohemagglutinin-stimulated blood lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 1979, 123: 487-495.

Dong S, Pai S, Rha S, Hildesheim A, et al. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002, Vol 11: 3-6.

Downward, J. 2003. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nature Cancer Reviews*: Vol 3 Enero 2003, 11-21.

Dutta, A, Bell, S. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1997. 13: 293-332. Fournié GJ, Bret L, Belenguer P, et al. Physicochemical characterization of plasma DNA. *Lupus*. 1992; 1: 86

García-López P, Rodríguez-Dorantes M, Pérez-Cárdenas E, Cerbón M, Mohar-Betancourt A. Synergistic effects of ICI 182, 780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2003. (en prensa)

García-Olmo. Functionality of circulating DNA: The Hypothesis of Genometastasis. *Annals New York Academy of Science*. 265-275

Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissel E, Jauch K, Anthuber M, Falk W & Steinbauer M. A Primary Tumor Promotes Dormancy of Solitary Tumor Cells before Inhibiting Angiogenesis. *Cancer Research*. 2001, 61: 5557-5579.

Hakem, R, Mak, T. Animal Models of Tumor -Suppressor Genes. *Annu. Rev. Genet*. 2001, 35:209-41

Hendrix M, SefTOR A, Hess A & SefTOR E. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Cancer Reviews*. 2003, 3: 411-421.

Hussien, M, Haemel, A, Wood, G. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 2003; 199: 275-288.

Ishiguro T, Naakajima M, Naito M, Muto T, Tsuruo T. Identification of genes differentially expressed in B16 Murine Melanoma Sublines with different Metastatic Potentials. *Cancer Research*. 1996, 56: 875-879, February 15.

Jiménez L, Merchant H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Prentice may. México.

Johnson P, Lo Y. Plasma Nucleic Acids in the Diagnosis and Management of Malignant Disease. *Clinical Chemistry*. 2002, 48 (8): 1186-1193.

Kalluri, R. Basement Membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nature Cancer Reviews*. 2003, 3: 422-433.

Kanduc, D, Mittelman, A, Serpico, R, et al. Cell death: Apoptosis versus necrosis. 2002  
Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest*. 1973, 52: 198-204

Kuroi K, Tanaka C y Toi M. Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients. *International Journal of Oncology*. 2001, 19: 143-148.

Lehninger A, Nelson D y Cox M. 2001. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers Inc. New York.

Leon SA, Gree A, Yaros MJ, Shapiro B. Raddioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J Immuno Methods*. 1975, 9: 157-164.

Lewin, B. 2002. *Genes VII*. Oxford University Press. New Cork.

Li ZJ, Steinman CR. Plasma DNA in syestic lupus erythematosus. Characterization of clones base sequences. *Erthritis Rheum*. 1989, 32: 726-733.

Luzzi K, MacDonald I, Schmidt E, Kervlier N, Morris V, Chambers A & Groom A. Dormancy of Solitary Cells after Succesful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases. *American Journal of Pathology*. 1998, 153 (3): 865-873.

Maki, H. 2002. Origins of Spontaneous Mutations: Specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutagenes. *Ann. Rev. Genet*. 36: 279-303

Mendel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris*. 1948, 142: 241-243

Patterns of metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2000, 19: 281-301.

Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Dev*. 2000, 14:1837-1851.

Rogers J, Boldt D, Kornfeld S, Skinner S & Valeri R. Excretion of Deoxyribonucleic Acid by Lymphocytes Stimulated with Phytohemagglutinin or Antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1972, 69: 1685-1689.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Rosso M, Fibbi G, Pucci M, D'alessio S, Roso A, Magnelili L & Chiarugi V. Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2002, 19:193-207.

Rumore M, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in Systemic lupus erythematosus, occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest*. 1990, 86: 69-74.

Saenger, W. 1984. Principles of nucleic acid structure. Springer Verlag. Nueva York.

Shimizu N & Tanaka T. Induced detachment of acentric chromatin mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G1 and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. *Journal of Cell Science*. 2000, 113, 697-707.

Shimizu N, Shimura T y Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research*. 2000, 448: 81-90.

Shioda T, Munn L, Fenner M, et al. Early Events of Metastasis in the Microcirculation Involve Changes in Gene Expression of Cancer Cells. *American journal of Pathology*. 1997 June 6 Vol. 150: 2099-2112.

Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994, 3: 67-71

Steeg, P. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Cancer Reviews*. 2003, 3: 55-62.

Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest*. 1975, 56: 512-515.

Stryer, L. 1995. Biochemistry. Freeman & Co. San Francisco.

Tan EM, Schur PH, Carr IR, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966, 45: 1732-1740.

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. Circulating nucleosomes and response to chemotherapy: an *in vitro*, *in vivo* and clinical study on cervical cancer patients. *International Journal of Cancer.* 2003, 104: 663-668.

Valent A, Bénard J, Clause B, Barrois M, Valteau-Couanet D, Terrier-Lacombe M, Spengler B y Bernheim A. 2001. *In vivo* Elimination of Acentric Double Minutes Containing Amplified MYCN from Neuroblastoma Tumor Cells Through the Formation of Micronuclei. *American Journal of Pathology*, 158: 1579-2049.

Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol.* 1994, 86: 774-779

Voet & Voet. 1996. *Biochemistry.* John Wiley & Sons. New York

Weeraratna A, Jiang Y, Hostetter G, et al. 2002 Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* 1: 279-288.

Weinstein, B. Addiction to Oncogenes-the Achilles Heal of Cancer. *Science.* 2002, 297.  
Wolf K & Friedl P. Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Cancer Reviews.* 2003, 3: 362-373.

Ziegler A, Zangemeister-Wittke U and Stahel R. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?. *Cancer Treatment Reviews.* 2002, 28: 255-271.

## **Anexo I: Técnicas**

### ***Conteo Celular***

1. Contar ocho cuadrantes en la cámara de Neubauer
2. Dividir el resultado anterior entre ocho
3. Multiplicar por el factor de dilución con azul tripan
4. Multiplicar por un factor conocido (10, 000)
5. Multiplicar por el volumen en que se resuspendieron las células

### ***Extracción de DNA celular***

1. Crecer la línea celular en una caja de 175 cm<sup>3</sup> hasta 70-80% de confluencia y retirar el medio
2. Lavar con PBS varias veces
3. Despegar las células con PBS-EDTA y tripsina (20 µl por cada ml de PBS-EDTA) incubando por alrededor de 5 minutos.
4. Parar la reacción con 5 ml de medio (SFB 10%) por cada ml de PBS-EDTA
5. Centrifugar a 1 500rpm alrededor de 10 minutos a temperatura ambiente
6. Recuperar el pellet y agregar 4 ml de Buffer de lisis más 20 µl de proteinasa K e incubar a 55° toda la noche. Puede almacenarse el pellet a -20°C solo con el buffer de lisis.
7. Agregar un volumen de Fenol:Cloroformo (1:1) y agitar.
8. Centrifugar a 7 500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
9. Recuperar la fase superior. Agregar a la fase inferior un volumen de agua, centrifugar a 5 000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente y recuperar la fase superior.

10. Agregar un volumen de cloroformo. Agitar y centrifugar a 5000 rpm a temperatura ambiente
11. Recuperar la fase superior en un tubo nuevo
12. Precipitar el DNA con NaCl 0.2M y un volumen de etanol 100% o isopropanol frío. Mezclar por inversión.
13. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche o a  $-70^{\circ}\text{C}$  una hora.
14. Centrifugar a 7 500rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y recuperar el pellet
15. Lavar con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70%, centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  y decantar
16. Secar el pellet y resuspender en ddH<sub>2</sub>O

#### ***Extracción de DNA de sobrenadante***

1. Crecer la línea celular en una caja de 175 cm<sup>3</sup> hasta 70-80% de confluencia
2. Retirar el medio y centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos
3. Recuperar el sobrenadante y filtrar con poro 0.22 micras
4. Concentrar el sobrenadante 10 veces en Speed Vac
5. Agregar un volumen de buffer de lisis más proteinasa K e incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
6. Agregar un volumen de Fenol:Cloroformo (1:1) y agitar.
7. Centrifugar a 7 500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
8. Recuperar la fase superior. Agregar a la fase inferior un volumen de agua, centrifugar a 5 000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente y recuperar la fase superior.
9. Agregar un volumen de cloroformo. Agitar y centrifugar a 5 000 rpm a temperatura ambiente
10. Recuperar la fase superior en un tubo nuevo
11. Precipitar el DNA con NaCl 0.2M y un volumen de etanol 100% o isopropanol frío. Mezclar por inversión.
12. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche

13. Centrifugar a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C y recuperar el pellet
14. Lavar con 500 µl de etanol 70%, centrifugar a 14 000 rpm a 4°C 15 minutos
15. Secar el pellet y resuspender en ddH<sub>2</sub>O

### ***Miniprep***

1. Crecer una colonia en 5 ml de Terrific/100 mg/ ml de ampicilina
2. Tomar 5 ml de bacterias y centrifugar a 6000 rpm de 3 minutos
3. Recuperar el pellet y disolver en 100 ml de Solución I. Agitar en vortex
4. Agregar 200 µl de Solución II, mezclar e incubar en hielo 5 minutos
5. Adicionar 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Mezclar
6. Centrifugar durante 5 minutos a una velocidad de 14 000 rpm a temperatura ambiente
7. En un tubo nuevo transferir la fase superior y precipitar con 350 µl de isopropanol frío. Mezclar por inversión e incubar a -70°C 10 minutos
8. Centrifugar a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Lavar el pellet obtenido con 500 µl de Etanol 70%
9. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, secar el pellet.
10. Resuspender en 60 µl de TE 1X

### ***Citometría***

1. Crecer 1 000 000 de células
2. Despegar las células con PBS-EDTA y tripsina
3. Centrifugar en tubos eppendorf en nanofuga alrededor de 5 minutos
4. Resuspender el pellet en 200 µl de Etanol 70% frío (para almacenar 1 semana a 4°C) o DMSO (para almacenar más de 1 semana a -70°C)

5. Centrifugar y lavar el pellet con PBS para rehidratar las células. Centrifugar
6. Agregar 250  $\mu$ l de solución A. Agitar en vortex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
7. Agregar 250  $\mu$ l de solución B. Agitar en vortex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
8. Agregar 200  $\mu$ l de solución C. Agitar en vortex e incubar 15 minutos en hielo y oscuridad
9. Llevar a citómetro

## **Anexo II: Soluciones de trabajo**

### *Soluciones de Extracción de DNA*

- **PBS-EDTA**  
PBS 1X  
EDTA 10mM
- **Tripsina**  
Tripsina 2.5%  
PBS 1X
- **Buffer de Lisis**  
0.01 M Tris pH 7.8  
0.02 M EDTA pH 7.8  
0.5% SDS

### *Soluciones para Miniprep*

- **Solución I (Buffer de glucose estéril)**  
Glucosa 50 mM  
Tris\*CL pH 8.0 25 mM  
EDTA 10 mM
- **Solución II (Buffer álcali)**  
NaOH 0.2 mM  
SDS 1.0 %

- Solución III (Acetato de potasio)  
Acetato de potasio pH 5.2 3M

### *Soluciones para Citometría*

- Solución Stock
 

Citrato de sodio	3.4 mM
Nonidet P40	0.1%
Tetracloruro de Espermina	1.5 mM
Tris	0.5 mM
Aforar con H <sub>2</sub> O dd a	1 lt
  
- Solución A
 

Solución Stock	1000 ml
Tripsina	30 mg
pH	7.6
  
- Solución B
 

Solución stock	1000 ml
Inhibidor de tripsina	500 mg
Ribonucleasa A	100 mg
pH	7.6
  
- Solución C
 

Solución stock	1000 ml
Ioduro de propidio	416 mg
Tetracloruro de Espermina	1160 mg
pH	7.6