



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

**EI DNA LIBRE EN CIRCULACION Y SU PAPEL EN LA
TRANSFORMACION CELULAR**

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

PRESENTA:
CATALINA TREJO BECERRIL

DIRECTOR DE TESIS
DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

COMITÉ TUTOR
DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, SSA, bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), proyectos 34649-M y 50699; así como de la UNAM (PAPIIT), proyecto IN214902. Además, el tesista fue becario de CONACyT (número de registro 87864) durante el periodo de Agosto de 2002 a Octubre de 2005.

Este Trabajo lo dedico de manera muy especial, a las tres personas más importantes y valiosas de mi vida:

ENRIQUE, mi gran amor, amigo y compañero de vida;

DAVID Zaid, mi hijo, la luz de mis ojos y mi corazón;

MONICA, mi hija, el ángel que Dios tiene en el cielo.

Con todo mi amor y cariño:

A mis Padres:

Inocencia y Pompeyo, quienes siempre han estado conmigo en todo momento y a los que debo lo que soy y seré.

A mis Hermanos:

Por todo su apoyo.

A mi Gran Amiga y Hermana:

Lucy, por su amistad incondicional en todo momento.

Agradezco a los miembros del Jurado por la revisión de ésta Tesis, ya que sus acertados comentarios enriquecieron el presente trabajo:

PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

SECRETARIO: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ

VOCAL: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

VOCAL: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

VOCAL: DR. SAÚL VILLA TREVIÑO

También agradezco a los miembros del Comité Tutor, por su invaluable apoyo y guía académica durante la realización de este trabajo:

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ

DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

Agradezco de manera muy especial:

A la Dra Ostrosky:

Ya que además de sus consejos y apoyo académico para llevar a cabo este trabajo y sobre todo TERMINARLO, me brindó su confianza para lograrlo.

A el Dr. Dueñas:

Por haberme involucrado en un proyecto científico épico; ya que el reto que significó para mi llevarlo a cabo y librar todos los obstáculos que se presentaron para seguir adelante, me ayudó enormemente para consolidarme como investigadora.

Y a todas las personas que colaboraron en la realización de este trabajo:

Dr. Enrique Pérez-Cárdenas, Dra. Lucía Taja-Chayeb, Dr. Philippe Anker, Dr. Roberto Herrera-Goepfert, Dr. Luis A. Medina-Velázquez, Dr. Alfredo Hidalgo-Miranda, QFP Judith Cruz-Velázquez, Dr. José Díaz-Chávez y al Dr. Miguel Gaxiola.

INDICE

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	III
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	7
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	100
CONCLUSIONES	111
REFERENCIAS	112
ANEXOS	119
ARTICULO	123

RESUMEN

La presencia de ácidos nucleicos (DNA y RNA) dispersos en fluidos corporales ó en circulación de organismos superiores y que no están confinados dentro de las células, se ha descrito desde hace varios años. Sin embargo, el papel biológico o funcional de éstos ácidos nucleicos circulantes tanto en individuos sanos como en diversos estados patológicos, hoy en día es poco claro. Varios reportes sugieren que el DNA circulante que es transferido a células eucariontes a partir de organismos procariontes o eucariontes puede ser replicado, transcrito y traducido en proteínas. Por otra parte, está bien documentado que la mayoría de las muertes por cáncer se deben principalmente a la diseminación de las células cancerosas y a la formación de tumores secundarios en órganos distantes (metástasis). Así mismo se ha probado que en la progresión tumoral puede participar la transferencia vertical de genes transformando a células no neoplásicas *in vitro*. Dado que se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la transferencia horizontal de DNA circulante con capacidad transcripcional, entonces el objetivo del presente trabajo fue demostrar la actividad transformante tanto *in vitro* como *in vivo* del DNA circulante presente en el sobrenadante de líneas celulares malignas y en el suero de pacientes con cáncer; así como su papel en el proceso de transformación celular.

Para demostrar la capacidad transformante *in vitro* del DNA circulante, se utilizaron células murinas NIH3T3 que fueron cultivadas con suero de pacientes con cáncer de colon o con sobrenadante de células SW480 de cáncer humano. Posteriormente, las células murinas tratadas se inocularon en ratones atímicos para demostrar su capacidad tumorigénica *in vivo*. Para determinar el papel del DNA circulante en el proceso de transformación celular, se diseñó un modelo *in vivo* en donde ratas inmunocompetentes fueron tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina, cuyo órgano blanco es colon y posteriormente se inocularon subdérmicamente en el dorso con células humanas SW480 como fuente de DNA circulante, con el fin de demostrar si éste participa en la progresión tumoral al aumentar la frecuencia de tumores en colon.

Nuestros resultados confirman las observaciones anteriormente reportadas en la literatura, sobre la capacidad del DNA circulante para inducir transformación celular *in vitro* y la tumorigénesis *in vivo*. Pero principalmente, demostramos que la transformación celular y la tumorigénesis de las células receptoras (NIH3T3), no se produce si el DNA circulante es eliminado del suero y del sobrenadante. Cabe resaltar que los datos obtenidos en el presente estudio a partir del modelo *in vivo*, demuestran claramente que en la progresión del cáncer también tiene un papel preponderante la transferencia horizontal del DNA circulante; ya que en los animales tratados con el carcinógeno e inoculados con las células malignas humanas (SW480), se detectó, en las células tumorales generadas, la coexistencia de DNA de rata y secuencias de DNA de origen humano; lo cual fue corroborado mediante PCR, secuenciación y FISH. Entre estas secuencias humanas se observó *K-ras* mutado, *RAB30* y secuencias repetitivas *ALU*; lo que no se observó en las células tumorales de las ratas que únicamente fueron tratadas con el carcinógeno. Además, demostramos una mayor frecuencia de tumores en colon y en otros órganos en las ratas tratadas con el carcinógeno e inoculadas con las células SW480; lo que no sucedió con los animales que en iguales condiciones, se sometieron a un tratamiento enzimático con DNAsa I y Proteasas (tripsina, quimotripsina y papaína) para eliminar el DNA circulante.

Aunque la contribución, en este fenómeno, de otras moléculas biológicamente activas distintas al DNA circulante no se puede descartar, nuestros resultados apoyan el hecho de que las células cancerosas secretan a la circulación DNA biológicamente activo, el cual puede participar en la progresión tumoral. Estudios adicionales del fenómeno de la progresión horizontal del cáncer mediada por DNA circulante es claramente indispensable para poder determinar si puede ser blanco en la terapia contra ésta enfermedad.

ABSTRACT

It is known that cancer progresses by vertical gene transfer, but this paradigm ignores that DNA circulates in higher organisms and that it is biologically active upon its uptake by recipient cells. Here we confirm previous observations on the ability of cell-free DNA to induce *in vitro* cell transformation and tumorigenesis by treating NIH3T3 recipient murine cells with serum of colon cancer patients and supernatant of SW480 human cancer cells. Cell transformation and tumorigenesis of recipient cells did not occur if serum and supernatants were depleted of DNA. It is also demonstrated that horizontal cancer progression mediated by circulating DNA occurs via its uptake by recipient cells in an *in vivo* model where immunocompetent rats subjected to colon carcinogenesis with 1,2-dimethylhydrazine had increased rate of colonic tumors when injected in the dorsum with human SW480 colon carcinoma cells as a source of circulating oncogenic DNA which could be offset by treating these animals with DNase I and proteases. Though the contribution of biologically active molecules other than DNA for this phenomenon to occur cannot be ruled out, our results support the fact that cancer cells emit into the circulation, biologically active DNA to foster tumor progression. Further exploration of the horizontal tumor progression phenomenon mediated by circulating DNA is clearly needed to determine whether its manipulation could have a role in cancer therapy.

INTRODUCCION

Los ácidos nucleicos que no están confinados dentro de las células, sino que se encuentran dispersos en fluidos corporales ó en circulación de eucariontes, se les denominan Ácidos Nucleicos Circulantes (1). Cabe destacar, que el concepto de ácidos nucleicos circulantes no es nuevo; ya que la presencia de DNA y RNA circulantes en cultivos de tejidos y en sangre de mamíferos, fue descubierta hace 66 años por Mandel, P y Metais, P (2). Desde entonces, se ha demostrado su presencia en varios medios extracelulares corporales; tales como sangre, esputo, saliva, líquido de ascitis, leche, fluidos de lavado bronquial, orina, médula espinal, líquido cefalorraquídeo en humanos y en otros vertebrados; además se han encontrado en circulación extracelular de plantas (3).

La liberación de ácidos nucleicos al ambiente extracelular es un fenómeno que también ha sido observado *in vitro*, ya que se ha detectado en el medio de cultivo de una variedad de células normales así como en el de diversas líneas tumorales (4). Anker y Stroun demostraron, en dos estudios distintos, que linfocitos humanos y aurículas de rana en cultivo liberan de forma espontánea DNA al medio de cultivo sin ninguna estimulación previa (5-6). Y en líneas celulares tumorales se detectaron además, mayores cantidades de DNA en el medio de cultivo comparados con las detectadas en el medio de células no malignas (7).

Actualmente, la presencia de ácidos nucleicos circulantes, se ha demostrado en una variedad de estados patológicos como lupus eritematoso, artritis reumatoide, enfermedades del tejido conectivo, vasculitis, glomerulonefritis, pancreatitis, colelitiasis, úlceras pépticas, hepatitis, esofagitis, inflamación sistémica, sepsis, traumatismos, heridas por quemaduras, diabetes, isquemia cerebral, infarto al miocardio, embolia pulmonar, pre-eclampsia, pacientes con trasplante de órganos, etc., (8-19); así como en individuos sanos (20-24).

Hoy en día está bien establecido que hay cantidades medibles de ácidos nucleicos circulantes, tanto en individuos sanos como en pacientes con diversas patologías. En el caso del DNA circulante presente en sujetos sanos, se ha cuantificado un promedio que va de 0 a 100ng/ml en sangre con una media de 30ng/ml; mientras que el promedio de DNA circulante en pacientes con alguna patología, va de 4ng/ml a 5µg/ml (25-26). Sin embargo,

INTRODUCCION

no se puede llegar a una conclusión definitiva de los niveles de DNA circulante reportados en la literatura, porque se han utilizado tanto diferentes metodologías para purificarlo (dependiendo del medio extracelular en el que se encuentre), como fenol-cloroformo, perlas magnéticas, columnas de sílica; así como distintas estrategias para cuantificarlo, como métodos basados en la fluorescencia (Pico Green, UV) o por PCR cuantitativo (20, 27-29). En lo que si coinciden la mayoría de las publicaciones, es en que la concentración de DNA circulante en pacientes con algún tipo de cáncer, es mayor que la cuantificada en individuos sanos (30-33). Así, la concentración promedio de DNA circulante que se ha cuantificado en el suero/plasma de pacientes con cáncer va de 5ng/ml a 2000 ng/ml; mientras que la de sujetos sanos va de 0.1ng/ml a 93ng/ml (29). Más aún, cuando se analizan los niveles de DNA circulante en pacientes con enfermedad avanzada o después de haber recibido radioterapia y/o quimioterapia, éstos se elevan considerablemente hasta µg/ml (34-35).

En cuanto a las implicaciones clínicas, diversas observaciones señalan al DNA circulante como un potencial biomarcador pronóstico y diagnóstico poco invasivo para un incrementado número de condiciones patológicas; desde diagnósticos prenatales de enfermedades Mendelianas y determinación del sexo a nivel del feto, a una indicación temprana de síndromes como el de Down, trisomía 18 y trisomía 13 (36); pre-eclampsia (37); o bien, a la determinación de los niveles de daño causado por trauma o golpe (38-39); así como un papel clave en enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso (40); y a la posibilidad de un diagnóstico y pronóstico específico de cáncer (41).

Son múltiples los trabajos que se han publicado en referencia al uso de los ácidos nucleicos circulantes como biomarcadores en cáncer (42-44); debido en primer lugar, a las altas concentraciones que son detectadas en pacientes con cáncer en comparación a las determinadas en sujetos sanos; y en segundo lugar, a que los ácidos nucleicos circulantes presentan características genéticas similares a las mostradas por los tumores neoplásicos y las cuales difieren de las que muestran condiciones benignas o normales; por lo que pueden reflejar (en mayor o menor grado dependiendo del tipo de cáncer del que se trate) el tamaño del tumor, el grado histológico, la eficacia del tratamiento y el riesgo de recurrencia del cáncer (45-46).

INTRODUCCION

Los cambios genéticos más comúnmente presentes en el DNA circulante de pacientes con cáncer son: **a) mutaciones**; la primera mutación en ser detectada en DNA circulante así como la más frecuente, es la del oncogén ras (H-ras, K-ras y N-ras) [47-49]; otras son del gen supresor de tumor, p53 (50); también se han reportado en el gen APC (51) y en el gen del EGFR (52); entre los más comunes. Y recientemente Shaw, *et al.*, (53) a través de un análisis genómico determinaron en DNA circulante la variación en el número de copias de genes específicos de pacientes con cáncer de mama, demostrando una clara separación entre pacientes y controles sanos. **b) translocaciones cromosómicas**; como son los rearrreglos siendo el del oncogén bcl-2 el mayormente reportado (54). **c) aberraciones en microsatélites (MA)**; como imbalances alélicos (AI) ó pérdida de heterocigocidad (LOH) [55-56]. **c) metilación aberrante del DNA**; lo más frecuentemente reportado es la hipermetilación de regiones promotoras de genes supresores de tumores como p14ARF, p16, APC, entre otros (57-59). **d) mutaciones de DNA mitocondrial**; la presencia en el DNA circulante de mutaciones somáticas observadas en el genoma mitocondrial (60-61).

En relación a las características físico-químicas y biológicas del DNA circulante poco se conoce; ya que la mayoría de los estudios se han enfocado a su aplicación clínica. Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones con respecto a las características que presenta el DNA circulante, provienen del que se ha extraído del plasma/suero de pacientes con cáncer (62-65). Estos trabajos reportan que las propiedades generales de este DNA se encuentran alteradas; particularmente, la estabilidad de su doble hélice está disminuida y por tanto, la exposición de este DNA inestable a carcinógenos químicos (como el DMBA y el CCNU) permite separar fácilmente la doble cadena y registrar un aumento en absorbancia con luz UV, 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 se añaden los carcinógenos, tal como ocurre con el DNA de células malignas, lo que permitió establecer que al menos una parte del DNA que se encuentra en circulación pertenece a células tumorales (62). Además, los mismos carcinógenos a concentraciones determinadas, estimulan la síntesis de DNA *in vitro*, y dicha síntesis, en presencia de un templado de DNA obtenido de células tumorales,

INTRODUCCION

es hasta 300% mayor que la de un DNA de una célula normal (62). Stroun, *et al.* (63-64) además de que demostraron que el DNA circulante es de doble cadena, mostraron que es resistente a la RNAsa y a la Pronasa, pero puede ser digerido con DNAsa I. Diversos análisis del DNA circulante, a través de ensayos por sedimentación en gradiente de sacarosa y por microscopía electrónica, muestran que éste consiste de fragmentos de doble cadena con tamaños que van de 30 kb a menos de 0.5 kb (65-69).

Se ha sugerido que el DNA circulante puede “viajar” en varias formas en los fluidos corporales: *i*) como DNA desnudo; *ii*) unido a proteínas del plasma/suero; *iii*) unido a la superficie celular; *iv*) empaquetado en vesículas con membrana, como los exosomas, las micropartículas y los cuerpos apoptóticos; *v*) asociado a histonas en forma de nucleosomas, como mono u oligonucleosomas; ó *vi*) en un complejo de lipoproteínas que incluyen polimerasas de DNA y RNA dependientes de DNA llamado virtosoma (70-73). Sin embargo, ésta característica biológica del DNA circulante hoy en día permanece poco clara; porque no se ha podido explicar como es que no es degradado por las nucleasas y más aún, como es que escapa a los mecanismos eficientes de depuración como la de los macrófagos, por ejemplo (29).

Aunque se ha demostrado que el DNA circulante está presente tanto en individuos sanos como en pacientes con alguna patología; actualmente el origen, la naturaleza y el o los mecanismos precisos de liberación de éste DNA circulante al medio extracelular, no son del todo bien entendidos. Con respecto al origen, la mayoría de los estudios han llegado a la conclusión que los ácidos nucleicos circulantes son predominantemente de origen endógeno (64, 70, 74). Así, Stroun, *et al.*, (74) y Lui, *et al.*, (19) sugieren que el DNA circulante detectado en individuos sanos se deriva de linfocitos u otras células nucleadas; mientras que en pacientes con cáncer en especial, se han reportado evidencias importantes del origen tumoral del DNA circulante; ya que se ha establecido que el espectro entero de cambios genéticos observados en los tumores primarios pueden detectarse en el DNA circulante de pacientes con tumores sólidos, lo cual sugiere que una parte importante de éste DNA se origina de células tumorales (64, 70 y 74). Sin embargo, cabe mencionar que la etiología viral de algunas enfermedades malignas está bien determinada; por lo que otra fuente

INTRODUCCION

importante de DNA circulante es exógena; y es el DNA viral. Por ejemplo, el virus del papiloma humano esta relacionado con el cáncer de cervix (CaCU); y la integración del mismo, es crítica para la transformación y la proliferación continua de algunos de los precursores tempranos del CaCU. Esto significa que el DNA viral integrado, está presente en el suero de pacientes con tumores primarios causados por infección viral, lo cual se ha demostrado en el plasma y en el suero de pacientes con CaCU (75-78).

El o los procesos por los que el DNA circulante es liberado al medio extracelular, actualmente no son muy precisos; por lo que se han propuesto los siguientes mecanismos:

a) *Lisis o necrosis de células malignas en circulación.* Durante la necrosis celular, fragmentos de DNA de tamaños variables (desde pocas kilobases hasta megabases de nucleótidos) es degradado de manera azarosa por la activación simultánea de proteasas lisosomales y nucleasas; sin embargo, una proporción de éste DNA escapa a la degradación y es liberado a la circulación. Sin embargo, el DNA circulante presente en plasma, consiste de fragmentos de doble cadena que al separarlos electroforéticamente se obtiene un patrón en escalera de 180 a 1000 pb; lo que sugiere que la necrosis es poco probable que sea una fuente importante de DNA circulante en condiciones normales (65). En diversos trabajos donde se han reportado niveles altos de DNA circulante, se sigue apoyando a la necrosis como un proceso de liberación de éste; pero estos reportes incluyen pacientes con neoplasias avanzadas o metastásicas (34, 79); en donde es lógico que exista una mayor probabilidad de células malignas circulantes. Pero, la necrosis no justifica los altos niveles de DNA circulante que se detectan en las primeras etapas de la enfermedad; que si bien no son tan elevados como en las etapas finales, sí superan en gran medida la cantidad detectada en individuos sanos (79). Además, la cantidad detectada de DNA circulante, no corresponde al número de células existentes en circulación; como lo demuestra el trabajo de Sorenson, *et al.* (47). El cálculo de éstos autores en relación con la cantidad de DNA circulante en plasma de pacientes con cáncer de páncreas, estima que si el mecanismo de liberación de éste es la lisis de células en circulación, entonces debería haber cerca de mil células por mililitro de plasma; esta cantidad estimada sobrepasa bastante el número de células encontradas en circulación. **b) *Apoptosis de células malignas.*** En los últimos años se ha dado gran énfasis a la posibilidad de que parte del DNA circulante proviene de

INTRODUCCION

procesos de muerte celular programada o apoptosis; porque consiste de fragmentos de doble cadena que al separarlos electroforéticamente se obtiene un patrón en escalera de 180 a 1000 pb; característico del DNA proveniente de cuerpos apoptóticos (65). Además, en otro estudio se observó, que el DNA circulante que se aisló de plasma de individuos sanos y se analizó mediante electrofóresis, presenta bandas de tamaño equivalente a múltiplos de DNA nucleosomal (1-5X); lo que corresponde a 185-200 pb (67); característicos de cortes inter-nucleosomales de la cromatina que se presentan en cuerpos apoptóticos (80).

c) Secresión metabólica activa. Aunque parte del DNA circulante se deriva de células apoptóticas, no hay duda que la mayor parte de éste es debido a una liberación activa de DNA sintetizado de novo por células vivas (81); como lo han demostrado desde hace muchos años, los trabajos de Stroun, *et al.* (82) en cultivos de aurículas de rana; Anker, *et al.* (83), en cultivos de linfocitos humanos; así como Rogers, *et al.*, (84-85) quienes reportaron que la activación de linfocitos humanos con fitohemaglutinina (PHA) origina que éstos dupliquen selectivamente diversas copias de una porción limitada de su genoma, las que son enseguida secretadas y detectadas en el medio de cultivo.

Es importante mencionar que aunque se ha planteado que el DNA circulante tumoral se deriva de la lisis de células malignas en circulación, de células apoptóticas o que es liberado por células malignas vivas; esta capacidad no está limitada a las células tumorales, ya que en individuos sanos se ha encontrado DNA circulante aún en cantidades bajas; además de que estos procesos no serían excluyentes y podría ser posible que el DNA circulante se origine por una combinación de los 3 mecanismos.

ANTECEDENTES

Un aspecto fundamental en el fenómeno del DNA circulante es su papel poco entendido tanto en individuos sanos como en diversos estados patológicos incluyendo el cáncer; y esto es debido a que hay una gran carencia de conocimiento acerca del significado funcional o biológico del DNA circulante. Desde que se propuso a la secreción metabólica activa como uno de los mecanismos de liberación del DNA circulante, se planteó que parte del DNA genómico sintetizado de novo por células vivas era liberado al exterior para mantener la homeostasis celular (82); sugiriendo que esta liberación es una de las funciones biológicas del DNA circulante. Es decir, que la célula viva expulsa al exterior parte de su DNA recién sintetizado para mantener un equilibrio intracelular, pero éste DNA liberado ¿qué papel desempeña en el medio extracelular después de evitar ser degradado?

Desde hace muchos años, se ha demostrado que la transferencia horizontal de genes es común en bacterias ya que juega un papel importante en la resistencia que presentan a antibióticos y a la adaptación que muestran a nuevos medio ambientes (86). También ocurre intercambio de material genético entre células de plantas (87); y se ha demostrado que células eucariontes pueden, bajo condiciones experimentales, tomar DNA y RNA exógeno (88). Además, las evidencias sugieren fuertemente, que el DNA circulante que es transferido a células de mamíferos puede ser replicado, transcrito y traducido en proteínas (89). A este respecto, varios autores han documentado la transferencia de DNA circulante con actividad transcripcional, entre organismos procariontes y eucariontes; como lo reportado por Anker, *et al.*, (90); quienes inyectaron intra-peritonealmente a ratones con bacterias vivas junto con Uridina-H³, seguida de la inoculación de un antibiótico para eliminar a las bacterias; posteriormente demostraron que este DNA bacteriano atraviesa la barrera cráneo-encefálica y se incorpora en el núcleo de las células cerebrales del ratón. Estos experimentos sugieren que el DNA bacteriano es capaz de incorporarse y transcribirse en las células del cerebro en modelos de animales. También se ha reportado la transferencia de DNA circulante con actividad transcripcional, entre organismos eucariotes y eucariontes; como lo demuestra el trabajo de Jachertz *et al.*, (91) quien trabajando con linfocitos humanos que llevan diferentes alotipos, los dividieron en sub-poblaciones B y T

ANTECEDENTES

y los cultivaron en presencia o en ausencia del virus Herpes Simplex inactivado con UV. Las células B o T aisladas no producen ninguna actividad anti-herpes; pero los linfocitos B cultivados en presencia de 1 o 50% del sobrenadante recuperado del cultivo de células T expuestos al virus, sintetizan un anticuerpo anti-herpes con algunos marcadores alotípicos del donante de las células T; los resultados sugieren que el DNA excretado por los linfocitos estimulados por el virus, fue transcrito en un RNA que codifica para un anticuerpo en los linfocitos B.

En otros estudios en los que utilizan células tumorales como el de Sparrow, *et al.*, (92) y Gupta, *et al.* (93), demostraron que las células murinas normales adyacentes a un tumor humano implantado en ratones desnudos, se transforman; sugiriendo que las células tumorales humanas, son las responsables de la transformación, ya que detectaron DNA humano en las células murinas. Más aún, las células humanas SW480 de carcinoma de colon, contienen una característica mutación en el gen K-ras en ambos alelos; y se ha detectado en el DNA circulante que libera al medio de cultivo. Cuando células de fibroblastos de ratón (NIH3T3) son incubados con el medio de cultivo de SW480, la presencia del gen mutado K-ras es detectada en las células NIH3T3; pero además, éstas células murinas muestran focos de transformación neoplásica. Es decir, el DNA liberado por las células del carcinoma de colon SW480, tiene una alta actividad transformante. Este es uno de los estudios más citados de Anker, *et al.* (94), con respecto al claro papel transformante del DNA circulante. Recientemente, se reportó que cuando células NIH3T3 de ratón se cultivaron en presencia de plasma de pacientes con cáncer de colon que contiene al gen mutado K-ras; la secuencia del oncogén se detectó en las células murinas. Además, cuando éstas células NIH3T3 derivadas de la incubación con el plasma de pacientes con cáncer de colon, se inyectaron en ratones inmunodeficientes, fueron capaces de inducir tumores, los cuales también mostraron la presencia de las secuencias de K-ras (95).

Sin embargo, hay diversos estudios que demuestran que cuando linfocitos de sujetos sanos se incuban con nucleosomas purificados de ternera, los linfocitos mueren por apoptosis (96); lo mismo sucede si los linfocitos de individuos sanos, son cultivados en presencia de plasma de pacientes con sepsis o diabetes (3). Estas evidencias sugieren que solamente el

ANTECEDENTES

DNA circulante que contiene en su secuencia oncogenes, es el que tiene capacidad transformante (1).

Por otra parte, hay autores que han ido mas allá con respecto al significado biológico que tiene el DNA circulante en cáncer; tal es el caso de Stroun, *et al.* (97); quienes al demostrar que a pesar de que las células vegetales no pueden migrar, hay generación de metástasis en algunas plantas ("crown gall"), sugieren que se debe a los ácidos nucleico circulantes (DNA o RNA). A partir de estas observaciones, los autores propusieron que un mecanismo adicional de generación de metástasis a distancia o recurrencias regionales lo constituye la transformación de células distantes al tumor, por la *transfección pasiva* o también llamado *transección* de ácidos nucleicos circulantes.

Otros trabajos como el de García-Olmo, *et al.*, (98) ha sugerido que las metástasis pueden desarrollarse como resultado de la transfección de células susceptibles en órganos blanco distantes con oncogenes dominantes que circulan en el plasma, los cuales se derivan de un tumor primario; a este fenómeno lo denominaron "genometástasis".

Estas evidencias nos conducen a sugerir que el DNA circulante tiene un significado biológico fundamental en el cáncer, ya que podría estar implicado en fenómenos cruciales tanto en el origen como en el desarrollo de ésta enfermedad; por lo que su estudio permitirá generar nuevas hipótesis, y a largo plazo, quizá nuevas alternativas de manejo terapéutico.

HIPOTESIS

Dado que se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* la transferencia horizontal de DNA circulante con capacidad transcripcional, entonces el DNA libre del sobrenadante de células malignas y el DNA libre presente en suero de pacientes con cáncer, serán capaces de transformar líneas celulares inmortales y de inducir tumores en ratones atímicos.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la actividad transformante tanto *in vitro* como *in vivo*, del DNA libre presente en el sobrenadante de líneas celulares malignas y en el suero de pacientes con cáncer.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Demostrar la transformación celular de la línea inmortal NIH-3T3, con sobrenadante de líneas celulares malignas de carcinoma de cérvix y colon (transformación morfológica, en agar y en ratones atómicos).
- 2.** Demostrar la transformación celular de la línea inmortal NIH-3T3, con suero de pacientes con cáncer de colon (transformación morfológica, en agar y en ratones atómicos).
- 3.** Demostrar la transferencia horizontal de DNA circulante en la línea celular transformada.
- 4.** Demostrar que secuencia oncogénicas presentes en el DNA libre del sobrenadante de la línea celular SW480 (de cáncer de colon) y del suero de pacientes con cáncer de colon, son las que originan la transformación celular.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico: (ver anexo)

- I. Muestras (sangre periférica y biopsia) de pacientes con diagnóstico histopatológico de Cáncer de Colon Avanzado.
- II. Muestras de sangre periférica de donadores sanos, como control.
- III. Líneas celulares de la ATCC: HeLa, SW480, NIH-3T3 y Swiss-3T3.
 - *BB1: cultivo primario de fibroblastos de prepucio humano.
 - *Caski, Calo, ViBo y ViPa: líneas celulares obtenidas de pacientes.
- IV. Ratones atímicos Balb/c (nu/nu), hembras.
- V. Ratas Wistar hembras.

Método:

Cultivos Celulares:

Las líneas celulares SW480, HeLa, NIH3T3, Swiss-3T3, Caski, Calo, ViBo y ViPa; se cultivaron cada una en el medio de cultivo anteriormente prescrito en la literatura (para SW480, Caski, Calo, ViBo y ViPa: DMEMF12; y para HeLa, NIH3T3 y Swiss-3T3: DMEM), pero complementado con 2% de Suero Fetal Bovino (SFB). Cuando las células llegaron a un 80% de confluencia, los sobrenadantes de cada una se colectaron con una pipeta estéril y se prepararon para los siguientes experimentos.

El cultivo primario de fibroblastos de prepucio (BB1) se derivó de la circuncisión del prepucio de un niño recién nacido bajo el consentimiento escrito de su padre. Este cultivo primario, se utilizó en el segundo pase o resiembra.

Preparación de los Sobrenadantes:

Los sobrenadantes colectados se procesaron para eliminar cualquier resto celular; primero, mediante una centrifugación a 400xg durante 20 min y luego por filtración, a través de un filtro de 0.45µm para eliminar células potencialmente contaminantes. Una alícuota de cada muestra de sobrenadante procesado de las líneas celulares, se sembraron en una caja de cultivo y se incubaron a 37°C durante 120 hrs para verificar la ausencia de células vivas. El resto del sobrenadante procesado, se utilizó para los ensayos posteriores de transformación y análisis del DNA circulante.

Para el estudio del DNA circulante 50ml de sobrenadante procesado se concentraron; primero con un sistema de ultrafiltración con una membrana de poro de 40kDa y enseguida con un equipo de vacío por velocidad, hasta un volumen de 10ml. El sobrenadante concentrado fue criopreservado inmediatamente a -80°C.

Colecta y Preparación de los Sueros:

La sangre se obtuvo de la vena periférica de los pacientes y de los sujetos sanos, en dos tubos Vacutainer (por individuo) que contienen un aditivo de activación de coágulos y un gel de barrera para aislar el suero. La sangre se mantuvo a 4°C, hasta su procesamiento dentro de las siguientes 2 h. Los sueros obtenidos se centrifugaron a 1,000x g por 20 min y enseguida se filtraron con una membrana de 0.45µm para remover células y detritus celulares.

MATERIAL Y METODOS

Extracción del DNA circulante del sobrenadante celular y de suero humano procesados.

La extracción de DNA circulante se realizó mediante la digestión del sobrenadante celular y del suero humano procesados, con una solución de SDS/proteínasa K seguido por la extracción con una solución de fenol/cloroformo (63). Brevemente, 500µl de suero o de sobrenadante se mezclaron con 500µl de SDS/proteínasa K y se incubaron durante toda la noche a 55°C. Un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1 v/v) se añadió a la mezcla anterior y se agitó en vortex; posteriormente se centrifugó a 3000rpm durante 10 min. La fase acuosa se recuperó y se mezcló con un volumen igual de cloroformo y se centrifugó a 3000rpm durante 5 min. La fase acuosa se precipitó durante toda la noche a -20°C con: acetato de amonio 7.5 M (1:10 v/v), 1µl de glucógeno y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. El botón de DNA obtenido, se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en H₂O. La cuantificación del DNA, se realizó utilizando el reactivo PicoGreen siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Extracción de RNA circulante del sobrenadante celular y del suero humano procesados.

El RNA circulante total, se aisló del sobrenadante celular y del suero humano procesados, utilizando el Kit QIAamp Viral RNA Mini, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Detección por PCR de la mutación K-ras, en el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 y en el suero humano procesado de pacientes con cáncer de colon.

Después de la extracción del DNA circulante de sobrenadante celular y de suero humano procesados por el método de Stroun, *et al.*, (63), las muestras se analizaron por PCR, para examinar la presencia de la mutación del codón 12 de K-ras^{V12} (99). La amplificación por PCR de un fragmento de 107 pares de bases se llevó a cabo en 20µl de volumen de reacción que contiene 100 ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmoles/L de KCl, 2 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de cada primer específico para K-ras^{V12} humano (5'-gactgaatataaactgtgtgtag-3' y 3'-ggacgaatatgatccaacaatag-5'). La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguida por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos incluyen desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 59°C durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 30 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Detección por PCR de los oncogénos E6 y E7 de HPV18 en el sobrenadante procesado de la línea celular HeLa y en el suero humano procesado de pacientes con cáncer cérvico-uterino.

En el sobrenadante procesado de la línea celular HeLa, se analizó por PCR la presencia de los oncogénos E6 y E7 de HPV 18 (77). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20µl que contiene 100 ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmoles/L de KCl, 1 µmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de cada primer específico para E6 (5'-gggggatcatggcgcgctttgaagatccaaca-3', y 3'-ggggaattcttatactgtgtttctctcgtcgcg-5') amplificando un fragmento de 450pb, y para E7 de HPV18 (5'-cccgcagagccgaaccacaac-3', y 3'-gggatgcacaccacggacacac-5') amplificando un fragmento de 300 pb. La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguida por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos incluyeron desnaturalización a 94°C durante 30

MATERIAL Y METODOS

seg, annealing a 57°C durante 30 seg, y una extensión a 72°C durante 30 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. La amplificación se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Detección por PCR y RT-PCR de los genes DHFR y Actina en el sobrenadante procesado de las líneas celulares SW480, HeLa y en suero humano procesado.

La amplificación de un fragmento de 120 pb del gen DHFR, se realizó en un volumen total de reacción de 20 µl que contiene 100 ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmoles/L de KCl, 1 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1µmol/L de cada primer específico para DHFR humano (5'-agaaccaccagaggagc-3', y 3'-acagaactgctccgactatc-5'). La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguida por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (7 min a 72°C). Los ciclos incluyen desnaturalización a 94°C durante 45 seg, annealing a 59°C durante 45 seg, y extensión a 72°C durante 45 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3%. La amplificación por RT-PCR de un fragmento de 320 pb del gen de actina se realizó en un volumen total de reacción de 20µl que contiene 100 ng de cDNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmoles/L de KCl, 2 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de cada primer específico para actina humana (5'-ggagtctgtggcatccacg-3', y 3'-ctagaagcatttgcggtgga-5'). La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguido por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (7 min a 72°C). Los ciclos incluyen desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 59°C durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 30 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Cuantificación de Proteínas.

Las proteínas extraídas de los sobrenadantes procesados, se cuantificaron utilizando el método de Bradford como se describió previamente (100), la lectura de las muestras se realice a una longitud de onda de 595 nm.

Identificación de algunas Estructuras Moleculares Asociados al DNA Circulante.

Para demostrar que el DNA circulante no se transporta desnudo sino como parte de un complejo de macromoléculas, el sobrenadante y el suero procesados se incubaron (por separado) con dos tipos de enzimas: DNasa I y Microccocal, que son capaces de degradar únicamente el DNA. Brevemente, 10ml del sobrenadante procesado y concentrado de la línea celular SW480 y 2ml de suero procesado de un sujeto control, se incubaron con 1 U de DNasa I/mg de DNA a 37°C por 60 min; mientras que otros 10ml del sobrenadante procesado y concentrado de la misma línea celular así como otros 2ml de suero del mismo sujeto control, se incubaron con 2U microccocal/µg of DNA a 37°C por 60 min. Para ambas enzimas, el resto de la reacción de digestión, se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

También se realizaron experimentos en los que el sobrenadante y el suero procesados se incubaron con la enzima Proteinasa K, que es capaz de degradar proteínas. Brevemente, 10ml del sobrenadante procesado y concentrado de la línea celular SW480 y 2ml de suero procesado de un sujeto control, se incubaron con 2.5U de proteinasa K/mg de proteína a 37°C por 60 min seguido de

MATERIAL Y METODOS

un periodo de inactivación a 80°C por 20 min. Posteriormente, se realizaron ensayos en donde los sobrenadantes procesados de SW480 (SW) y NIH3T3 (NH) se dividieron en alícuotas de 12.5 ml y se incubaron con proteinasa K y con DNasa I. Cada sobrenadante se dividió en cuatro grupos: 1) SW+DNasa I; 2) SW+Proteinasa K; 3) SW+Proteinasa K+ DNasa I y 4) SW sin enzimas. Los grupos control fueron: a) DMEM 2% SFB+DNA de esperma de salmón y b) DMEM 2% SFB+DNA de esperma de salmón + DNasa I. La reacción de digestión se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito anteriormente y a las instrucciones del fabricante de cada enzima. En todos los casos, el DNA se purificó, siguiendo la técnica anteriormente descrita de Stroun, *et al.*, (63), y se determinó su integridad en un gel de agarosa al 2%. Además, se verificó la degradación de las proteínas en geles de poliacrilamida al 7.5%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Demostración Microscópica de DNA Circulante.

Para demostrar la presencia de partículas de DNA circulante en el sobrenadante procesado de la línea celular SW480, se utilizó la técnica de tinción negativa. Brevemente, 100µl del sobrenadante procesado y concentrado de SW480, se fijaron en glutaraldehído al 2.5% durante 2 horas a 37°C. Posteriormente 50µl de esta muestra se depositó en la rejilla recubierta de carbono, se dejó secar durante aproximadamente un minuto y luego se cubrió con 50 µl de acetato de uranilo al 2%. Después de unos seg, se retiró el líquido con papel filtro y la muestra se examinó bajo el microscopio electrónico (101).

Transfección Pasiva de las células NIH3T3 de ratón.

Se realizaron ensayos de “transfección pasiva” (94), utilizando como sistema celular receptor, a la línea celular inmortal no transformada de ratón NIH3T3. Las células NIH3T3 se expusieron, separadamente, a el sobrenadante procesado de las líneas celulares malignas SW480 y HeLa; además a el sobrenadante procesado de las células Swiss y de NIH3T3 como control. También se llevaron a cabo los ensayos con el suero de tres pacientes con carcinoma de colon avanzado (y suero de tres donadores sanos como control). Brevemente, 100,000 células NIH3T3 se sembraron en placas de 12 pozos y se expusieron por separado a suero humano (1.815µg en 500µl) o al sobrenadante (0.09µg en 500µl) procesados, en una proporción 1:1 con medio de cultivo fresco (DMEM suplementado con SFB al 2%), por 14 días y con cambios de medio fresco y suero ó sobrenadante cada 24 hrs. Durante el tiempo de exposición, las células se monitorearon al microscopio. Después de 14 días de exposición (sólo siete días en el caso de las placas expuestas a suero humano), los cultivos se sometieron primeramente al análisis de las características de transformación maligna: Formación de Focos, Independencia al Anclaje y Potencial Tumorigénico; ensayos que se describirán más adelante.

Ensayos de Transformación.

Las células NIH3T3 transfectadas pasivamente con el suero de pacientes con cáncer de colon o con el sobrenadante de la línea celular SW480 sobrenadante, se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de transformación. También se expusieron células NIH3T3 con el suero de un donante sano como control. Las características utilizadas como indicadores de la transformación maligna fueron los cambios morfológicos (formación de focos), el crecimiento independiente del anclaje (crecimiento en agar blando) y tumorigenicidad como lo reportado en la literatura (102).

MATERIAL Y METODOS

Análisis Morfológico.

Durante el ensayo de transfección pasiva las células NIH3T3 expuestas al suero ó al sobrenadante procesados, fueron examinadas diariamente al microscopio de contraste de fase y cualquier alteración morfológica fue documentada fotográficamente. Al final del ensayo de transfección pasiva, se contabilizaron microscópicamente los focos formados en los cultivos expuestos a los sobrenadantes o a los sueros. Posteriormente se extrajeron (con ayuda de un microscopio de disección) algunos de los focos celulares que se formaron en cada uno de los cultivos de NIH3T3 expuestos a los distintos sobrenadantes celulares o al suero, para los ensayos de crecimiento en agar.

Crecimiento de Células en Agar Suave.

Todos los focos celulares rescatados de los distintos cultivos de NIH3T3 expuestos a los sobrenadantes celulares o al suero, se disgregaron con Tripsina-EDTA y se resuspendieron en una solución de medio DMEM que contenía 0.3% de agar noble y 15% de suero fetal bovino. Una capa de esta suspensión, se vertió sobre una capa de medio DMEM que contenía 0.7% de agar sin suero. Las células NIH3T3 derivadas de los focos formados de la transfección pasiva, se sembraron a una densidad de 5×10^5 células por placa de 10 cm^2 . Las placas fueron revisadas diariamente en un microscopio de disección y el número de colonias se contaron después de 14 días (una colonia se definió como aquella que contiene al menos 50 células). Cada una de las colonias obtenidas de los ensayos de crecimiento en agar, se disgregaron con Tripsina-EDTA, se cultivaron y se propagaron en condiciones estándar. Posteriormente, las clonas derivadas de las colonias formadas de los cultivos expuestos a la transfección pasiva, se analizaron para determinar la transferencia horizontal del DNA circulante presente en el sobrenadante de la línea celular humana SW480 y en el suero humano, a la línea celular murina NIH3T3. Para ello, se demostró la presencia de secuencias humanas mutadas de *K-ras*^{val12} mediante PCR y RT-PCR, como se describirá más adelante; y en paralelo con cada experimento de PCR y RT-PCR, se incluyeron cultivos control de células no tratadas con suero o sobrenadante.

Potencial Tumorigénico.

Para investigar el potencial tumorigénico de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 y con el suero procesado de pacientes con cáncer de colon, se realizaron ensayos *in vivo* (51) en ratones hembras de la cepa **Balb/C nu/nu** de 4-7 semanas de edad. Los animales se dividieron en 5 grupos; cada grupo consistió de 6 animales y se inyectaron por vía subcutánea (sc) con 2×10^6 de células de los diferentes grupos de células tratadas, resuspendidas en 100µl de medio de cultivo sin suero. Los grupos fueron: 1) células NIH3T3 sin tratar como control negativo (-Ctr); 2) la línea celular humana de adenocarcinoma de colon (SW480), como control positivo (+Ctr); 3) clona de células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 (SB1) y positiva para la mutación del codón 12 de *K-ras*^{val12} humana; 4) clona de células NIH3T3 expuestas al suero de sujetos sanos (SN); y 5) clona de células NIH3T3 expuestas al suero de pacientes con cáncer (CCP) y positiva para la mutación del codón 12 de *K-ras*^{val12} humana. El crecimiento de los tumores se vigiló en todos los animales y se registró semanalmente. El tamaño del tumor sc se midió con un vernier electrónico, y posteriormente se calculó el volumen tumoral con la siguiente fórmula: $a \times b^2 \times \pi/6 = v \text{ (mm}^3\text{)}$; donde a= diámetro

MATERIAL Y METODOS

mayor; b= diámetro menor. Todos los ratones portadores de tumor fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó un diámetro máximo de 2.5 cm³.

Análisis por Southern blot de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente.

Se aisló DNA genómico, por el método tradicional de extracción fenol/cloroformo (103), de la línea celular humana SW480 (control positivo) así como de la línea celular murina NIH3T3 (control negativo) y de un grupo de clonas celulares positivas para el oncogén *K-ras^{val12}* derivadas de las células NIH3T3 expuestas pasivamente a sobrenadante procesado y a suero humano procesado de pacientes con cáncer de colon. El DNA genómico de las células SW480, se marcó con Klenow siguiendo las instrucciones del kit (NEBlot), y posteriormente se hibridó con las líneas celulares SW480, NIH3T3 y con las clonas celulares anteriormente mencionadas (103). Brevemente, 10µg de DNA genómico de cada muestra, fue digerido con endonucleasas de restricción. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, se desnaturalizaron y se transfirieron a una membrana de nylon. Para la hibridación se utilizó la solución de Blotting Quimioluminiscencia BM que contiene la sonda de DNA marcada (100 ng/ml), durante 20 hrs a 42°C. La membrana con los fragmentos de DNA transferidos, se lavó en condiciones de alta rigurosidad en una solución que contenía SSC al 0.1X y SDS al 0.1% durante 90 min a 65°C; posteriormente se incubó con estreptavidina durante 30 min a temperatura ambiente y finalmente se colocó en el Hyperfilm ECL y se expuso durante 60 seg.

Análisis de la Presencia de Secuencias Humanas Específicas por PCR.

Para demostrar la transferencia de secuencias humanas, se analizó por PCR un grupo de clonas celulares positivas para el oncogén *K-ras^{val12}*, derivadas de las células NIH3T3 expuestas pasivamente a sobrenadante procesado de SW480 y a suero humano procesado de pacientes con cáncer de colon. Se diseñaron primers específicos humanos, para los siguientes genes: *RAB30*, *GRB2*, *CADH8*, *MAPRE2* y para las secuencias repetitivas humanas *ALU (YD6)* (104). El tamaño de los amplicones y la secuencia de los primers empleados para el PCR de cada gen fueron: 130-pb para *RAB30* (5'-gtcattaccagagttactaccg-3', and 3'-gacctgtgtctgcatattgttc-5'); 121-pb para *MAPRE2* (5'-ccagtggagaagctagtgaagga-3', y 3'-ctgtcgtgcctctacaggatcatc-5'); 120-pb para *GRB2* (5'-gacatacgtccagccctcttga-3', 3'-caagctcttccaccagttggg-5'); 170-pb para *CADH8* (5'-ctcagttttggcaaagcataatggattc-3', 3'-tcgacattgcaagactggacgaca-5') y un fragmento de 200-pb para *ALU-YD6* (5'-gagatcgagaccacggtgaaa-3', and 3'-ttgctctgaggcagagttt-5'). La amplificación por PCR se realizó en un volumen de reacción total de 20 µl que contiene 100 ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmoles/L de KCl, 1.5 mmol/L de MgCl₂ (para *CADH8*); 1 mmol/L de MgCl₂ (para *RAB30* y *GRB2*); 2 mmol/L de MgCl₂ (para *MAPRE2*); y 5 mmol/L de MgCl₂ (para *ALU-YD6*), 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de cada primers específico. La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguido por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos incluyeron desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 62°C durante 30 seg (para *RAB30*), annealing a 66°C durante 30 seg (para *GRB2*); annealing de 60.2°C a 67.2°C (touchdown) durante 30 seg (para *MAPRE2*); annealing a 59°C durante 30 seg (para *CADH8*) y 61°C (para *ALU-YD6*), y extensión a 72°C durante 30 seg. Reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Para las clonas celulares derivadas de las células NIH3T3 expuestas pasivamente a sobrenadante procesado

MATERIAL Y METODOS

de HeLa, se analizó por PCR la presencia del oncogén E7 de HPV 18 (77), en las condiciones experimentales descritas con anterioridad.

Análisis de la Expresión de Secuencias Humanas Específicas por RT-PCR.

Para la primera cadena de síntesis de cDNA, 1-5µg de RNA total fueron transcritos inversamente en un volumen total de reacción de 20µl que contiene 2µl de buffer de PCR 10X, 50 ng de random hexamers, 50 mM de MgCl₂, 200 ng de dNTPs, 0.1 M de DTT y 200U de transcriptasa reversa, durante 50 min a 42°C. La amplificación por PCR del cDNA se realizó en un volumen de reacción de 20µl que contiene 1 µg de cDNA, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmoles/L de KCl, 1 mmol/L de MgCl₂ (para *K-ras*^{V12} y *RAB30*); 2 mmol/L de MgCl₂ (para *MAPRE2*); 1.5 mmol/L de MgCl₂ (para *CADH8*); y 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1µmol/L de cada primer específico humano para *K-ras*^{V12} (5'-actgaatataaactgtgtagttggacct-3', y 3'-caaatacattatttctaccaggacct-5'); para *RAB30* (5'-gtccattaccagagttactaccg-3' y 3'-gacctgttgetggcatattgttc-5'); para *CADH8* (5'-ctcagtatttggcaaagcataatggattc-3', 3'-tcgacattgcaagactggacgaca-5') y para *MAPRE2* (5'-ccagtggagaagctagtgaagga-3', y 3'-cttgcgtgcctctacaggatcatac-5'). La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguido por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos incluyen desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 58°C (para *K-ras*^{V12}); 56°C (para *RAB30*); a 60.2°C a 67.2°C (touchdown) (para *MAPRE2*); a 59°C (para *CADH8*) durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 30 seg. El tamaño de los amplicones y la secuencia de los primers utilizados para la RT-PCR para *K-ras*^{V12} es de 357-pb; para *RAB30* es de 130 pb; para *MAPRE2* es de 121-pb y para *CADH8* es de 170-pb. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400 y los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Análisis por Fluorescencia de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente.

Se transfectó la línea celular SW480 con el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) que se encuentra inserto en el plásmido pEGFP-1, utilizando la técnica de transfección activa con Lipofectamina. Brevemente, un día antes de la transfección, las células NIH3T3 se sembraron a una densidad de 1x10⁵ células por pozo en 500µl de medio de cultivo (DMEM), sin antibióticos. Para cada transfección, la mezcla de DNA se preparó como sigue: 0.8 mg de DNA (plásmido y/o DNA genómico de SW480) se diluyó en 50 µl de medio DMEM sin suero y se mezcló. Dos µl de lipofectamina se diluyeron en 50 µl de DMEM, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se mezcló con el DNA diluido y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla (100µl volumen total) se añadió al pozo respectivo y las células se incubaron a 37°C durante 24 h. El ensayo se realizó por sextuplicado. Posteriormente, se cambió el medio y la selección con G418 se inició para obtener transfectantes estables. Después de 4 semanas de selección con G418, se verificó la expresión de la GFP por luz UV al microscopio óptico. Se eligió la clona con mayor porcentaje de expresión de la proteína (100% de las células); y el sobrenadante resultante de ésta clona celular, se procesó como se describió anteriormente y se añadió a las células NIH3T3 de la misma forma que en el caso de la transfección pasiva. Posteriormente, a través de visualización microscópica utilizando luz UV, se intentó detectar la presencia del DNA marcado con GFP de SW480, en las células NIH3T3. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y con un tiempo de exposición de 20 días, verificando cada 5 días la presencia de GFP en las células NIH3T3 que se transfectaron pasivamente.

MATERIAL Y METODOS

Detección por PCR del gene GFP en las células NIH3T3 transfectadas pasivamente.

Después de purificar el DNA genómico (103) de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 marcadas con GFP, se analizó por PCR la presencia del gen GFP en éstas; para demostrar la transferencia de secuencias humanas. La amplificación por PCR de un fragmento de 133 pares de bases se llevó a cabo en 20µl de volumen total de reacción que contiene 100 ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmoles/L de KCl, 1 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de cada primer específico para *GFP* humano (5'-gctcaggtagtggtgtc-3' y 3'-agaagaacggcatcaagg-5'). La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguida por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos incluyen desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 55°C durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 30 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Análisis por FISH de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente.

Los núcleos en interfase y los cromosomas en metafase de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente, se analizaron en preparaciones citogenéticas estándar, como se describió previamente (105), utilizando secuencias repetitivas humanas consenso. La sonda de DNA Cot humana, se marcó por nick translation con digoxigenina-11-dUTP (Roche) mediante el uso del DIG-Nick Translation Mix y se detectó utilizando un anticuerpo antidigoxigenina conjugado a un fluorocromo. Un mínimo de 100 núcleos se analizaron microscópicamente.

Análisis de fragmentos de DNA humano por secuenciación en las células NIH3T3 transfectadas pasivamente.

Para verificar el origen (humana o murina) de las secuencias amplificadas de los genes *K-ras*, *RAB30*, *GRB2*, *CADH8*, *MAPRE2*; los productos de PCR fueron secuenciados. Los amplicones del PCR se purificaron usando precipitación con isopropanol y luego se secuenciaron en ambas direcciones (forward y reverse), a partir de al menos dos productos de amplificación independientes. El DNA purificado se diluyó y secuenció utilizando el ABI BigDye Terminator v3.1 kit, según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en un analizador genético ABI3100. Los electroferogramas se analizaron en ambos sentidos. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de *K-ras* de referencia (GenBank DQ893829), *RAB-30* (GenBank NM_014488), *GRB2* (GenBank NM_203506), *CADH8* (GenBank NM_001796) y *MAPRE2* (GenBank NM_014268).

Hibridación de SNP Array y Análisis del Número de Copias de DNA, de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente.

El DNA genómico de células parentales de la línea celular SW480, el DNA circulante aislado del sobrenadante de la línea celular SW480 y el DNA genómico de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente, se hibridaron en el array de genotipificación de Affymetrix 500K para el análisis del número de copias de DNA; siguiendo el protocolo del fabricante. Para el análisis del número de copias del DNA, se utilizó el software Partek Genomics Suite. Todas las muestras se compararon contra un DNA de referencia, que fue un DNA humano normal común. Hibridaciones de alta

MATERIAL Y METODOS

calidad sólo se obtuvieron solo con el DNA genómico de SW480, así como con el DNA obtenido a partir del sobrenadante de SW480.

Transfección Activa de las células NIH3T3 de ratón con DNA Circulante, por el método de Lipofectamina.

Después de extraer DNA circulante del sobrenadante de la línea celular humana SW480 por el método de Stroun, *et al.*, (63), se transfectó la línea celular murina NIH3T3 con DNA circulante purificado, utilizando la técnica de transfección activa con Lipofectamina. Brevemente, un día antes de la transfección, las células NIH3T3 se sembraron a una densidad de 1×10^5 células por pozo en 500 μ l de medio de cultivo (DMEM), sin antibióticos. Para cada transfección, la mezcla de DNA se preparó como sigue: 0.8 mg de DNA (plásmido Neo/GFP y/o DNA circulante de SW480) se diluyó en 50 μ l de medio DMEM sin suero y se mezcló. Dos μ l de lipofectamina se diluyeron en 50 μ l de DMEM, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se mezcló con el DNA diluido y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla (100 μ l volumen total) se añadió al pozo respectivo y las células se incubaron a 37°C durante 24 hrs. El ensayo se realizó por sextuplicado. Posteriormente, se cambió el medio y se inició la selección con G418 para obtener transfectantes estables. Después de 4 semanas de selección con G418, se verificó la presencia del oncogén humano *K-ras*, *GRB2* y *RAB30* por PCR, como marcadores específicos de la línea celular humana SW480.

Digestión Enzimática del Sobrenadante Procesado de SW480 para los Ensayos de Transfección Pasiva de las células NIH3T3 de ratón.

Cincuenta ml de los sobrenadantes procesados de SW480 (SW) y de NIH3T3 (NH) se dividieron en alícuotas de 12.5 ml y se incubaron con Proteinasa K y/o DNasa I. Cada sobrenadante se dividió en cuatro grupos: 1) SW + DNasa I; 2) SW + Proteinasa K; 3) SW + DNasa I + Proteinasa K y 4) SW sin enzima. La reacción de digestión se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito anteriormente y a las instrucciones del fabricante de cada enzima.

Se llevaron a cabo experimentos de transfección pasiva en las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas, pero utilizando el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480 digerido con las enzimas DNasa I y Proteinasa K. Posteriormente, las células expuestas se analizaron para determinar la transferencia horizontal del DNA circulante presente en el sobrenadante de la línea celular humana SW480 a la línea celular murina NIH3T3. Para ello, se demostró la presencia de secuencias humanas mutadas de *K-ras* mediante PCR, como se describió anteriormente; y en paralelo con cada experimento de PCR, se incluyeron cultivos control de células no tratadas con sobrenadante.

Potencial Tumorigénico de las células NIH3T3 transfectadas activamente.

Para investigar el potencial tumorigénico de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado y digerido con las enzimas DNasa I y Proteinasa K de la línea celular SW480; y de las células NIH3T3 transfectadas activamente con el DNA circulante purificado del sobrenadante de las células SW480; se realizaron ensayos *in vivo* en ratones hembras de la cepa *Balb/C nu/nu* de 4-7 semanas de edad. Los animales se dividieron en 8 grupos; cada grupo consistió de 6 animales y se inyectaron por vía subcutánea (sc) con 2×10^6 de células de los diferentes grupos de células tratadas, resuspendidas en 100 μ l de medio de cultivo sin suero. Los

MATERIAL Y METODOS

grupos fueron: **1)** células NIH3T3 sin tratar como control negativo (-Ctr); **2)** la línea celular humana de adenocarcinoma de colon (SW480), como control positivo (+Ctr); **3)** clona de células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 (SB1) y positiva para la mutación del codón 12 de K-ras^{V12} humana; **4)** células NIH3T3 transfectadas activamente con DNA purificado de sobrenadante de SW480 (Neo+SpDNA); **5)** células NIH3T3 transfectadas activamente con DNA genómico de SW480 (Neo+Geno); **6)** células NIH3T3 transfectadas pasivamente con sobrenadante procesado y tratado con Proteinasa K y DNasa I (NIH3T3+Sp/DNaseI/Prot), de la línea celular SW480; **7)** células NIH3T3 transfectadas pasivamente con sobrenadante procesado y tratado con Proteinasa K (NIH3T3+Sp/Prot), de SW480; y **8)** células NIH3T3 transfectadas pasivamente con sobrenadante procesado y tratado con DNasa I (NIH3T3+Sp/DNaseI), de SW480. El crecimiento de los tumores se se vigiló en todos los animales y se registró semanalmente. El tamaño del tumor se midió con un vernier electrónico y se calculó el volumen tumoral con la fórmula anteriormente descrita. Todos los ratones portadores de tumor fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó un diámetro máximo de 2.5 cm³.

Transfección Pasiva: Modelos in vivo.

Se realizaron ensayos de “*transfección pasiva*” (**97**) *in vivo*, utilizando como sistema receptor 2 modelos animales. Los animales se expusieron por diferentes vías, a el sobrenadante procesado de la línea celular maligna HeLa. **1)** En el primer modelo, seis ratas hembras Wistar inmunocompetentes fueron inoculadas por vía intravenosa (iv), con el sobrenadante procesado de HeLa. Brevemente, la aplicación del sobrenadante procesado se realizó cada dos días mediante inyección en la vena caudal con un volumen total de sobrenadante de 1ml; y el mismo volumen pero de solución salina para el caso del grupo control. El tratamiento se prolongó durante 80 días. En el día 81 se sacrificaron las ratas y se realizó la necropsia para evaluar macroscópicamente la formación de tumores. Y los órganos principales (hígado, bazo, riñón, pulmón y útero) se procesaron tanto para evidencia tumoral microscópica (con H & E para el examen patológico) como para marcadores genéticos específicos de las células HeLa, como son los genes E6 y E7 de HPV18. Para éste último procedimiento, se purificó DNA genómico por el método convencional de extracción fenol/cloroformo (**103**). **2)** En el segundo modelo, se formaron 2 grupos de 6 ratones hembra Hsd:Athymic Nude-Foxn1tm de 6 semanas de edad por grupo. El grupo 1 se inyectaron cada 2 días por vía intraperitoneal (ip), con 500µl de sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa durante 90 días. En el día 91 los animales fueron sacrificados y se realizó la necropsia para evaluar macroscópicamente la formación de tumores. Y los órganos principales (hígado, bazo, riñón, pulmón y útero) se procesaron tanto para evidencia tumoral microscópica (con H & E para el examen patológico) como para marcadores genéticos específicos de las células HeLa, como son los genes E6 y E7 de HPV18. Para éste último procedimiento, se purificó DNA genómico por el método convencional de extracción fenol/cloroformo (**103**).

MATERIAL Y METODOS

Detección por PCR de los oncogénos E6 y E7 de HPV 18 en tejido de ratas inoculadas con el sobrenadante procesado de la línea celular HeLa.

Después de purificar el DNA genómico (103) de los órganos de las ratas Wistar que fueron inoculadas con el sobrenadante procesado de la línea celular HeLa, se analizó por PCR la presencia de los oncogénos E6 y E7 de HPV 18 (77). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20µl que contiene 100ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mmoles/L de KCl, 1 µmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 µmol/L de cada primer específico para E6 (5'-gggggatccatggcgcgctttgaagatccaaca-3', y 3'-ggggaattcttatactgtgtttctctcgtcg-5') amplificando un fragmento de 450pb, y para E7 de HPV 18 (5'-cccgacgagccgaaccacaac-3', y 3'-gggatgcacaccaggacacac-5') amplificando un fragmento de 300 pb. La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguida por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos incluyeron desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 57°C durante 30 seg, y una extensión a 72°C durante 30 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400. La amplificación se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Transfección Pasiva de células primarias normales humanas .

Para investigar el papel del DNA circulante en la transformación celular como iniciador o promotor de la carcinogénesis, las células BB1 (fibroblastos primarios normales de prepucio humano) se expusieron pasivamente (94), a el sobrenadante procesado de la línea celular maligna SW480; además de los sobrenadantes procesados de las células Swiss y de NIH3T3 como control. Brevemente, 100,000 células BB1 (pase 2), se sembraron en placas de 12 pozos y se expusieron por separado a el sobrenadante procesado, en una proporción 1:1 con medio de cultivo fresco (DMEM suplementado con SFB al 2%), por 45 días y con cambios de medio fresco cada 24 hrs. Durante el tiempo de exposición, las células se monitorearon al microscopio. Después de 45 días de exposición, las células se disgregaron con Tripsina-EDTA y se propagaron en condiciones estándar.

Potencial Tumorigénico de las células primarias normales humanas expuestas al sobrenadante procesado de la línea celular maligna SW480.

También se investigó el potencial tumorigénico de las células BB1 transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (BB1+Sp); en ratones hembras de la cepa *Balb/C nu/nu* de 4-7 semanas de edad. Los animales se dividieron en 3 grupos; cada grupo consistió de 6 animales y se inyectaron por vía subcutánea (sc) con 2×10^6 de células de los diferentes grupos de células tratadas, resuspendidas en 100µl de medio de cultivo sin suero. Los grupos fueron: 1) células BB1 sin tratar como control negativo (-Ctr); 2) células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 (NIH3T3SW) y positiva para la mutación del codón 12 de K-ras^{V12} humana; 3) células BB1 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 (BB1SW) y positiva para la mutación del codón 12 de K-ras^{V12} humana. El crecimiento de los tumores se vigiló en todos los animales y se registró semanalmente. El tamaño del tumor sc se midió con un vernier electrónico, y posteriormente se calculó el volumen tumoral con la fórmula anteriormente descrita. Todos los ratones portadores de tumor fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó un diámetro máximo de 2.5 cm³.

MATERIAL Y METODOS

Participación del DNA circulante en el proceso de transformación celular: modelos in vivo.

Con el fin de demostrar el papel que tiene el DNA circulante en la transformación celular, se realizó el siguiente experimento: Se formaron 4 grupos de 4 ratas hembras de la cepa *Hsd:RH-Foxn1^{tmu}* de 4-7 semanas de edad por grupo. Cada grupo tuvo un tratamiento distinto: **a)** Se inyectaron cada semana por vía subdérmica, una mezcla de drogas (Doxorrubicina; 0.8mg/Kg; y Paclitaxol: 2.4mg/kg); **b)** Se inyectaron cada semana por vía intravenosa, cuerpos apoptóticos provenientes de la línea celular humana HeLa. Brevemente, los cuerpos apoptóticos se obtuvieron después de exponer 2×10^6 células HeLa, a altas dosis de cisplatino (75 μ M) por 24 hrs, teniendo un 99% de mortalidad. Posteriormente, las células apoptóticas se colectaron por centrifugación a $400 \times g$ durante 10 min, se lavaron en PBS tres veces para eliminar cualquier resto de cisplatino. La inoculación de los cuerpos apoptóticos se realizaron cada dos días mediante inyección en la vena caudal en un volumen total de 100 μ l de solución salina; **c)** Se inyectó la mezcla de drogas + los cuerpos apoptóticos a los tiempos, vías y dosis antes señaladas; y **d)** Se inyectó solución salina a un mismo volumen, tiempos y vías antes señaladas (grupo control). El tratamiento se prolongó durante 60 días. En el día 61 se sacrificaron las ratas y se realizó la necropsia para evaluar macroscópicamente la formación de tumores. Y los órganos principales (hígado, bazo, riñón, pulmón y útero) se procesaron tanto para evidencia tumoral microscópica (con H & E para el examen patológico) como para marcadores genéticos específicos (por PCR) de las células HeLa, como son los genes E6 y E7 de HPV18; además se analizó la presencia de secuencias repetitivas humanas *ALU* (104); siguiendo las condiciones experimentales anteriormente descritas. Para éste último procedimiento, se purificó DNA genómico por el método convencional de extracción fenol/cloroformo (103).

Evaluar en un modelo in vivo, la participación del DNA circulante en la progresión tumoral.

Con el objetivo de determinar en que etapa del proceso de carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión) participa el DNA circulante, se realizó el siguiente experimento utilizando un modelo *in vivo*: Ratas Wistar hembra de 6 semanas de edad, se dividieron en 8 grupos. El tratamiento de cada grupo fue el siguiente (Fig. 44): **i)** sin tratamiento (7 ratas); **ii)** inyección por vía intraperitoneal, del carcinógeno de colon DMH durante 20 semanas siguiendo el protocolo reportado por Perse, *et al.*, (106) (12 ratas); **iii)** sólo la inoculación subcutánea en los flancos de la rata, de 1×10^6 células SW480 por lado (diluidas en 100 μ l de medio DMEM sin suero). La aplicación de las células se realizó en el día 28 y 49 correspondientes al tratamiento con el DMH (7 ratas); **iv)** el régimen de tratamiento del DMH **más** el esquema de inoculación subcutánea de las SW480 (16 ratas); **v)** el régimen de tratamiento del DMH **más** el esquema de inoculación subcutánea de las SW480, **más** tratamiento enzimático con DNasa I/Proteasas (6 ratas). El tratamiento enzimático consistió en el siguiente esquema: DNasa I a una dosis de 2.3mg/Kg inyectada vía intramuscular y una mezcla de proteasas: tripsina, quimotripsina, y papaína, aplicada vía intraperitoneal a dosis de 10 mg/kg, 10 mg/kg y 25 mg/Kg, respectivamente, de acuerdo a lo reportado por Wald, *et al.*, (107). La DNasa I se resuspendió en 100 μ l de solución salina para su inoculación a cada animal; mientras que la mezcla de proteasas, se resuspendió en 300 μ l de solución salina, para su aplicación en cada animal. Las inyecciones se administraron todos los días, excepto los fines de semana; y el tratamiento duró 8 semanas. **vi)** el régimen de tratamiento del DMH **más** tratamiento enzimático con DNasa I/Proteasas (5 ratas); **vii)** el régimen de tratamiento del DMH **más** el esquema de inoculación subcutánea de las SW480, **más** tratamiento enzimático pero sólo con DNasa I (5 ratas); y **viii)** el

MATERIAL Y METODOS

régimen de tratamiento del DMH más el esquema de inoculación subcutánea de las SW480, más tratamiento enzimático pero sólo con Proteasas (5 ratas). Después se realizó una evaluación clínica de los animales tratados con el micro PET-CT (como se describe a continuación). Los animales fueron sacrificados a las 44 semanas de iniciado el experimento y se realizó la necropsia para evaluar macroscópicamente la formación de tumores. Los órganos principales (intestino, hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón y útero) se procesaron para el examen histopatológico (H & E) y para posteriores análisis celulares y moleculares.

Se incluyó un control adicional de animales (ratas Wistar hembras inmunocompetentes de 6 semanas de edad), para evaluar el destino de las células humanas SW480 cuando son inoculadas subcutáneamente. Brevemente, las ratas se dividieron en 6 grupos de 2 animales cada uno; cinco grupos fueron inoculados subcutáneamente (sc) con 10 millones de células SW480 (diluidas en 300µl de medio DMEM sin suero) por flanco y se sacrificaron en los días 1, 2, 3, 7 y 14 respectivamente después de la inoculación celular. El sexto grupo sólo se inoculó con el vehículo de administración (300µl de medio DMEM sin suero), y se sacrificaron en los días 1 y 14 después de la inyección. En todos los animales, se removió el sitio donde se aplicó la inyección celular o del vehículo, y se procesó para el análisis histológico de rutina con H & E. Para todos los ensayos con animales, se obtuvieron aprobaciones éticas de la Junta Institucional de Ética de Investigación y el Comité de Protección a los Animales.

Análisis del desarrollo tumoral por microPET-CT

El desarrollo tumoral en los animales, se monitoreó utilizando técnicas de imagen molecular con un equipo de microPET-CT marcando con FDG-F¹⁸. El monitoreo tumoral se realizó a la semana 15 y 24 después de iniciado el tratamiento con el carcinógeno DMH. Para cuantificar la actividad tumoral, el valor estándar de captación (SUV) se calculó utilizando el software del sistema (Carestream Molecular Imaging, CT, EE.UU.). El SUV es una herramienta cuantitativa para los estudios de PET-CT, que permite la determinación de la concentración de FDG-F¹⁸ en una región específica de interés (es decir, en donde hay actividad tumoral). La presencia del tumor se definió cuando la relación SUV (tumor/hígado) fue ≥ 1.5 .

Microdissección de los tejidos tumorales.

Se tomó un tumor de colon de cada grupo de ratas tratadas con el carcinógeno DMH (el cual fue previamente fijado con formalina y embebido en parafina), y se cortaron en un microtomo en secciones de 5µm, con cuchillas desechables. Para la microdissección los cortes de los tumores se procesaron como sigue: se desparafinaron en dos cambios de xileno durante 10 min, luego se rehidrataron en etanoles graduales al 100%, 90% y 70% durante 5 min cada uno; enseguida los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) durante 45 seg, se enjuagaron en H₂O libre de RNasas durante 30 seg, y finalmente se sumergieron en etanol al 100% durante 1 min. Se utilizó para la microdissección, el sistema láser MicroBeam PALMA. Brevemente, una vez que se seleccionaron las células de interés, las células adyacentes a éstas se fotolizaron con el microhaz del equipo. Posteriormente, para recuperar las células seleccionadas de la laminilla, un micromanipulador controlado por computadora y con agujas estériles convencionales se utilizaron para recogerlas y transferirlas a un tubo de reacción.

MATERIAL Y METODOS

Análisis de la Presencia de Secuencias Humanas Específicas por PCR en tejido tumoral de rata

Se purificó DNA genómico de los tumores de colon de cada grupo de ratas incluidas en el modelo, para demostrar la transferencia de secuencias humanas, mediante el análisis por PCR. Se utilizaron los mismos primers específicos humanos anteriormente usados para los modelos *in vitro* e *in vivo* de transferencia de DNA circulante, para los genes: *RAB30*, *GRB2*, *CADH8*, *MAPRE2* y para las secuencias repetitivas humanas *ALU* (*YD6*) (104). Las características de los amplicones así como las condiciones experimentales fueron semejantes a las descritas con anterioridad.

Análisis por PCR de las secuencias LINE 1 específicas de rata.

Se purificó DNA genómico de las células tumorales extraídas por microdissección de los tumores de colon de cada grupo de ratas incluidas en el modelo. El DNA se aisló siguiendo las instrucciones del Kit de extracción de Arcturus^RPicoPure^R. Además se purificó DNA genómico de células humanas y de cola de rata, por el método de Sambrook (103), como controles para las reacciones de PCR. Para la amplificación de un fragmento de 230 pares de bases de una secuencia repetitiva específica de rata (*LINE-1*), las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20µl que contiene 100ng de DNA templado, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/L de KCl, 1 mmol/L de MgCl₂, 200 mmol/L de cada dNTP, 0.25 U de Taq polimerasa y 1 mmol/L de cada primer específico para *LINE-1* (5'-aaatcagggactagacaaggctgc-3' y 3'-cccagccacttgctgaagttgt-5') (108). La desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min fue seguido por 40 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Los ciclos de amplificación consistieron en desnaturalización a 94°C durante 30 seg, annealing a 59°C durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 30 seg. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador 2400; y los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Análisis de fragmentos de DNA humano por secuenciación en tejido tumoral de rata

Para verificar el origen (humana o de rata) de las secuencias amplificadas de los genes *RAB30*, *K-ras*, *GRB2*, *CADH8*, *MAPRE2*; los productos de PCR obtenidos de los tumores de colon de rata, fueron secuenciados. Los amplicones del PCR se purificaron usando precipitación con isopropanol y luego se secuenciaron en ambas direcciones (forward y reverse), a partir de al menos dos productos de amplificación independientes. El DNA purificado se diluyó y secuenció utilizando el ABI BigDye Terminator v3.1 kit, según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en un analizador genético ABI3100. Los electroferogramas se analizaron en ambos sentidos. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de *K-ras* de referencia (GenBank DQ893829), *RAB-30* (GenBank NM_014488), *GRB2* (GenBank NM_203506), *CADH8* (GenBank NM_001796) y *MAPRE2* (GenBank NM_014268).

Análisis por FISH de secuencias humanas ALU y de rata Línea-1 en tumores de colon de ratas tratadas con DMH.

Se realizó el análisis por FISH, de los cortes histológicos de los tumores de colon de las ratas tratadas con DMH. Brevemente, los cortes se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en una serie de alcoholes graduales. Posteriormente los cortes fueron pre-tratados con 0.2 M de HCl, tiocianato de sodio al 8% y 0.5% de pepsina. Previamente, las secuencias humanas y las de rata, fueron marcadas con el kit de FISHBright siguiendo las instrucciones del mismo; las secuencias

MATERIAL Y METODOS

ALU humanas se marcaron con rojo-fluoresceína, mientras que las secuencias *LINE-1* de rata se marcaron con verde-fluoresceína. Una vez que los cortes de los tumores fueron pre-tratados, se les añadió al mismo tiempo las secuencias marcadas; enseguida se cubrieron los cortes con un cubreobjetos y se sellaron con pegamento. Posteriormente, las cortes se desnaturalizaron e hibridaron en un Hybridizer a 37°C durante toda la noche. El pegamento y los cubreobjetos se retiraron y los cortes se lavaron rigurosamente con el amortiguador **SSC**: SSC 2x durante 30 min a temperatura ambiente; SSC 0.4x **más** 0.3% de NP40 durante 5 min a 75°C y SSCx2 **más** 0.1% de NP40 durante 4 min a temperatura ambiente. Los núcleos se contratiñeron usando 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 0.1µg/ml en Antifade. Los análisis se realizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss interconectado con el sistema de CytoVision.

Efecto Antitumoral del Tratamiento Enzimático.

Para determinar el efecto que tienen las enzimas sobre el tumor, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* que consistió en lo siguiente: Se utilizaron ratones atímicos BALB/c (nu/nu) hembras de 4 a 7 semanas de edad; se dividieron en 4 grupos. Cada grupo consistió de 12 animales y todos fueron inoculados por vía subcutánea (sc) con 2×10^6 células SW480 humanas suspendidas en 100µl de DMEM sin suero. Los grupos fueron: **i)** sólo inyección de células SW480, como control positivo no tratado (+ Ctr); **ii)** inyección de células SW480 **más** el tratamiento sólo con la mezcla de proteasas (tripsina, quimotripsina y papaína - a una dosis de 10 mg/kg, 10 mg/Kg y 25 mg/Kg respectivamente-) (**107**); **iii)** inyección de células SW480 **más** el tratamiento sólo con DNasa I (2.3mg/Kg); e **iv)** inyección de células SW480 **más** tratamiento con proteasas + DNasa I. El tratamiento con DNasa I fue por vía intramuscular; mientras que la mezcla de proteasas, se administró por vía intraperitoneal. Todas las enzimas fueron diluidas en solución salina. Los tratamientos se administraron diariamente por 3 semanas. El crecimiento de los tumores fue monitoreada en todos los animales y registrados semanalmente. El tamaño del tumor se midió con un vernier electrónico. Todos los ratones portadores de tumor se sacrificaron cuando el tamaño tumoral alcanzó un diámetro máximo de 2.5 cm.

RESULTADOS

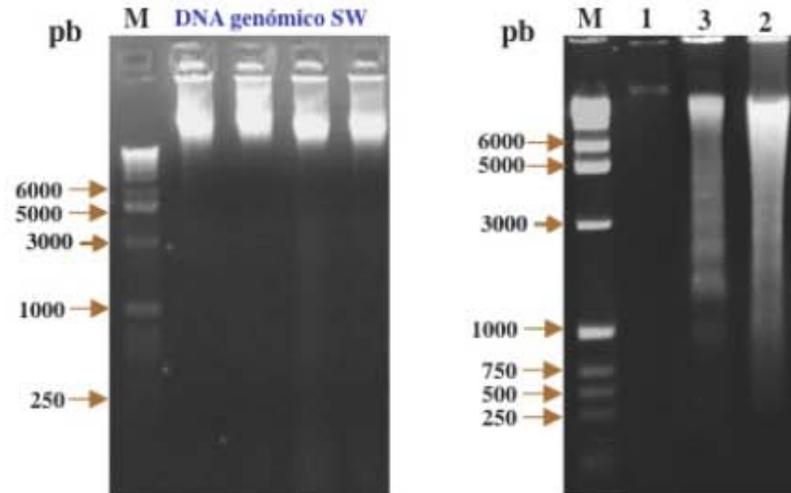
1. Purificación y caracterización de los ácidos nucleicos circulantes presentes tanto en el sobrenadante celular como en el suero de individuos.

Se purificó DNA y RNA circulantes presentes en el suero humano (de un individuo sano y de uno con cáncer) así como los que se encuentran en el sobrenadante de varias líneas celulares humana (Caski, HeLa, CaLo, ViBo, ViPa y SW480) (**Fig. 1**). Como se muestra en la **Fig. 1A**, el DNA circulante que se purificó contiene fragmentos de diferentes tamaños que van de menos de 2,000 pares de bases a más de 12,000 pares de bases, comparado con el DNA genómico en el que no se observa ningún tipo de fragmentación. Mientras en la **Fig. 1B**, se muestra que en el RNA circulante que se purificó tanto de suero humano como de sobrenadante de células humanas, no es evidente las dos bandas características correspondientes a los rRNA's (18S y 28S); que si se observa en el RNA genómico (Ver **Fig. 1B**).

Interesantemente, se determinó que la concentración de ácidos nucleicos circulantes (DNA y RNA), difiere bastante si provienen de un sujeto sano (menor concentración) o de un sujeto con cáncer (mayor concentración) (Ver **Tabla I**). También se encontró que hay una mayor concentración de RNA que de DNA en el suero humano, independientemente de si proviene de un sujeto sano o de uno con cáncer (Ver **Tabla I**). Con respecto a los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante de líneas celulares, se observó que hay una mayor concentración de DNA que de RNA; caso contrario a lo detectado en suero humano.

RESULTADOS

A) DNA



B) RNA

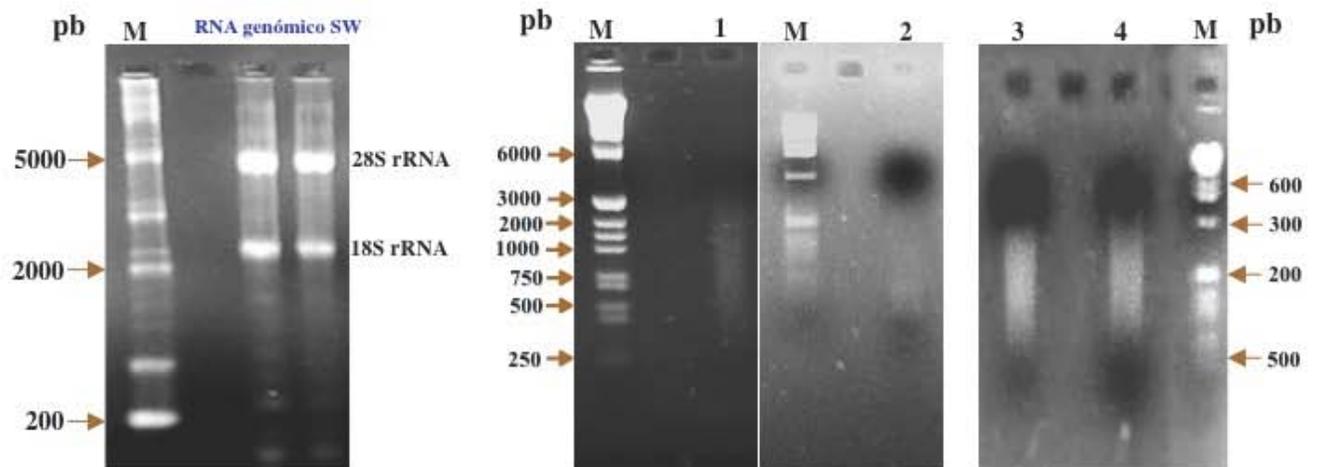


FIG 1. Geles de agarosa al 2.5% que muestra el DNA (a) y RNA (b) purificados presentes en el suero humano y en sobrenadante de líneas celulares humanas, comparados con el DNA y RNA genómicos purificados. M: marcador de peso molecular; 1: suero de un individuo sano; 2: suero de un paciente con cáncer de colon; 3: sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (SW); 4: sobrenadante procesado de la línea celular HeLa.

RESULTADOS

TABLA I. Concentración de Ácidos Nucléicos Circulantes Presentes tanto en el Suero Humano como en el Sobrenadante de Distintas Líneas Celulares.

Procedencia del ácido nucleico	Tipo de ácido nucleico circulante	Concentración
Sobrenadante*	DNA	23 a 275 µg/ml
Suero humano	DNA	sano: 2 a 10 ng/ml cáncer: 2 ng/ml a 5 µg/ml
Sobrenadante*	RNA	87 a 157 µg/ml
Suero humano	RNA	sano: 7 a 27 µg/ml cáncer: 28 a 80 µg/ml

Fleischhacker M., et al., 2006.

DNA en plasma/suero humano sano 1.8 a 318ng/ml

DNA en plasma/suero humano con cáncer 3.7ng/ml a 5.4µg/ml

RNA en plasma/suero humano sano 1 ng a 144µg/ml

RNA en plasma/suero humano con cáncer 920ng/ml

* Los resultados representan el promedio de DNA y RNA purificados a partir de diferentes líneas celulares (Caski, HeLa, Calo, ViBo, ViPa y SW480)

Para demostrar que los ácidos nucleicos circulantes que se purificaron a partir de suero humano o de sobrenadante de líneas celulares humanas, se pueden utilizar para análisis moleculares (PCR, RT-PCR, etc); se amplificaron por PCR un fragmento del codón 12 de K-ras mutado humano (**Fig. 2**), un fragmento del gen constitutivo humano DHFR (**Fig. 3**), un fragmento del gen E7 de HPV18 (**Fig. 4**). Y por RT-PCR se amplificó el gen humano actina (**Fig. 5**) y un fragmento del gen constitutivo humano DHFR (**Fig. 6**). Como se muestra en las **Figs. 2-6**, tanto el DNA como el RNA circulante, son amplificables.

RESULTADOS

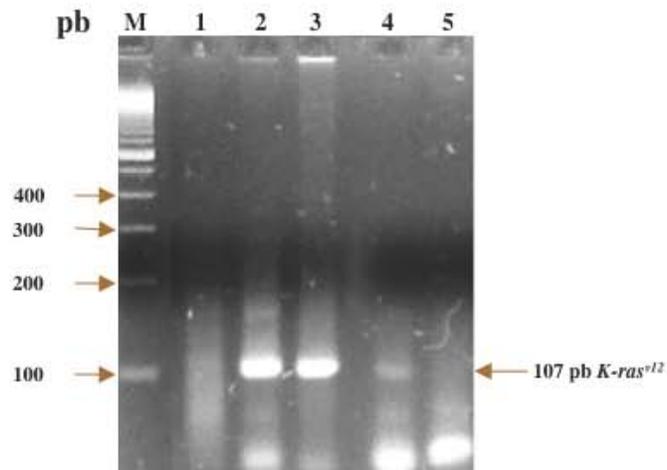


FIG 2. Detección por PCR de un fragmento que contiene la mutación en el codón 12 del exón 1 del oncogén *K-ras*^{v12} utilizando DNA proveniente de suero humano o de sobrenadante de una línea celular humana. **M:** marcador de peso, **1:** H₂O; **2:** DNA genómico de la línea celular humana SW480; **3:** DNA de sobrenadante de SW480; **4:** DNA de suero de paciente con cáncer de colon; **5:** DNA genómico de la línea celular murina NIH3T3.

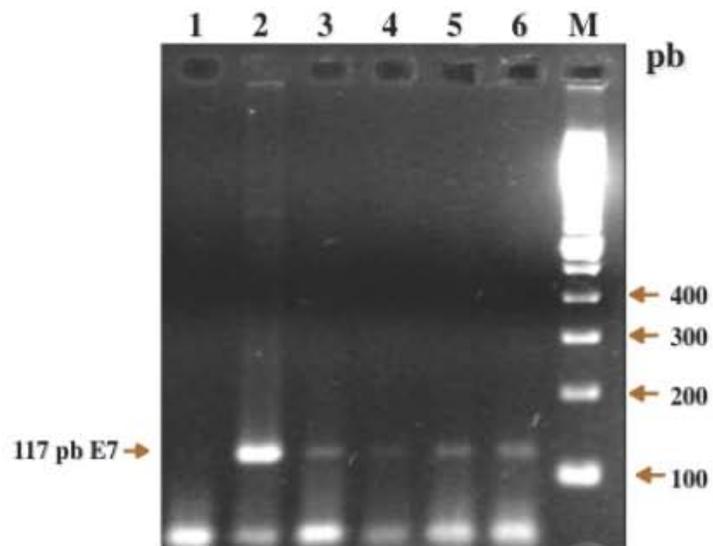


FIG 4. Detección por PCR de un fragmento del gen E7 de VPH 18 en el DNA de suero de pacientes con cáncer cérvico-uterino. **M:** marcador de peso; **1:** H₂O; **2:** línea celular HeLa (control +); **3-6:** DNA de suero de pacientes con cáncer cérvico-uterino.

RESULTADOS

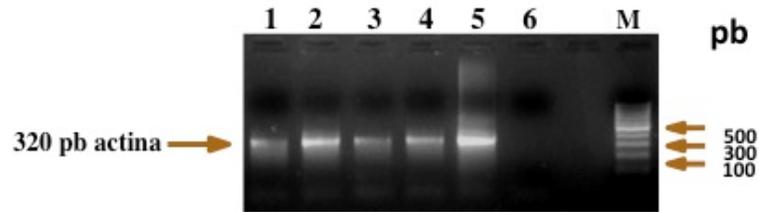


FIG 5. Detección por RT-PCR de un fragmento del gen constitutivo actina en el cDNA de suero de pacientes con cáncer de colon. M: marcador de peso; 1 y 3: RNA de suero de un sujeto sano; 2 y 4: RNA de suero de paciente con cáncer de colon; 5: RNA genómico de la línea celular SW480 (control +); 6: H₂O.

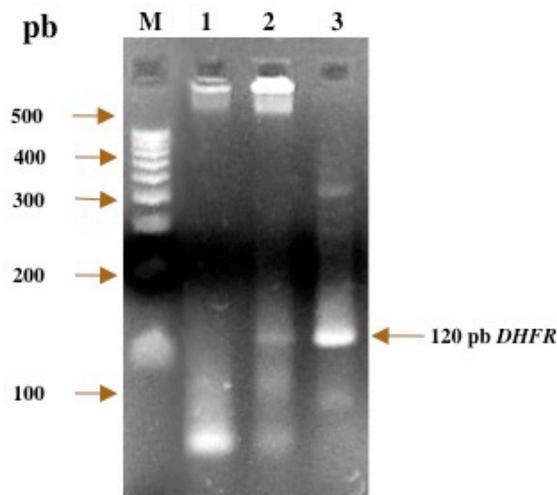


FIG 6. Detección por RT-PCR de un fragmento del gen constitutivo *DHFR* en el cDNA de sobrenadante de la línea celular humana SW480. M: marcador de peso, 1: H₂O; 2: RNA del sobrenadante de SW480; 3: RNA genómico de SW480.

Un aspecto importante de los ácidos nucleicos libres, es la forma como se ha sugerido que circulan en el torrente sanguíneo o en el sobrenadante celular: ya sea desnudos; unidos a proteínas del plasma/suero; unidos a la superficie celular; empaquetados en vesículas con membrana (como exosomas, micropartículas y cuerpos apoptóticos); asociados a histonas en forma de nucleosomas (como mono u oligonucleosomas); o en un complejo de

RESULTADOS

lipoproteínas que incluyen polimerasas de DNA y RNA dependientes de DNA llamado virtosoma (70-73). Nuestros resultados de microscopía electrónica sugieren que, al menos los ácidos nucleicos, no están protegidos por una membrana; sin embargo, parece que se encuentran asociados a macromoléculas y con un arreglo estructural semejante a lo que se observa en los nucleosomas (ver resultados más adelante). Por ello, se realizaron algunos ensayos con los ácidos nucleicos circulantes presentes en el sobrenadante de la línea celular SW480, con el fin de identificar algunas de las estructuras moleculares asociadas a estos.

Brevemente, el sobrenadante se con dos tipos de enzimas (DNasa I* y Micrococcal**), que son capaces de degradar ácidos nucleicos y con proteinasa K*** que degrada proteínas. Posteriormente se purificó el DNA del sobrenadante y se determinó su integridad en un gel de agarosa. En primer lugar, demostramos que las enzimas (DNasa I y la Micrococcal) tienen una actividad funcional óptima, ya que son capaces de degradar DNA humano purificado que se utilizó como control (Fig. 7). Sin embargo, importantemente observamos que ni la DNasa I ni la enzima Micrococcal, son capaces de degradar por sí solas los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante de la línea SW480, aún utilizando altas concentraciones de las enzimas (Figs. 8 y 9).

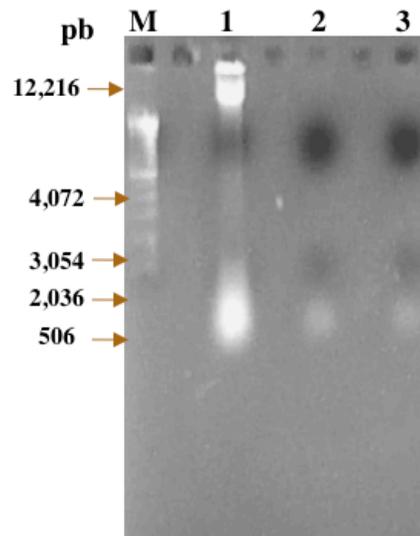


FIG 7. Gel de agarosa al 2.5% donde se demuestra la funcionalidad óptima de las enzimas DNasa I y Micrococcal, para degradar DNA. M: marcador de peso, 1: Medio de cultivo + DNA genómico purificado (1µg); 2: Medio de cultivo + DNA genómico purificado (1µg) + Dnasa I (1U), 3: Medio de cultivo + DNA genómico purificado (1µg) + Micrococcal (1.5 U).

RESULTADOS

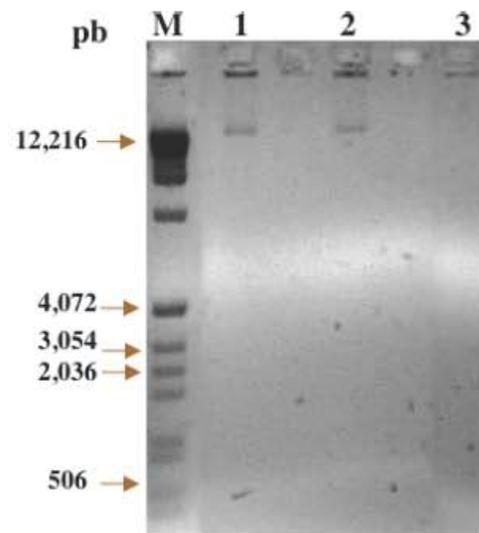


FIG 8. Gel de agarosa al 2.5% que muestra que el DNA de sobrenadante de la línea celular humana SW480 tratadas con DNasa I (1U DNasa I por μg de DNA), no se degrada. M: marcador de peso, 1: DNA de sobrenadante de SW480 ($1\mu\text{g}$); 2: DNA de sobrenadante de SW480 ($1\mu\text{g}$) + Dnasa I (1U), 3: Medio de cultivo + DNA genómico purificado ($1\mu\text{g}$) + DNasa I (1U).

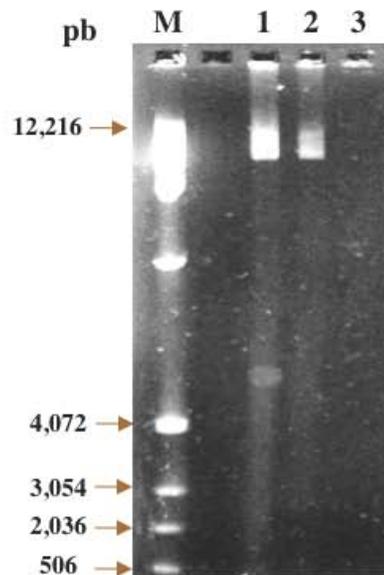


FIG 9. Gel de agarosa al 2.5% que muestra que el DNA de sobrenadante de la línea celular humana SW480 tratadas con Micrococcal (2U de micrococcal por mg de DNA), no se degrada. M: marcador de peso; 1: DNA de sobrenadante de SW480 ($500\mu\text{g}$). 2: DNA de sobrenadante de SW480 ($500\mu\text{g}$) + Micrococcal (1.5 U); 3: Medio de cultivo + DNA genómico purificado ($500\mu\text{g}$) + Micrococcal (1.5 U).

RESULTADOS

Estos resultados nos sugieren, que los ácidos nucleicos están “protegidos” probablemente con moléculas como proteínas o lípidos de tal forma que no permiten su corte y degradación. En otro experimento cuando se incubó el sobrenadante primero con proteinasa K y luego con DNasa I, es posible observar una importante degradación de proteínas de entre 66 kD (**Fig. 10A**), en los sobrenadantes que fueron digeridos con proteinasa K o proteinasa K + DNasa I (pozo 3 y 4, respectivamente) en comparación con el control (pozo 1). En la **Fig. 10B** se observa en un gel de agarosa, la degradación total de DNA circulante sólo en el sobrenadante que se digirió con proteinasa K + DNasa I (pozo 4), comparado con el sobrenadante + DNasa I (pozo 2) o con el sobrenadante + ProtK (pozo 3); lo que demuestra que el DNA circulante, al menos, está protegido por un complejo de proteínas que evita su degradación por DNasas.

* La desoxirribonucleasa I (DNasa I) es una endonucleasa que se une preferentemente a los enlaces fosfodiéster adyacentes a una base pirimídica del DNA. Actúa sobre el DNA de cadena simple, el DNA de cadena doble y la cromatina.

** La enzima micrococcal es una endo-exonucleasa relativamente no específica, que digiere los ácidos nucleicos de doble cadena, de cadena simple, circulares y lineales. Corta en sitios ricos en adenilato, deoxiadenilato o timidilato. El DNA y el RNA son degradados a 3'-fosfomononucleótidos y dinucleótidos.

*** La proteinasa K, es una serin-proteasa de amplio espectro cuyo sitio de escisión predominante es el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de los aminoácidos alifáticos y aromáticos bloqueados con grupos amino alfa. Es de uso general por su amplia especificidad; y su peso molecular es de 28,900 daltons.

RESULTADOS

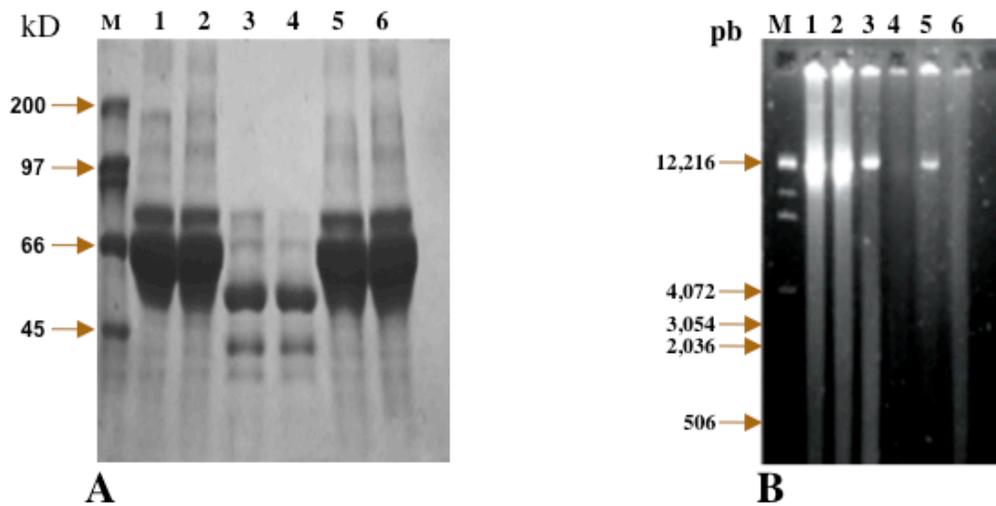


FIG 10. Ensayos de digestión enzimática del sobrenadante de la línea celular humana SW480. El sobrenadante procesado de SW480 se sometió a digestión con DNasa I y/o Proteinasa K para eliminar las proteínas (Gel A) y el DNA circulante (Gel B). **A:** Gel de poliacrilamida al 7.5%. **B:** Gel de agarosa al 1.5%. **M:** marcador de peso molecular; **1:** sobrenadante procesado de SW480 (SW); **2:** SW + DNasa I; **3:** SW + proteinasa K (ProtK); **4:** SW + DNasa I + ProtK; **5:** DMEM + 2% SFB + DNA de esperma de salmón; **6:** DMEM + 2% SFB + DNA de esperma de salmón + DNasa I.

Se demostró la presencia de partículas de DNA libre en circulación en el sobrenadante de la línea celular SW480, utilizando la técnica de Tinción Negativa para Microscopía Electrónica. En la **Fig. 11** observamos sólo dos tipos de partículas; un fragmento de DNA grande con una estructura similar a una cadena de nucleosomas y otros fragmentos de DNA con forma circular. Este último fue la estructura con más predominio en la muestra.

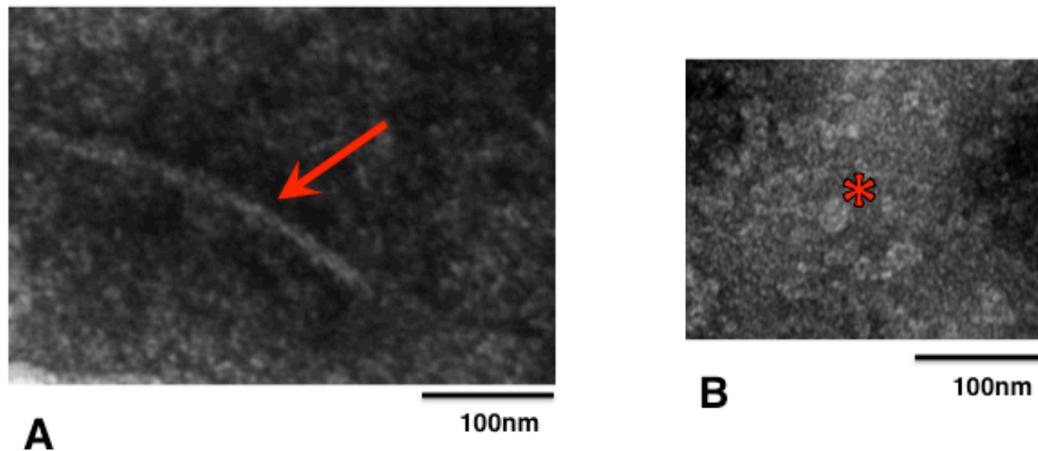


FIG 11. Micrografía Electrónica del sobrenadante de la línea celular humana SW480. Se utilizó la técnica de tinción negativa. Las micrografías muestran partículas de DNA. La flecha señala un fragmento grande de DNA (A), y el asterisco muestra un fragmento de DNA circular (B); este último corresponde a la forma principalmente detectada en la muestra. Aumento a 238.000x y la barra de escala, 100 nm.

2. *Demostración de la transferencia horizontal del DNA circulante presente en el sobrenadante de la línea celular humana SW480 y en el suero humano, a la línea celular murina NIH3T3.*

Antes de llevar a cabo los ensayos de transfección pasiva (y aún antes de la purificación de los ácidos nucleicos circulantes), se verificó en primer lugar que tanto los sobrenadantes de las líneas celulares SW480 y HeLa así como las muestras de suero de sujetos sanos y de pacientes con cáncer, no tuvieran células intactas o restos celulares; por lo que los sobrenadantes y sueros colectados, se procesaron para eliminar cualquier resto celular; primero, mediante una centrifugación a 400xg durante 20 min y luego por filtración, a través de un filtro de 0.45µm para eliminar células potencialmente contaminantes. Posteriormente, tanto en los sobrenadantes de las líneas celulares así como en las muestras de suero (ya procesados) que se utilizaron para la transfección pasiva de la línea celular murina NIH3T3, se comprobó que fueran positivos para genes específicos y característicos. En el caso de la línea celular SW480 así como el suero de pacientes con cáncer colorectal

RESULTADOS

se detectó positivamente la presencia de la mutación en el codón 12 del exón 1 del oncogén humano *K-ras*^{v12} (**Fig. 12-A**); mientras que para la línea celular HeLa, se detectó una señal positiva para el oncogén E7 de HPV18 (**Fig. 12-B**).

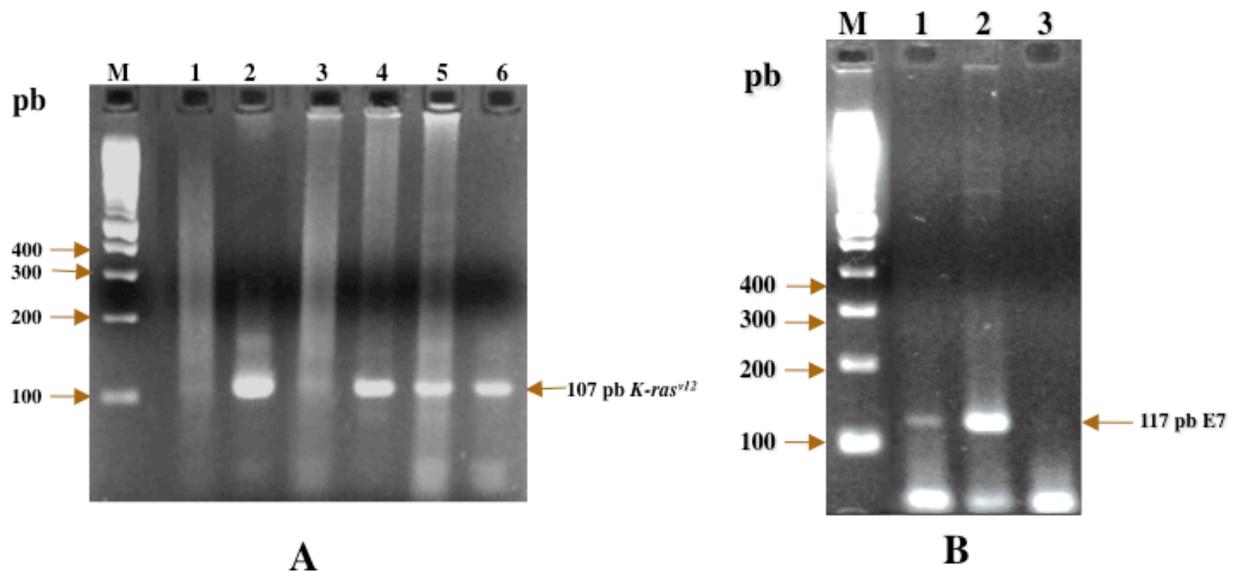


FIG 12. Detección por PCR de genes específicos en DNA circulante obtenido de suero humano o del sobrenadante de líneas celulares humanas. Gel A: M: marcador de peso molecular; 1: H₂O; 2: DNA genómico de la línea celular humana SW480; 3: DNA genómico de la línea celular murina NIH3T3; 4-5: DNA de suero de pacientes con cáncer de colon; 6: DNA del sobrenadante de la línea celular SW480. **Gel B:** M: marcador de peso molecular; 1: DNA de un paciente con cáncer cérvico uterino; 2: DNA genómico de la línea celular humana HeLa; 3: H₂O.

Una vez finalizados los ensayos de transfección pasiva, se realizó el análisis de las clonas celulares derivadas de la transfección de las células NIH3T3. En la **Tabla II**, se resumen los datos obtenidos de las transfecciones del DNA circulante a la línea celular receptora. En cinco clonas de las 9 obtenidas de las células NIH3T3 que se cultivaron con el suero procesado de pacientes con cáncer de colon y en 11 clonas de las 27 derivadas de las células NIH3T3 que se cultivaron con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480, fueron positivas para *K-ras*^{v12} humano mutado (**Fig. 13**). Mientras que 8 clonas de las 24 obtenidas de las células NIH3T3 que se cultivaron con el sobrenadante procesado de la línea celular HeLa, fueron positivos para E7 de HPV18 (**Fig. 14**).

RESULTADOS

TABLA II. Ensayos de Tranfección Pasiva *in vitro*

Sobrenadante ó suero procesado	Tiempo de Exposición	Colonias (en agar)	Focos (en plástico)	Clonas Celulares	Clonas Celulares/ Marcador +
HeLa	14 días	46 ± 9	95.5 ± 6.5	24	8 clonas/ E7+
SW480	14 días	160 ± 21	56.5 ± 2.5	27	11 clonas/ <i>K-ras</i> +
Cáncer de colon	7 días	23 ± 7	10.0 ± 3	9	5 clonas/ <i>K-ras</i> +
NIH-3T3	14 días	13.5 ± 2.5	5.5 ± 1.5	11	neg
3T3-Swiss	14 días	12.5 ± 0.5	3.5 ± 2.5	12	neg
Donador sano	7 días	3 ± 0.5	1.5 ± 0.5	4	neg

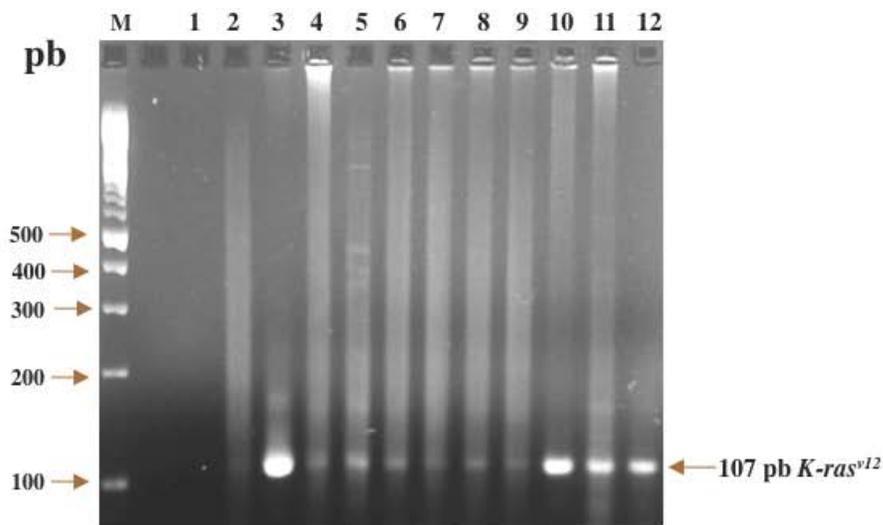


FIG 13. Detección por PCR de un fragmento que contiene la mutación en el codón 12 del exón 1 del oncogen humano *K-ras*^{v12}. La presencia de *K-ras* se investigó en células NIH3T3 que se cultivaron con suero procesado de un paciente con cáncer de colon (NIH3T3 + suero de paciente: SCOO5) y en células NIH3T3 que se cultivaron con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (NIH3T3 + SW480); utilizando como control negativo a la línea celular parental NIH3T3 y como controles positivos a la línea celular SW480 y un tumor de cáncer de colon. **M:** marcador del peso molecular; **1:** H₂O; **2:** NIH3T3; **3:** SW480; **4-9:** Clonas de NIH3T3 + sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (SWB0, SB1, SWB2, SWB9, SWB10 y SWB11); **10:** Tumor de cáncer de colon; **11:** Clonas de NIH3T3 + suero procesado del paciente (SCOO5); y **12:** Tumor de ratón inyectado con el cultivo de las células NIH3T3 que fueron expuestas a suero de un paciente con cáncer de colon (SCCO5).

RESULTADOS

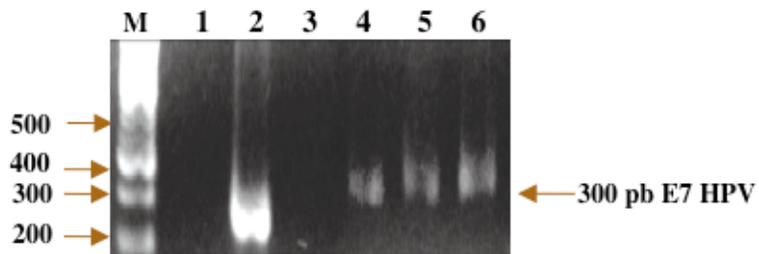


FIG 14. Detección por PCR del gen E7 de HPV 18. M: marcador del peso molecular; **1:** H₂O; **2:** Línea celular humana HeLa; **3:** Línea celular murina NIH3T3; **4-6:** Clonas de NIH3T3 + sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa.

Para demostrar que la presencia de secuencias humanas en las clonas celulares derivadas de la transfección pasiva de las células NIH3T3, no eran debido a la contaminación con células humanas, se amplificó la secuencia repetitiva humana *Alu* (YD6) (104) en las mismas clonas celulares de NIH3T3 obtenidas de la exposición a suero procesado de pacientes con cáncer de colon o a sobrenadante procesado de la línea celular SW480 y que fueron positivas a la secuencia mutada del oncogén *K-ras*^{v12}. Como se observa en la **Fig. 15**, la secuencia repetitiva humana *Alu* no está presente en la línea parental murina NIH3T3; lo que demuestra que la línea celular murina NIH3T3 utilizada para las transfecciones, no está contaminada con células de origen humano. Se utilizaron diversas técnicas experimentales para demostrar la transferencia horizontal del DNA humano circulante a las células receptoras murinas NIH3T3:

a) Se realizó un análisis de **Southern blot** para detectar la transferencia de fragmentos de DNA humano a células NIH3T3 transfectadas pasivamente con sobrenadante procesado de la línea celular SW480 o con suero procesado de pacientes con cáncer de colon. Se utilizó como sonda marcada, DNA genómico de SW480 y 10µg de DNA genómico de cada una de las líneas celulares así como de las clonas derivadas de la exposición de las células NIH3T3 al sobrenadante o al suero.

RESULTADOS

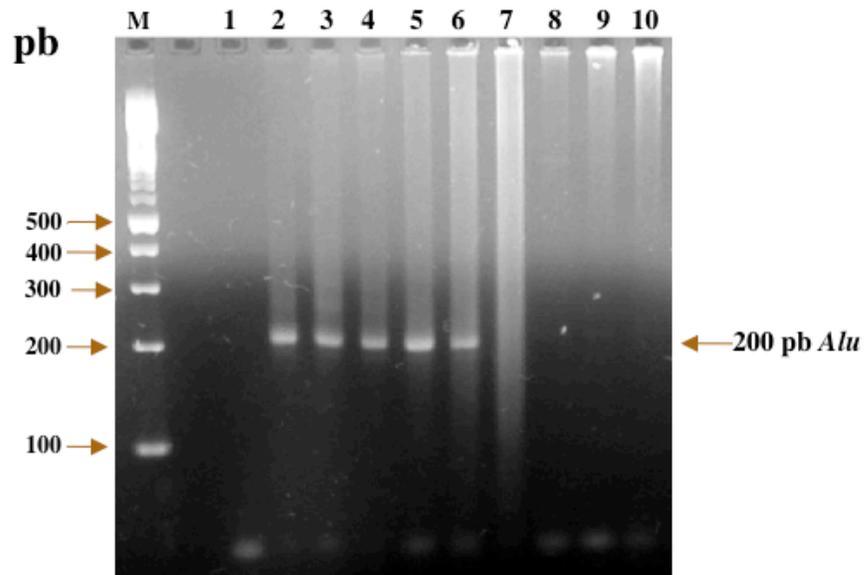


FIG 15. Detección por PCR de la secuencia repetitiva humana *Alu-YD6*. La presencia de la secuencia específica humana (*Alu-YD6*) se investigó en las células NIH3T3 cultivadas con suero procesado de pacientes con cáncer de colon, en las cultivadas con el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480, y en los tumores de ratón. **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** SW480; **3:** tumor de colon humano; **4:** NIH3T3 + suero procesado de paciente (SCCO5); **5:** NIH3T3 + sobrenadante procesado de SW480 (SB1); **6:** tumor de ratón inyectado con células NIH3T3 expuestas a suero procesado de un paciente con cáncer de colon (SCCO5); **7:** tumor de ratón inyectado con células NIH3T3 sin tratar; **8-10:** NIH3T3 parental.

Para la hibridación se empleó como control positivo SW480 y como control negativo NIH3T3. Se analizaron 8 de las clonas obtenidas de la transfección pasiva que fueron positivas para *K-ras*^{v12} (SWA, SB1, SWB3, SWB11, SWC2, SW12A, SCCO4 y SCCO5). Como se muestra en la **Fig. 16**, el control positivo mostró una señal muy fuerte; y se detectó una señal positiva en 2 de las 8 clonas analizadas (clona SB1 y SCCO5). Lo que indica que parte del DNA genómico de las clonas de células murinas (NIH3T3), hibridó con el DNA genómico de la línea celular humana SW480.

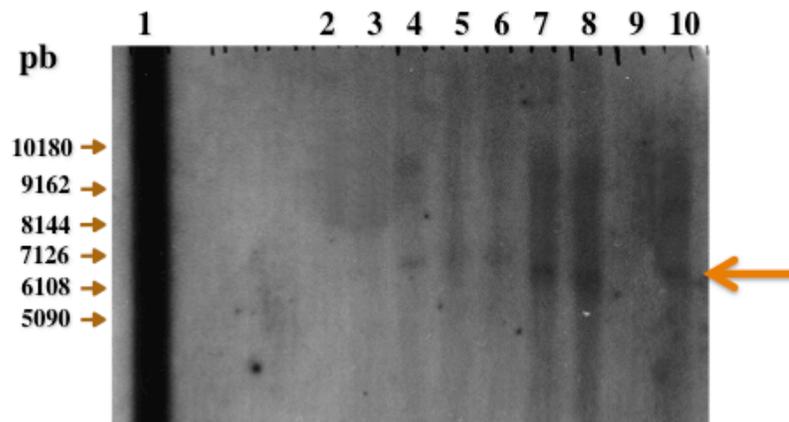


FIG 16. Detección por Southern blot de fragmentos de DNA de origen humano en células NIH3T3 cultivadas con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 o con suero procesado de pacientes con cáncer de colon. Empleando DNA genómico de SW480 como sonda, se analizó la presencia de fragmentos de DNA de origen humano en células NIH3T3 transfectadas con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 o con suero procesado de pacientes con cáncer de colon. **M:** marcador de peso molecular; **1:** SW480 (control positivo); **2:** NIH3T3 (control negativo); **3:** clona SWA; **4:** clona SWB11; **5:** clona SWB3; **6:** clona SCCO4; **7:** clona SB1; **8:** clona SCCO5; **9:** clona SW12A; **10:** clona SWC2. (La flecha indica una señal positiva fuerte en algunas de las clonas celulares analizadas).

b) Se realizó por **PCR**, el análisis de otros genes importantes en el proceso de carcinogénesis de colon y que se encuentran en la línea celular humana SW480. Para ello, se trabajó con sólo una de las clonas positivas para $K-ras^{v12}$ que se obtuvo de la transfección pasiva de la línea NIH3T3 con el sobrenadante de la línea SW480: la clona SB1(así como en los subsecuentes ensayos). Y los genes que se analizaron fueron *MAPRE*, *GRB2*, *CADH8* y *RAB30*.

Como se observa en la **Fig. 17**, se detectó una señal positiva en la clona SB1 y en todos los genes analizados; lo que indica que las células receptoras (NIH3T3) cuando se expusieron al sobrenadante de la línea celular SW480, adquirió éstos genes; es decir, se transfirió DNA humano a las células murinas NIH3T3.

RESULTADOS

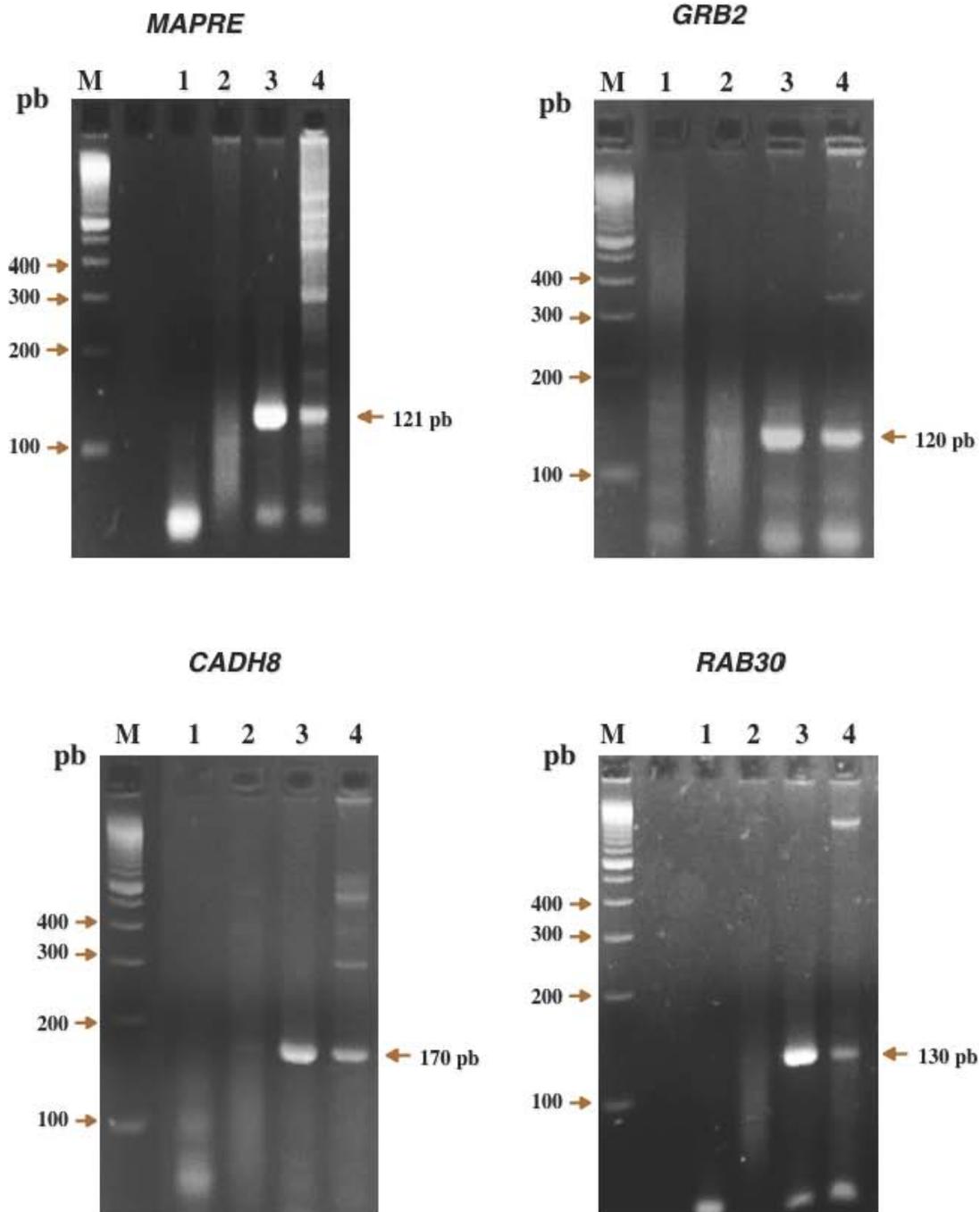


FIG 17. Detección por PCR de otros genes humanos. Usando primers específicos para secuencias humanas, se analizó la presencia de los genes *MAPRE*, *GRB2*, *CADH8* y *RAB30* en células NIH3T3 que se transfectaron pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (clona celular SB1), utilizando como control negativo la línea celular parental murina NIH3T3 y como control positivo la línea celular parental humana SW480. **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** línea celular NIH3T3; **3:** línea celular SW480; **4:** NIH3T3 + sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (clona SB1).

RESULTADOS

Además, para corroborar la transferencia de DNA, se analizó la presencia de un gen exógeno que se transfirió de forma activa (con Lipofectamina) a la línea celular humana SW480, y cuyo sobrenadante se utilizó para la transfección pasiva a la línea receptora NIH3T3: el gen GFP (**Fig. 18**).

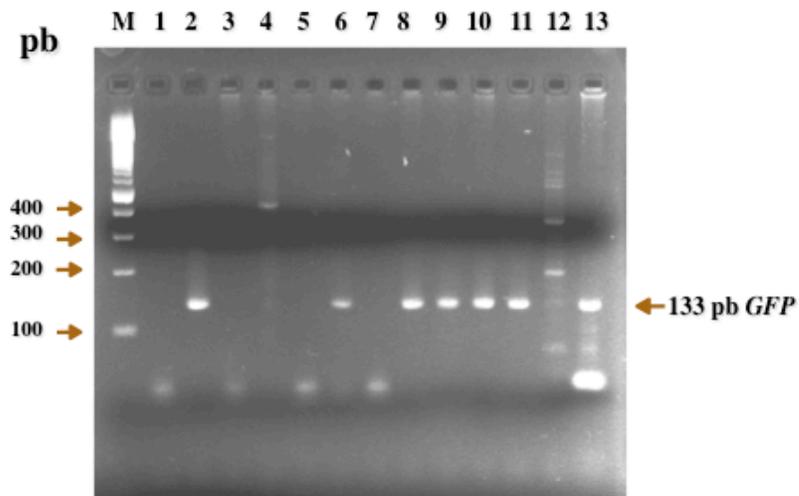


FIG 18. Detección por PCR de un fragmento del gen *GFP* en clonas celulares derivadas de NIH3T3 expuesta a sobrenadante procesado de SW480 (transfectada activamente con el gen *GFP*). La presencia de un fragmento del gen de *GFP* se determinó en las células murinas NIH3T3 que se cultivaron con el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480 que previamente se transfirió activamente con el gen *GFP*. Se utilizó como controles negativos a la línea celular parental NIH3T3 y a la línea celular parental SW480. Como controles positivos a la línea celular SW480 transfectada con el gen *GFP* y al plásmido pEGFP1. **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** plásmido pEGFP1; **3:** NIH3T3; **4:** SW480; **5-12:** clonas derivadas de NIH3T3 + sobrenadante procesado de la línea SW480 transfectadas con el gen de *GFP*; **13:** línea celular SW480 transfectadas con el gen *GFP*.

c) Se realizó por **RT-PCR** el análisis de los genes que se detectaron por PCR, para determinar si además de que se transfirieron horizontalmente, son capaces de expresarse. El análisis de RT-PCR se realizó en la misma clona SB1. En la **Fig. 19** se muestra la amplificación de un fragmento de 357 pb que corresponde al cDNA de *K-ras*^{v12}.

RESULTADOS

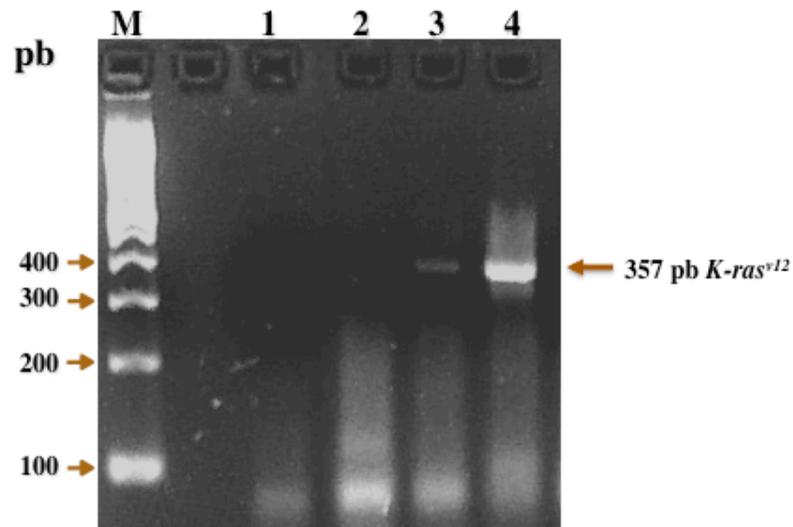


FIG 19. Detección de *K-ras^{v12}* por RT-PCR. Se obtuvo cDNA de las células NIH3T3 que se transfectaron pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (clona SB1), para investigar la presencia de *K-ras^{v12}*; utilizando como control negativo a la línea celular murina NIH3T3 parental y como control positivo la línea celular humana SW480 parental. **M:** marcador de peso; **1:** H₂O; **2:** NIH3T3; **3:** clona SB1; **4:** SW480.

Mientras que en la **Fig. 20**, se observa la expresión de los otros genes humanos que son importantes en el proceso carcinogénico en colon y que se detectaron por PCR: *MAPRE*, *CADH8*, *GRB2* y *RAB30*; lo que demuestra que el DNA que se transfiere a las células murinas es también capaz de ser expresado a nivel de mRNA .

RESULTADOS

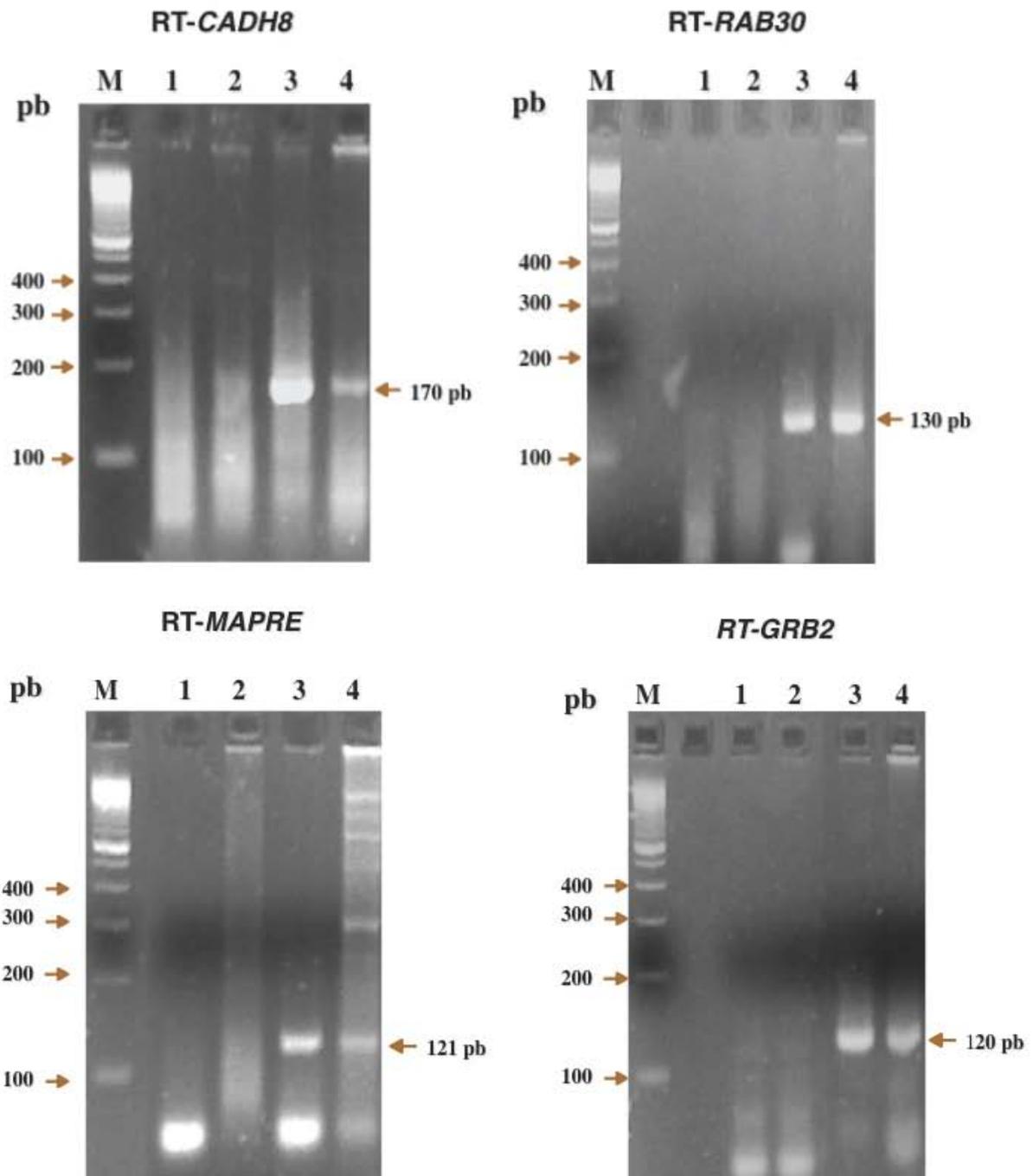


FIG 20. Detección por RT-PCR de otros genes humanos. Se utilizaron primers específicos para secuencias humanas y se analizó la presencia a partir de cDNA de los genes *GRB2*, *CADH8* y *RAB30* en las células NIH3T3 transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (clona SB1); utilizando como control negativo la línea celular parental murina NIH3T3 y como control positivo la línea celular parental humana SW480. **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** NIH3T3; **3:** SW480; **4:** NIH3T3 + sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (clona SB1).

RESULTADOS

d) Con **FISH** se realizaron experimentos para detectar secuencias repetitivas de origen humano (**105**); para lo cual se utilizó como sonda, DNA humano Cot marcado con DIGO y se reveló con Rhodamina. Se contaron 500 núcleos interfásicos por campo y se analizaron 3 clonas celulares derivadas de NIH3T3 transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480.

Como se observa en la **Fig. 21** una de las 3 clonas analizadas, muestra señal positiva para las secuencias repetitivas humanas (SB1); encontrando que de los 500 núcleos analizados, hubo 3 positivos. Lo cual nos demuestra nuevamente, que si hubo una transferencia de DNA humano, a la línea celular murina NIH3T3.

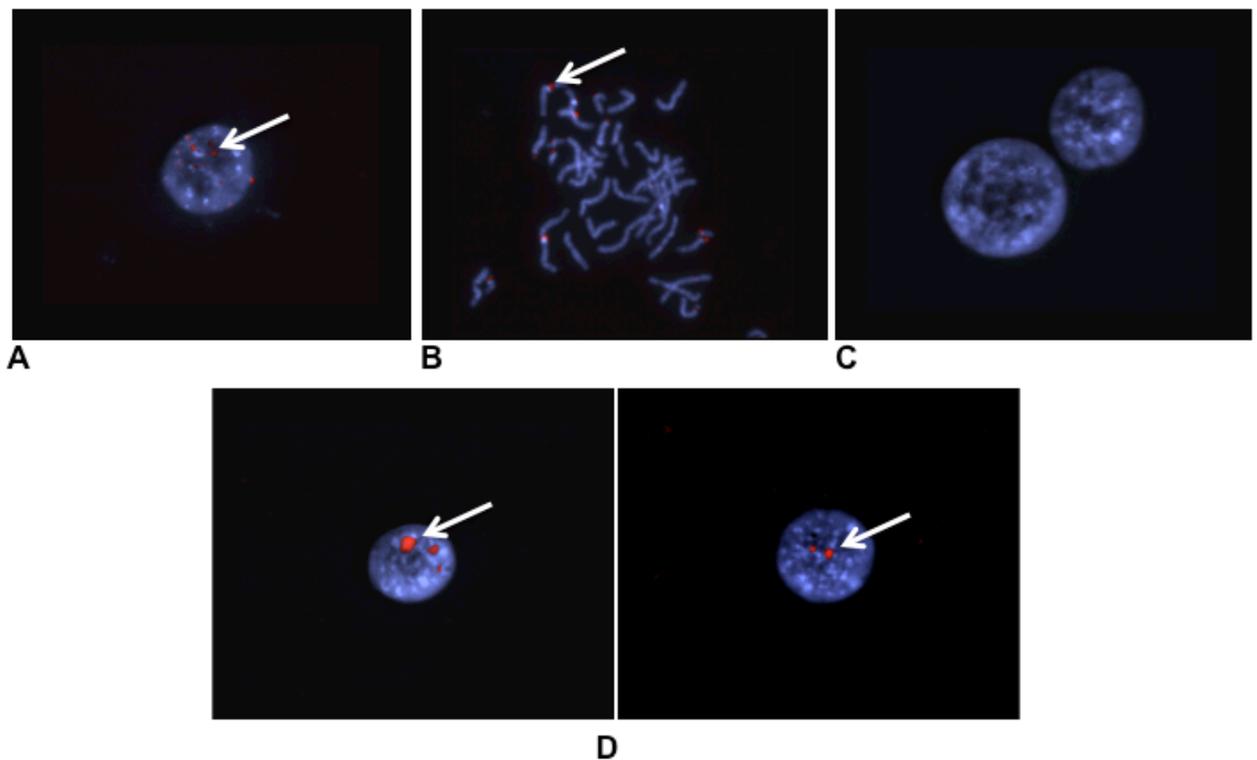


FIG 21. Análisis por FISH de secuencias repetitivas humanas. DNA Cot humano se utilizó como sonda, se marcó con DIGO y se reveló con rodamina; el DNA marcado se hibridó en células NIH3T3 que se expusieron al sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (clona SB1). **A:** interfase humana; **B:** metafase humano; **C:** interfase murina, negativa; **D:** interfase murina, positivo (SB1). Las flechas indican la señal positiva.

RESULTADOS

e) **Secuenciación.** Como se demostró anteriormente, por PCR se detectó una señal positiva para varios productos que corresponden a distintos genes humanos. Por ejemplo, para un producto de 107 pb, que corresponde a la mutación del codón 12 del gen *K-ras^{val12}*; para un producto de 121 pb que corresponde al gen *MAPRE*; para un producto de 120 pb que corresponde al gen *GRB2*; para un producto de 170 pb que corresponde al gen *CADH8* y para un producto de 130 pb que corresponde al gen *RAB30*. Estas secuencias son humanas y específicas de la línea celular SW480 así como del tumor primario de un paciente con cáncer de colon; sin embargo, también se observó una señal positiva para todos los genes humanos antes mencionados, en algunas clonas derivadas de la línea celular murina NIH3T3 transfectada pasivamente con el sobrenadante procesado de la línea celular de SW480 o del suero procesado de pacientes con cáncer de colon. Es importante mencionar que la homología a nivel de genoma entre el murino y el humano es del **99%**; por lo que para confirmar que las secuencias amplificadas por PCR de las clonas de NIH3T3 transfectadas pasivamente corresponden a las secuencias humanas, se realizó una secuenciación directa de los productos de PCR que corresponden a los fragmentos de genes humanos detectados en una de las clonas derivadas de NIH3T3 transfectada pasivamente con sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (SB1).

La Tabla III muestra los genes que se analizaron por secuenciación, así como el número de nucleótidos en que se determinó la presencia de bases tanto de ratón como de humano. Es de destacar que tanto en el gen *K-ras^{val12}* como en *RAB30*, todas las posiciones que se analizaron hubo tanto secuencias humanas como murinas; mientras que en los genes *MAPRE*, *CADH8* y *GRB2* la mitad de las posiciones analizadas hubo nucleótidos de ratón y de humano.

TABLA III. Genes Analizados por Secuenciación

GEN	Posiciones de nucleótidos analizados	Posiciones de nucleótidos Humano/Ratón
K-RAS	2 posiciones	2 posiciones
RAB-30	4 posiciones	4 posiciones
CADH8	16 posiciones	7 posiciones
MAPRE	6 posiciones	5 posiciones
GRB2	9 posiciones	5 posiciones

En la **Fig. 22** se muestra el Electroferograma del producto de PCR de la línea celular parental humana SW480 que corresponde a un fragmento del gene mutado *K-ras^{val12}*; y las flechas señalan los nucleótidos que varían con respecto a la secuencia del gene *K-ras* pero murino; lo que demuestra la homología tan cercana del genoma humano con el murino.

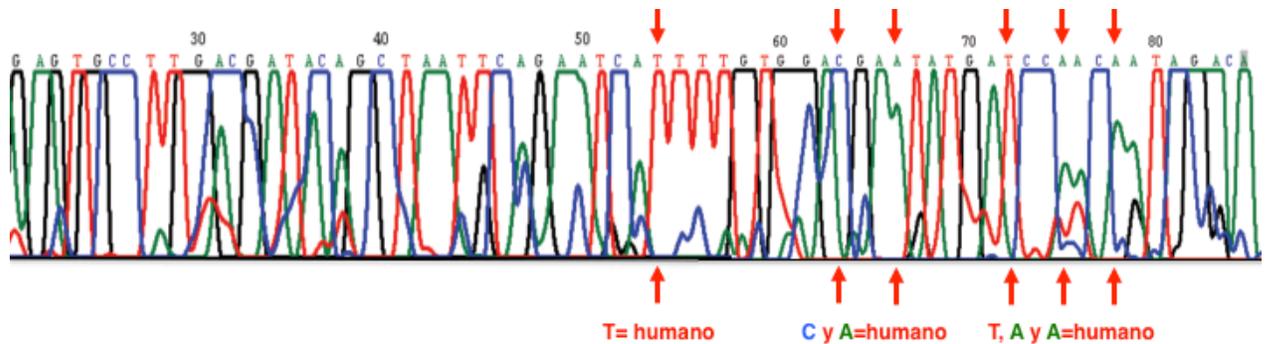


FIG 22. Electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gene mutado *K-ras^{val12}* proveniente de SW480. La secuenciación se realizó a partir de un producto de PCR proveniente de la línea celular parental humana SW480. Las flechas indican los nucleótidos que difieren con respecto a la secuencia del mismo fragmento del gene *K-ras^{val12}* del genoma de ratón, cuando son comparados.

RESULTADOS

Cuando se analizó la secuencia del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gen mutado *K-ras^{val12}*, proveniente de la clona celular SB1 derivada de la transfección pasiva de NIH3T3 con el sobrenadante procesado de la línea celular parental humana SW480; se observó que en la misma posición de los nucleótidos correspondientes a los de ratón, también se detectaron los nucleótidos de humano **Fig. 23** (indicados con las flechas); es decir, hay una co-existencia de nucleótidos de murino y de humano. Lo que nuevamente sugiere que hubo una transferencia de DNA humano, a la línea celular murina NIH3T3.

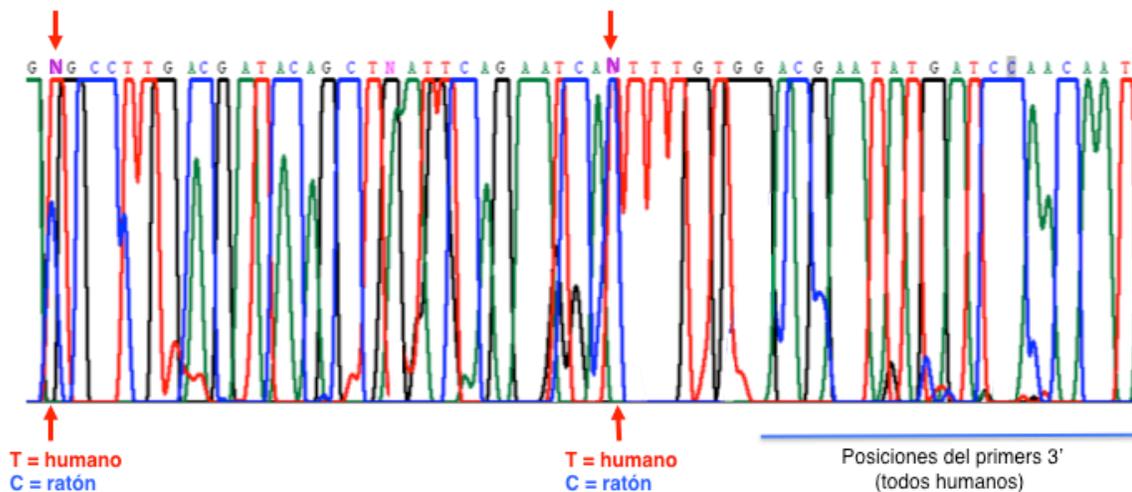


FIG 23. Electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gene mutado *K-ras^{val12}* proveniente de la clona SB1. La secuenciación se realizó a partir de un producto de PCR de una clona celular de NIH3T3 derivada de la transfección pasiva con el sobrenadante procesado de la línea celular parental humana SW480: la SB1. Las flechas indican los nucleótidos del genoma de ratón que cambiaron de ratón a humano.

Además, también se realizó la secuenciación directa de los productos de PCR proveniente de la clona celular SB1, de los otros genes humanos estudiados: *MAPRE*, *GRB2*, *CADH8* y *RAB30*. En la **Fig. 24** se muestra la secuencia obtenida para el gen *RAB30* en representación de los otros genes humanos analizados en donde se observa la co-existencia de los nucleótidos murinos y humanos (indicados con las flechas).

RESULTADOS

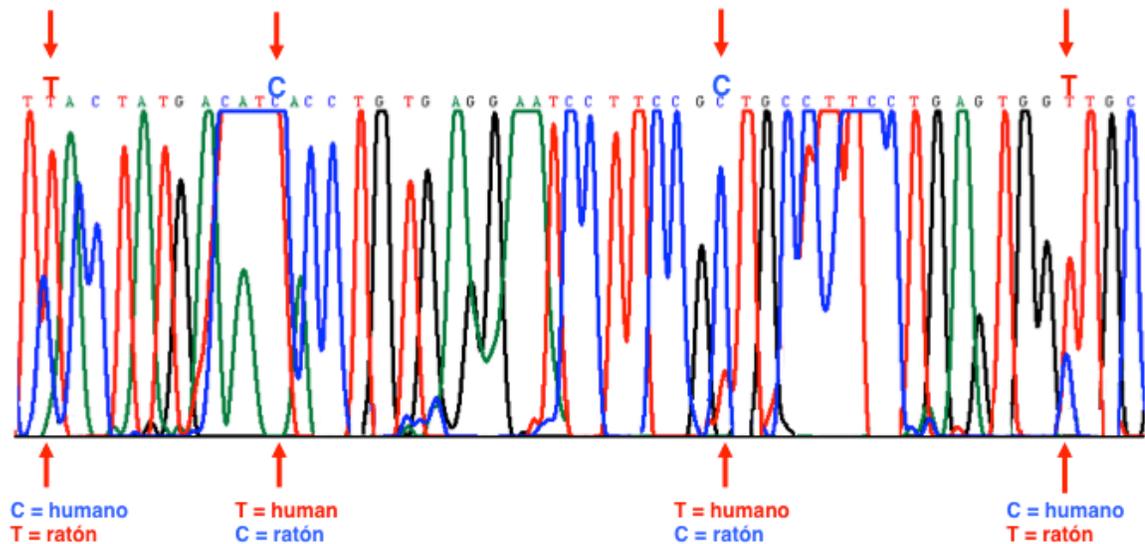


FIG 24. Electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gene *RAB30* proveniente de la clona SB1. La secuenciación se realizó a partir de un producto de PCR de una clona celular de NIH3T3 derivada de la transfección pasiva con el sobrenadante procesado de la línea celular parental humana SW480: la SB1. Las flechas indican los nucleótidos del genoma de ratón que cambiaron de ratón a humano.

Estos resultados nos vuelven a sugerir que si hubo transferencia de DNA humano a las células murinas NIH3T3 que fueron expuestas al sobrenadante procesado de SW480.

f) Hibridación SNP Array y Análisis de Número de Copias de DNA. El DNA genómico de las células SW480 parentales (DNA intracelular), el DNA del sobrenadante de las células parentales SW480 (DNA extracelular) y el DNA genómico de las células NIH3T3 transfectadas pasivamente con el sobrenadante de las células SW480 (clona SB1), se hibridaron en un Arreglo de Affimetrix para el análisis del número de copias de DNA. Todas las muestras se compararon con una copia de DNA humana normal que se utilizó como referencia. Sólo se obtuvo una hibridación de alta calidad con el DNA genómico de las células SW480, así como con el DNA obtenido del sobrenadante de las células SW480; y a partir de éstas hibridaciones se obtuvieron los siguientes resultados.

RESULTADOS

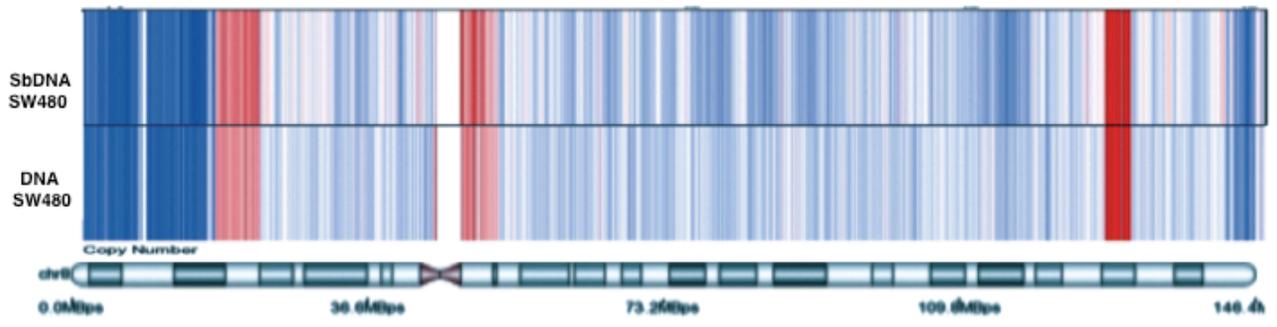


FIG 25. Análisis del número de copias del DNA extracelular e intracelular de las células SW480. El Heat map representa el número de copias de DNA a lo largo del cromosoma 8; en donde el color azul representa las regiones con deleciones y el color rojo representa las regiones con amplificaciones. El Heat map muestra un patrón del DNA casi idéntico entre el número de copias del DNA extracelular (DNA de sobrenadante de SW480 -**SbDNA**-) y el DNA intracelular (DNA genómico de SW480 -**DNASW480**-), en comparación con una referencia normal común.

Se observó que existe un patrón casi idéntico del número de copias de DNA entre el perfil de copias del DNA "intracelular" y el del DNA "extracelular" de las células SW480 como se observa en las **Figs, 25 y 26**; donde se muestra el perfil del cromosoma 8 y el de todos los cromosomas respectivamente. El DNA genómico (intracelular) de la clona SB1, se hibridó como una forma potencial de adquirir genes del DNA humano transferidos al genoma celular murino de NHI3T3; sin embargo, la calidad de la hibridación utilizando este DNA (DNA genómico de SB1) fue deficiente y no se obtuvo ninguna señal clara que pudiera sugerir que las células receptoras (NIH3T3), poseen una captación preferencial de regiones genómicas específicas presentes en el DNA del sobrenadante de SW480 (GEO número de acceso GSE35052).

RESULTADOS

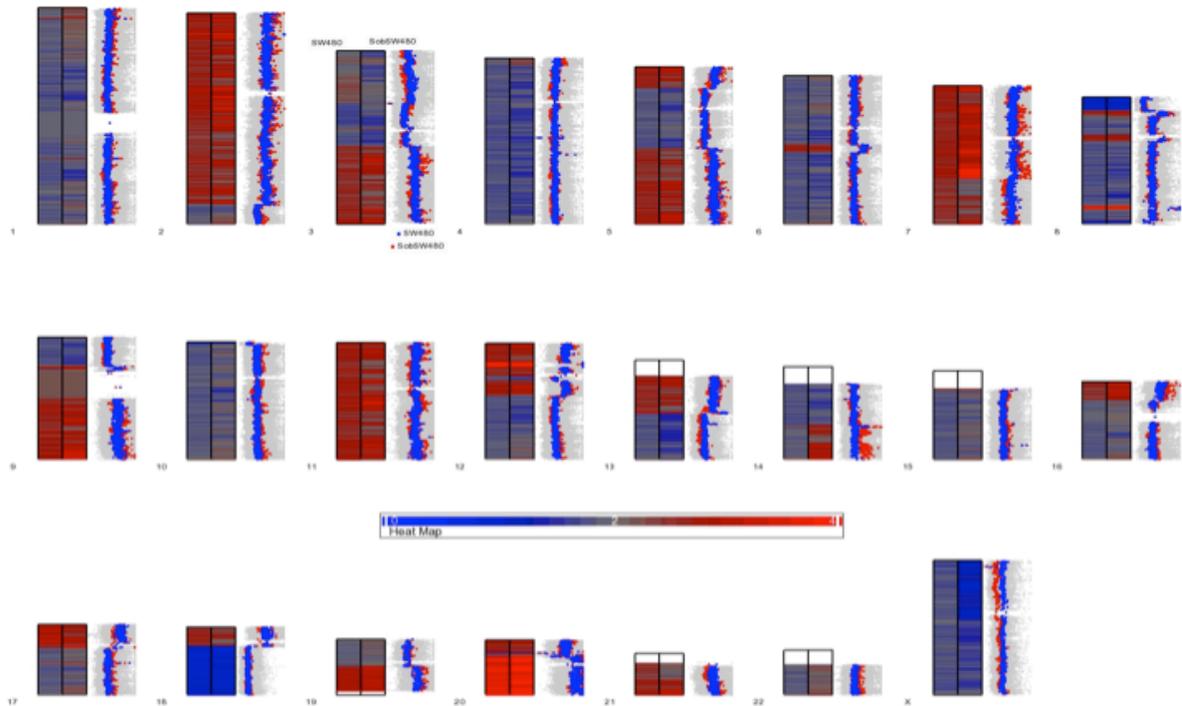


FIG 26. El Heat map donde se representa el número de copias de DNA a lo largo de todos los cromosomas. El color azul representa las regiones con deleciones y el color rojo representa las regiones con amplificaciones. Se observa un patrón del DNA casi idéntico entre el número de copias del DNA extracelular (DNA de sobrenadante de SW480 -SobDNA-) y el DNA intracelular (DNA genómico de SW480 -SW480-), en comparación con una referencia normal común.

3. *Demostración de la transformación de la línea celular murina NIH3T3 después de la transfección pasiva con el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480 o con el suero procesado de paciente con cáncer de colon.*

Se examinó el potencial transformante del DNA circulante presente en el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480 o en el suero de pacientes con cáncer de colon. Después del periodo de exposición de las células murinas NIH3T3 al sobrenadante o al suero procesados, los cultivos se sometieron al análisis de las características de transformación maligna: Formación de Focos; Independencia al Anclaje y Potencial Tumorigénico.

RESULTADOS

I. Formación de Focos. Al finalizar la exposición de las células murinas NIH3T3 a los sobrenadantes procesados de las líneas celulares humanas HeLa o SW480, en los cultivos resultantes se observaron alteraciones morfológicas (**Figs. 27-D y 27-E** respectivamente) y la formación de un gran número de focos (ver **Tabla II**); así, en el caso de los cultivos que se expusieron al sobrenadante de HeLa se contabilizaron un promedio de 95.5 ± 6.5 focos. Mientras que los cultivos expuestos al sobrenadante de SW480 se contaron 56.5 ± 2.5 focos en promedio. En el caso de las células murinas transfectadas pasivamente con el suero procesado humano de pacientes con cáncer de colon, a pesar de que el tiempo de exposición fue menor (7días), hubo alteraciones morfológicas (**Fig. 27-F**) muy evidentes y se formaron en promedio 10.0 ± 3.0 focos (ver **Tabla II**).

Los cultivos que fueron expuestos al sobrenadante procesado de NIH3T3, Swiss o al suero procesado de un donador sano y que se utilizaron como controles negativos, no hubo alteraciones morfológicas evidentes; sólo se observaron cultivos con un 100% de confluencia (**Figs. 27-A, 27-B y 27-C**) al término de la transfección pasiva. Cuando se contabilizaron los focos, se observó que en los cultivos expuestos al sobrenadante de NIH3T3 hubo 5.5 ± 1.5 focos; en los expuestos al sobrenadante de Swiss hubo 3.5 ± 2.5 focos y en los expuestos al suero del donante sano 1.5 ± 0.5 focos (ver **Tabla II**). Es decir, se formaron un menor número de focos comparados con los cultivos expuestos a los sobrenadantes procesados de las líneas celulares malignas o al suero procesado de pacientes con cáncer.

RESULTADOS

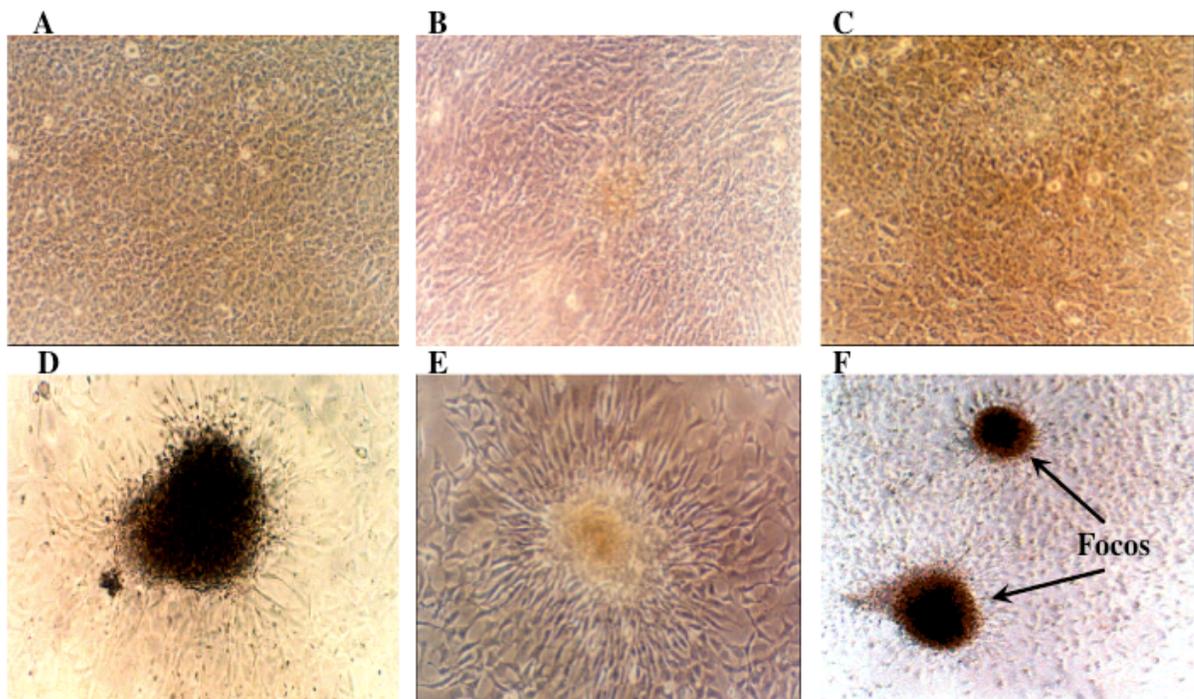


FIG 27. Transformación maligna de la línea celular murina NIH3T3 después de la transfección pasiva con los sobrenadantes procesados de las líneas celulares humanas SW480, HeLa o con el suero procesado de paciente con cáncer de colon. Controles negativos (10X). **A:** NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de NIH3T3 parental; **B:** NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de Swiss; **C:** NIH3T3 expuesta al suero procesado de un individuo sano; Grupos problema **D:** NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de la línea celular HeLa (4X); **E:** NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (4X); **F:** NIH3T3 expuesta al suero procesado de un paciente con cáncer de colon (10X).

II. El Crecimiento Independiente del Anclaje. Es otra característica utilizada como un indicador de transformación maligna y los ensayos de crecimiento en agar blando son los utilizados para demostrar ésta propiedad. Para éstos ensayos se trabajó con algunos de los focos que se obtuvieron en cada uno de los cultivos de NIH3T3 que se expusieron a los sobrenadantes procesados de las líneas celulares (SW480 y HeLa) o al suero procesado de pacientes con cáncer de colon o al suero de un sujeto sano; por lo que se extrajeron y procesaron como se describió en material y métodos. Después de 14 días de crecimiento en agar blando, se contabilizaron las colonias que se formaron; así, de los focos que se extrajeron de los cultivos de NIH3T3 expuestos al sobrenadante de HeLa, se formaron 46 ± 9 ; mientras que fueron 160 ± 21 colonias formadas de los focos derivados de los cultivos expuestos al sobrenadante de la línea celular SW480. Y se contabilizaron 23 ± 7 colonias formadas, derivadas de algunos de los focos que se obtuvieron de los cultivos de NIH3T3

RESULTADOS

expuestos al suero de pacientes con cáncer de colon (ver **Tabla II**). En el caso de los cultivos de NIH3T3 utilizados como controles negativos (expuestos al sobrenadante procesado de NIH3T3, Swiss o al suero procesado de un donador sano), se contabilizaron entre 3 a 13.5 ± 1.2 colonias formadas en promedio (ver **Tabla II**); es decir, un menor número de colonias formadas comparadas con los cultivos expuestos a los sobrenadantes procesados de las líneas celulares malignas o al suero procesado de pacientes con cáncer.

Después de cultivar y propagar cada una de las colonias obtenidas de los ensayos de crecimiento en agar suave, se analizó mediante PCR cada cultivo (clona) para demostrar la presencia de secuencias humanas de *K-ras^{val12}* (para SW480) o E7 de HPV18 (para HeLa). Como se observa en la **Tabla II**, de 24 clonas celulares obtenidas de los cultivos de NIH3T3 expuestos al sobrenadante procesado de la línea celular HeLa, sólo 8 de ellas fueron positivas para E7 de HPV18. En tanto que para los cultivos de NIH3T3 expuestos al sobrenadante procesado de la línea celular SW480, 11 clonas fueron positivas para *K-ras^{val12}* de 27 clonas celulares obtenidas. Pero el caso de los cultivos de NIH3T3 transfectados pasivamente con el suero procesado de pacientes con cáncer de colon, fue muy significativo porque a pesar de que el tiempo de exposición de las células NIH3T3 al suero fue de sólo 7 días, se obtuvieron 5 clonas celulares positivas para *K-ras^{val12}* de 9 clonas obtenidas (ver **Tabla II**). Y aunque se obtuvieron clonas celulares de los cultivos de NIH3T3 utilizados como controles negativos (expuestos al sobrenadante procesado de NIH3T3, Swiss o al suero procesado de un donador sano), todas fueron negativas ya sea para *K-ras^{val12}* o para E7 de HPV18 (ver **Tabla II**).

III. El Potencial Tumorigénico. De las 3 características indicativas de transformación maligna el potencial tumorigénico es la más determinante, ya que demuestra sin lugar a duda, que hay una transformación maligna. En la **Tabla IV** se describen los distintos grupos de animales con los que se trabajó y la línea o clona celular que se les inoculó. Se incluyeron 3 grupos controles: el que se inoculó con la línea celular parental humana SW480 (control +); el que se inoculó con la línea celular parental murina NIH3T3 y el que se inoculó con una de las clonas de NIH3T3 expuesta al suero procesado de un donador humano sano (**SN1**), que se consideraron como controles negativos. Y los grupos de

RESULTADOS

estudio, que fueron los que se inocularon con una clona celular de NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (**SB1**) y los que se inocularon con una clona celular de NIH3T3 expuesta al suero procesado de paciente con cáncer de colon (**SCCO5**).

TABLA IV. Ensayos de Tumorigenicidad. La tabla muestra los grupos de animales tratados y las diferentes células inoculadas.

Grupo (# de animales)	Línea ó Clona Celular	Origen Celular	Secuencia Mutada
1. (15)	NIH3T3 (control -)	Fibroblastos murinos	<i>K-ras</i> -
2. (12)	SW480 (control +)	Adenocarcinoma colorectal	<i>K-ras</i> +
3. (13)	SB1	NIH3T3 + sobrenadante procesado de SW480	<i>K-ras</i> +
4. (6)	SN1	NIH3T3 + suero procesado de sujeto sano	<i>K-ras</i> -
5. (6)	SCCO5	NIH3T3 + suero procesado de paciente con ca. de colon	<i>K-ras</i> +

Después de 30 días de la inoculación celular, se observó un crecimiento tumoral en los 12 animales inyectados con la línea celular SW480 (ver **Fig. 28**); mientras que en los animales inoculados ya sea con la clona SB1 o con la clona SCOO5, se observó un crecimiento tumoral a los 21 días de inyectados en el 100% de los ratones. Además, en éstos dos últimos grupos de animales el desarrollo tumoral tuvo un comportamiento muy agresivo como se observa en la **Fig. 29**; ya que el crecimiento fue muy rápido y el tamaño de los tumores fue enorme (un diámetro entre 1.5 a 3cm³) comparado con el grupo control positivo (un diámetro entre 1.0 a 1.3cm³ con SW480) (**Fig. 29**); por lo que los animales se sacrificaron a los 42 días después de la inoculación celular (**Fig. 28**).

RESULTADOS

En los grupos controles negativos NIH3T3 y SN1, sólo 1 de 15 y 1 de 6 animales respectivamente desarrollaron tumor pero después de los 80 días de inoculados (**Fig. 28**) y el tumor fue pequeño (un diámetro entre 0.05 a 0.1cm³) comparado con el desarrollado en los grupos de estudio (SB1 y SCCO5) (**Fig. 29**).

Estos resultados sugieren que las clonas celulares derivadas de las células NIH3T3 expuestas a sobrenadante de SW480 o a suero de paciente con cáncer de colon, son tumorigénicas; por lo que son células que han sido transformadas.

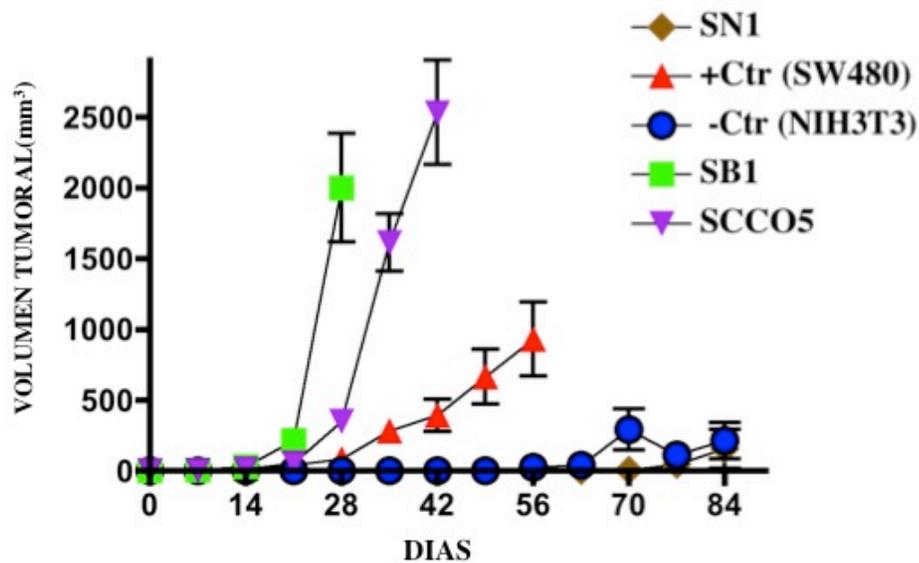


FIG 28. Desarrollo tumoral en ratones atímicos. En ésta gráfica se demuestra el potencial tumorigénico de una clona celular derivada de la línea celular NIH3T3 expuesta a suero procesado de paciente con cáncer de colon (SCCO5); y de otra clona derivada de NIH3T3 expuesta a sobrenadante procesado de SW480 (SB1). Como controles negativos se utilizó la línea celular parental NIH3T3 y una clona derivada de NIH3T3 expuesta a suero procesado de un donador sano (SN1). Y como control positivo se usó la línea celular parental SW480.

RESULTADOS

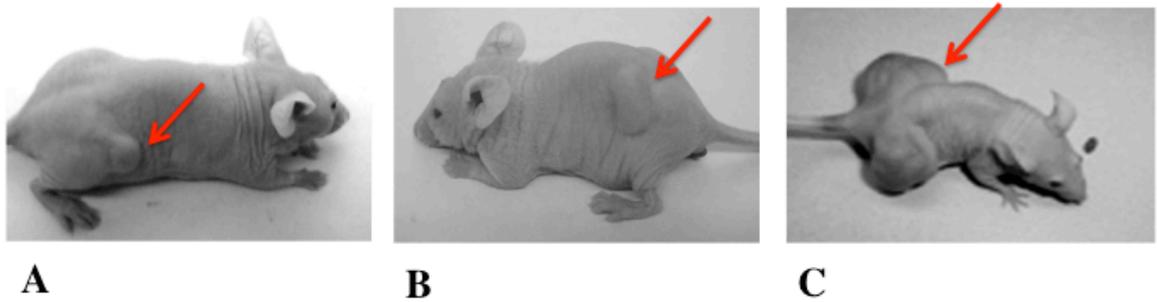


FIG 29. Potencial tumorigénico de las células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 ó a suero procesado de paciente con cáncer de colon.

A: Grupo control negativo: inoculación de células NIH3T3 parentales. Se muestra el desarrollo tumoral que hubo en sólo 1 de 15 animales inyectados. **B:** Grupo control positivo: inoculación de células SW480 parentales. Se muestra el desarrollo tumoral que hubo en 12 de 12 animales inyectados. **C:** Grupos de estudios: inoculación de la clona SB1 (NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de la línea celular SW480) ó la clona SCCO5 (NIH3T3 expuesta al suero procesado de paciente con cáncer de colon). Se muestra el desarrollo tumoral que hubo en el 100% de los animales inyectados con una clona u otra. Las flechas señalan el tumor.

4. Demostración de la habilidad transformante del DNA circulante.

Todos los resultados anteriormente descritos, demuestran claramente que el DNA circulante humano se transfiere a las células murinas y además es capaz de transformarlas; lo cual sugiere que las secuencias humanas transferidas fueron las responsables de la transformación.

Por otro lado, se ha sugerido y en algunos casos demostrado (70-73), que los ácidos nucleicos circulantes no están desnudos; sino que se asocian a proteínas, o están incluidos en cuerpos apoptóticos, o se asocian a histonas en forma de nucleosomas, o interactúan con otras macromoléculas como factores de crecimiento (que también podrían participar directamente en el proceso de transformación). Por lo tanto, con el objetivo de demostrar que el DNA circulante por sí mismo es capaz de inducir transformación celular y tiene potencial tumorigénico, se diseñaron 2 experimentos:

RESULTADOS

a) En el primer ensayo se realizó una transfección pasiva con la línea celular murina NIH3T3 como la descrita anteriormente, pero el sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480 que se utilizó, se trató previamente con diferentes enzimas (proteasas y dnasas); tanto para eliminar el complejo de proteínas o histonas que se asocian al DNA como para eliminar al mismo DNA. Después del periodo de exposición de las células murinas NIH3T3 al sobrenadante procesado y tratado con enzimas de SW480, el cultivo resultante se sometió al ensayo de Potencial Tumorigénico. En la **Tabla V** se describen los distintos grupos de animales inoculados con las células NIH3T3 expuestas a el sobrenadante procesado y tratado con distintas enzimas.

TABLA V. Ensayos de Tumorigenicidad. La tabla muestra los grupos de animales tratados y las diferentes células inoculadas.

Grupo (# de animales)	Línea ó Clona Celular	Origen Celular	Secuencia Mutada
1. (6)	NIH3T3 (control -)	Fibroblastos murinos	<i>K-ras</i> -
2. (6)	SW480 (control +)	Adenocarcinoma colorectal	<i>K-ras</i> +
3. (6)	Sp (control +)	NIH3T3 + sobrenadante procesado de SW	<i>K-ras</i> +
4. (6)	NSPK	NIH3T3 + sobrenadante procesado de SW + PK	<i>K-ras</i> +
5. (6)	NSDI	NIH3T3 + sobrenadante procesado de SW + DI	<i>K-ras</i> +
6. (6)	NSPKDI	NIH3T3 + sobrenadante procesado de SW + PK + DI	<i>K-ras</i> -

SW= Línea celular SW480

PK= proteinasa K

DI= deoxyribonucleasa I

RESULTADOS

Se incluyeron 3 grupos controles: el que se inoculó con la línea celular parental murina NIH3T3 (control -); el que se inoculó con la línea celular parental humana SW480 y el que se inoculó con NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado de SW480 (**Sp**), que se consideraron como controles positivos. Y los grupos de estudio, que fueron los que se inocularon con una clona celular de NIH3T3 expuesta al sobrenadante procesado y tratado con distintas enzimas de la línea celular SW480: **a)** NIH3T3 + sobrenadante procesado y tratado con Proteínasa K (**NSPK**); **b)** NIH3T3 + sobrenadante procesado y tratado con DNAsa I (**NSDI**); y **c)** NIH3T3 + sobrenadante procesado y tratado con Proteínasa K y DNAsa I (**NSPKDI**).

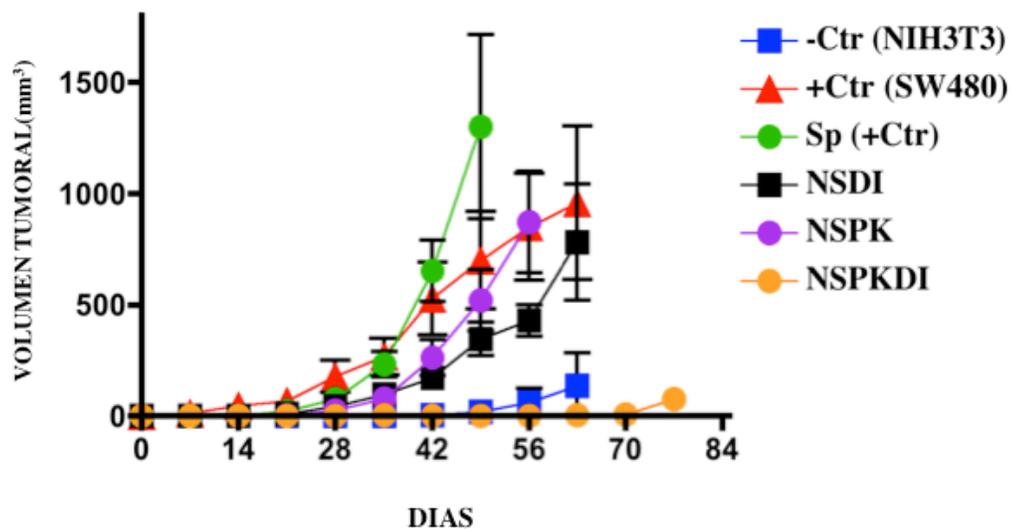


FIG 30. Desarrollo tumoral en ratones atímicos. En ésta gráfica se demuestra el potencial tumorigénico de células NIH3T3 expuestas a sobrenadante procesado de SW480 y tratado con distintas enzimas: NSPK (NIH3T3+sobrenadante procesado y tratado con Proteínasa K); NSDI (NIH3T3+sobrenadante procesado y tratado con DNAsa I) y NSPKDI (NIH3T3+sobrenadante procesado y tratado con Proteínasa K+DNAsaI). Como controles positivos (+Ctr) se utilizó la línea celular parental humana SW480 y células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 (Sp); y como control negativo se usó la línea celular parental murina NIH3T3 (-Ctr).

En la **Fig. 30** se muestra el desarrollo tumoral de cada uno de los grupos de animales inoculados con los distintos cultivos de NIH3T3 expuestas a sobrenadante procesado de SW480 y tratado con diferentes enzimas. Como muestra la gráfica de la **Fig. 30**, a los 25 días de iniciado el experiment, el 100% de los animales inoculados con las células NIH3T3

RESULTADOS

expuestas al sobrenadante procesado y tratado con DNAsaI (NSDI) así como los inoculados con sobrenadante procesado y tratado con Proteinasa K (NSPK), ya tenían tumores palpables; y aunque el crecimiento del tumor no fue tan agresivo como en los 6 animales del grupo control positivo Sp, aproximadamente a los 65 días los tumores ya tenían un tamaño tal (diámetro entre 1.8 a 2.0cm³) que los animales se sacrificaron (**Fig. 31-B**).

Contrariamente, el 83% de los animales que se les inoculó las células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado y tratado con las enzimas DNAsaI y Proteinasa K (NSPKDI), no desarrollaron tumor como se observa en la **Fig. 31-C**; de hecho su comportamiento fue muy similar al control negativo (-Ctr).

Estos resultados son muy importantes, ya que demuestran que las células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 y tratado simultáneamente con ambas enzimas (DNAsaI y Proteinasa K), no son tumorigénicas (**Fig. 31-C**); es decir, que cuando hay una degradación completa del DNA circulante, no hay una transformación celular maligna; lo que sugiere fuertemente que el DNA circulante es el causante de la transformación celular. Y un aspecto muy importante que queda también de manifiesto, es que el DNA circulante está protegido por un complejo probablemente proteico que evita que sea degradado por DNAsas endógenas.

b) En el segundo ensayo, se llevó a cabo una transfección activa en la línea celular murina NIH3T3, utilizando Lipofectamina. Para tal efecto, primeramente se purificó DNA circulante del sobrenadante procesado de la línea celular parental humana SW480 y de la línea celular parental murina NIH3T3 (control negativo), por el método de Stroun, *et al.*, (**63**).

RESULTADOS



FIG 31. Potencial tumorigénico de células NIH3T3 expuestas a sobrenadante procesado de SW480 y tratado con distintas enzimas. **A:** Grupo control positivo, inoculación de células SW480 parentales. Se muestra el desarrollo tumoral que hubo en 6 de 6 animales inyectados. **B:** Grupo control positivo, inoculado con células NIH3T3 expuestas a sobrenadante procesado de SW480 (**Sp**). Grupos de estudio, NIH3T3+sobrenadante procesado y tratado con DNAsaI (**NSDI**); y NIH3T3+sobrenadante procesado y tratado con Proteinasa K (**NSPK**). En cada uno de éstos 3 grupos de estudio, el desarrollo tumoral fué en 6 de 6 animales inyectados. **C:** Grupo de estudio, NIH3T3+ sobrenadante procesado y tratado con Proteinasa K y DNAsa I (**NSPKDI**). En 6 de 6 animales inoculados no hubo desarrollo tumoral. Las flechas señalan el tumor.

También se purificó DNA genómico de éstas mismas líneas celulares, por el método convencional de extracción fenol/cloroformo (**103**). Posteriormente, cada DNA circulante purificado se co-transfectó con el plásmido pNeo (que contiene el gen de resistencia a neomicina) en la línea celular murina NIH3T3. Finalmente las células transfectadas se seleccionaron con el antibiótico G418 para obtener clonas estables.

Se generaron las siguientes clonas estables: **Neo** (NIH3T3 transfectadas sólo con el plásmido); **GenoNH** (NIH3T3 transfectadas con el DNA genómico de NIH3T3); **GenoSW** (NIH3T3 transfectadas con DNA genómico de SW480); **NeoNH** (NIH3T3 transfectadas con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de NIH3T3) y **NeoSW** (NIH3T3 transfectadas con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de SW480). Para demostrar la transfección de DNA humano en éstas clonas se amplificaron, por PCR, tres de los genes humanos que ya anteriormente se habían analizado en los experimentos de transfección pasiva: *GRB2*, *RAB30* y *K-ras^{val12}* (**Fig. 32**). Como se observa en la **Fig. 32**, hay una señal claramente positiva para cada uno de los genes estudiados en las clonas GenoSW y NeoSW, además del control positivo.

RESULTADOS

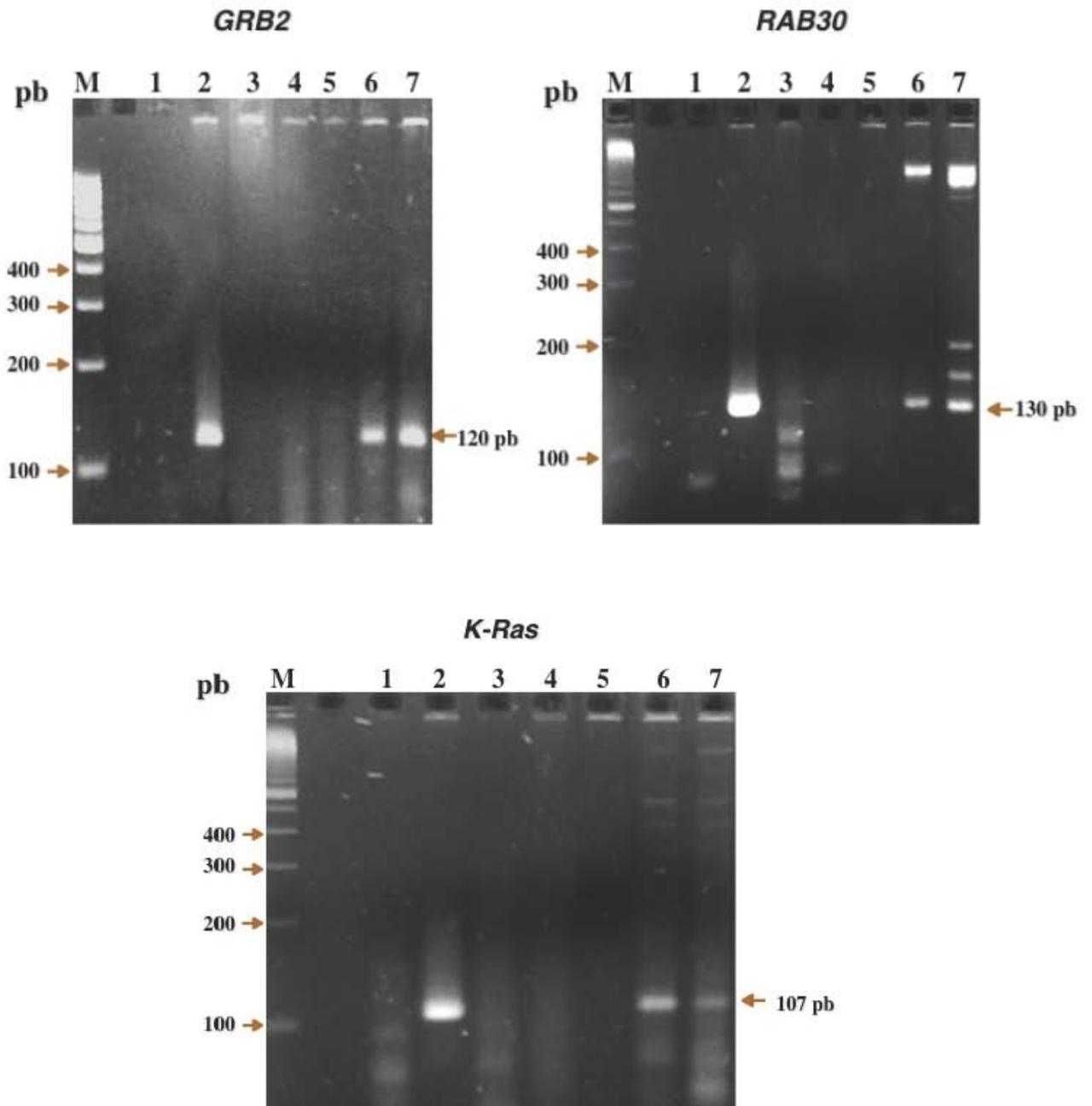


FIG. 32. Detección por PCR de tres genes humanos en células NIH3T3 transfectadas activamente con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de SW480. Utilizando primers específicos para secuencias humanas, se demostró la presencia de los genes *GRB2*, *RAB30* y *K-ras^{val12}* en células NIH3T3 transfectadas con DNA circulante de sobrenadante procesado de SW480. **M:** Marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** SW480 (control +); **3:** clona Neo; **4:** clona GenoNH; **5:** NeoNH (control negativo); **6:** GenoSW; **7:** NeoSW.

RESULTADOS

Para demostrar el potencial tumorigénico de las clonas derivadas de la transfección activa, se llevaron a cabo los ensayos tumorigénicos en ratones desnudos. En la **Tabla VI** se muestran los grupos de animales que se incluyeron y las clonas celulares que se les inoculó.

TABLA VI. Ensayos de Tumorigenicidad. La tabla muestra los grupos de animales tratados y las diferentes células inoculadas.

Grupo (# de animales)	Línea ó Clona Celular	Origen Celular	Secuencia Mutada
1. (6)	NIH3T3 (control -)	Fibroblastos murinos	<i>K-ras</i> -
2. (6)	Neo (control -)	NIH3T3 transfectadas sólo con plásmido ¹	<i>K-ras</i> -
3. (6)	SW480 (control +)	Adenocarcinoma colorectal	<i>K-ras</i> +
4. (6)	NeoSW	NIH3T3+Neo+DNA circulante purificado de SW480	<i>K-ras</i> +
5. (6)	GenoSW	NIH3T3+ Neo+DNA genómico purificado de SW480	<i>K-ras</i> +

plásmido¹= pNeo que contiene el gen de resistencia a la neomicina.

En la **Fig. 33** se muestra que los ratones inyectados con células NeoSW (NIH3T3 transfectadas con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de SW480), desarrollaron tumores 40 días después de la inoculación (**Fig. 34-C**); alcanzando incluso, el mismo volumen tumoral que el del control positivo (SW480) o que el de la clona GenoSW (NIH3T3 transfectadas con DNA genómico de SW480) como se observa en la **Fig. 34-B**; lo que indica un comportamiento tumorigénico.

RESULTADOS

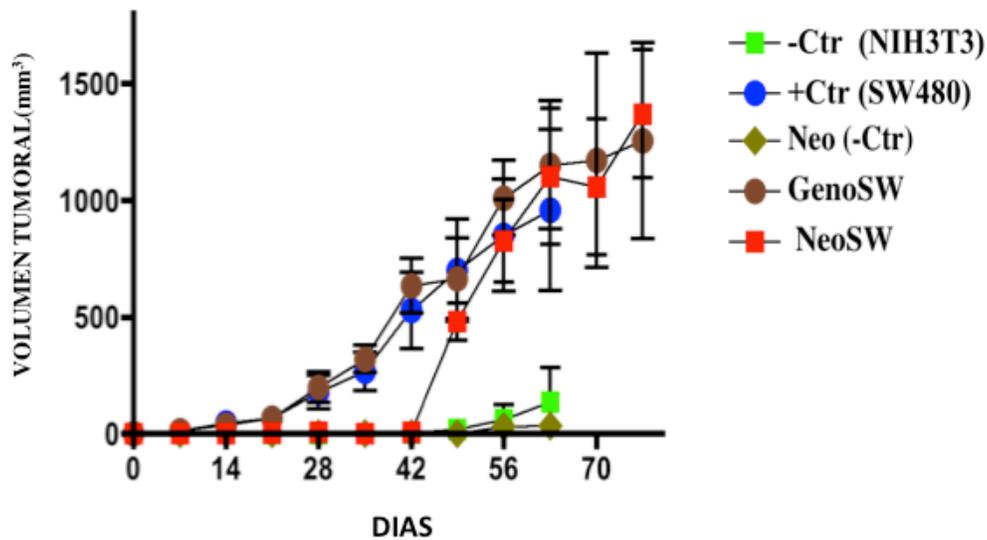


FIG 33. Desarrollo tumoral en ratones atímicos. En ésta gráfica se demuestra el potencial tumorigénico de células NIH3T3 transfectadas activamente con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de SW480 (**NeoSW**). Controles negativos: **NIH3T3** (línea celular parental murina) y **Neo** (NIH3T3 transfectadas sólo con el plásmido pNeo); controles positivos: **SW480** (línea celular parental humana) y **GenoSW** (NIH3T3 transfectadas con DNA genómico de SW480).

Cabe resaltar, que el desarrollo tumoral tanto de la clona GenoSW como de la NeoSW, fue en el 100% de los animales inyectados. Nuevamente los resultados sugieren fuertemente que el DNA circulante tiene capacidad transformante así como potencial tumorigénico.



FIG 34. Potencial tumorigénico de células transfectadas activamente con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de SW480. **A:** Grupo control negativo: inoculación de células NIH3T3 transfectadas sólo con el plásmido (**Neo**). **B:** Control positivo: NIH3T3 transfectadas con DNA genómico de SW480 (**GenoSW**). **C:** NIH3T3 transfectadas activamente con DNA circulante purificado de sobrenadante procesado de SW480 (**NeoSW**). Las flechas señalan los tumores.

5. *Demostración de la transferencia horizontal del DNA circulante: un modelo in vivo.*

Para demostrar que la transferencia horizontal del DNA circulante, es un evento biológico que no sólo sucede *in vitro* sino también *in vivo*; se diseñaron dos experimentos con modelos animales:

a) En el primer modelo se utilizaron ratas Wistar (ver **Fig. 35**). Brevemente, se usaron 3 animales a lo que se les inoculó por vía intravenosa (vena caudal), 1ml de sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa. Cada animal fue expuesto a diferentes tiempos al final de los cuales, se sacrificaron y se buscó tanto evidencia tumoral como marcadores genéticos específicos de las células HeLa, como son los genes E6 y E7 de HPV18, en distintos órganos.

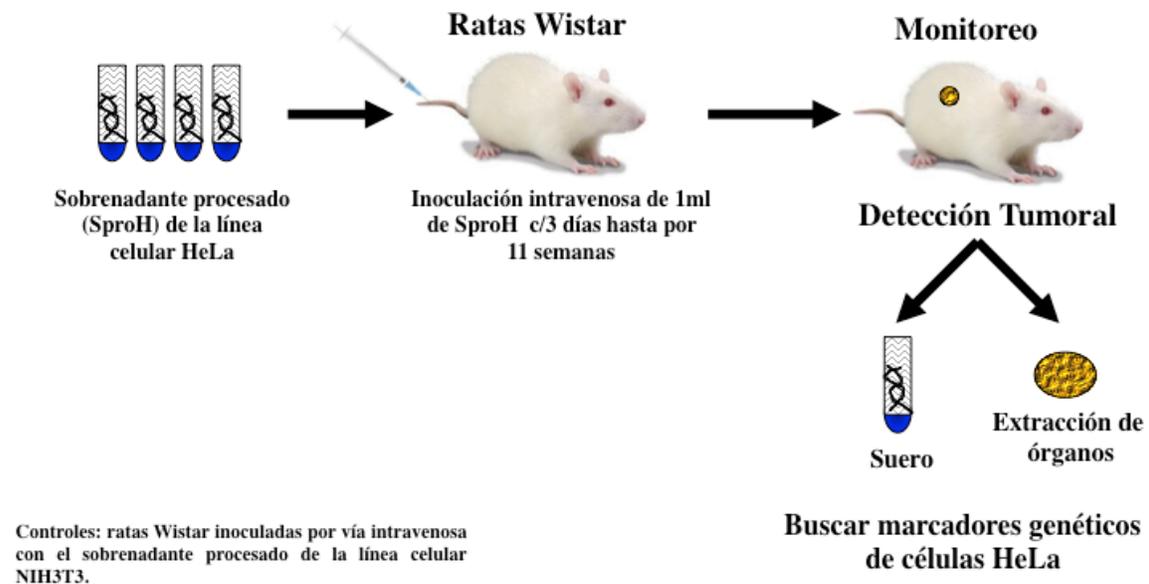


FIG 35. Diseño Experimental para Demostrar la Transferencia Horizontal del DNA Circulante en un Modelo *In Vivo*.

Como se muestra en la **Tabla VII**, sólo en el animal que se inoculó por 58 días se detectó señal positiva para E6 y E7 de HPV18, y fue en hígado (**Fig. 36**). Además, como se muestra en la **Fig. 37**, cuando se analizó también la expresión de E7 de HPV en todos los órganos, se observó una señal positiva en el mismo tejido (hígado).

RESULTADOS

TABLA VII. Ensayos de Transfección Pasiva *In Vivo*

# de animal	Sobrenadante	Tiempo de Exposición (días)	Marcador
1	HeLa	44	Negativo
2	HeLa	58	E6 y E7 de HPV18 en hígado
3	HeLa	78	Negativo

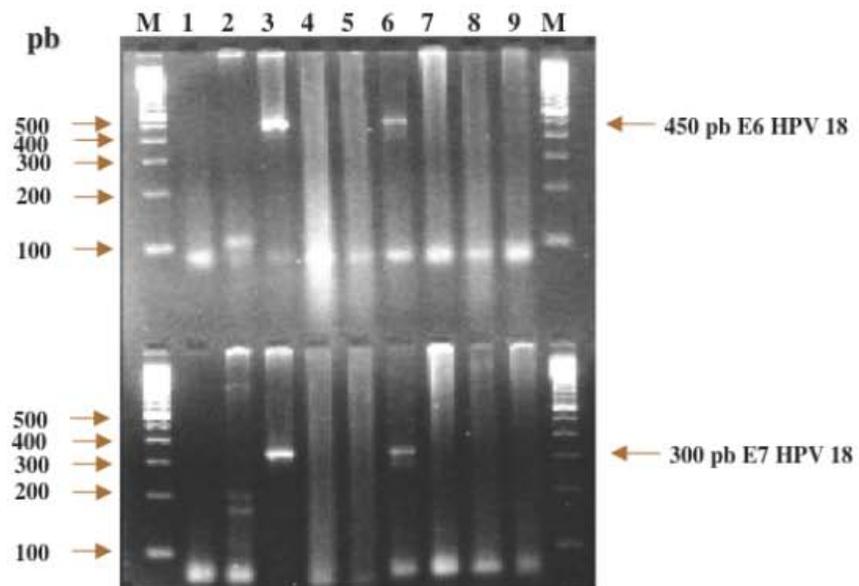


FIG 36. Detección por PCR de los genes E6 y E7 de HPV 18 en varios órganos de rata Wistar que se inoculó por vía intravenosa con el sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa.

M: marcador del peso molecular; 1: H₂O; 2: células NIH3T3 (Ctr -); 3: células HeLa (Ctr +); 4: bazo; 5: colon; 6: hígado; 7: ovario; 8: pulmón; 9: útero; M: marcador de peso molecular.

RESULTADOS

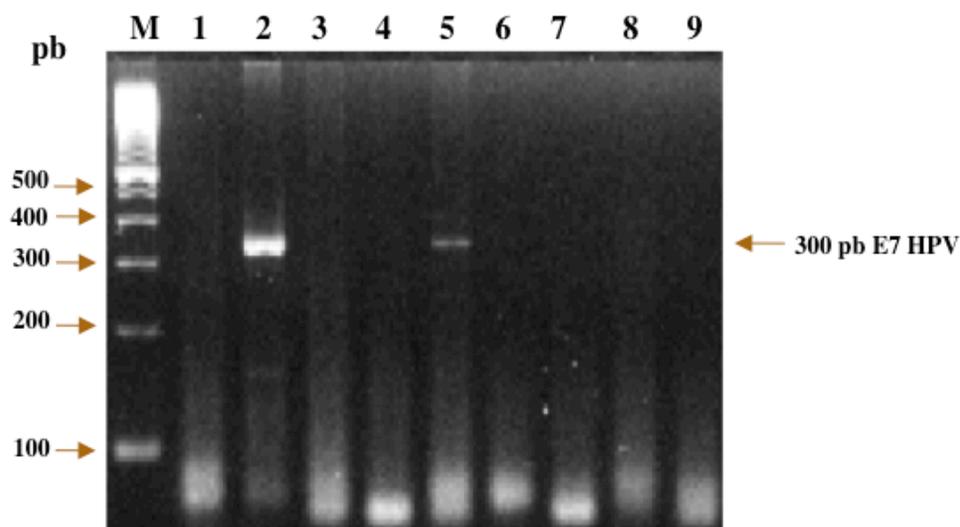


FIG 37. Detección por RT-PCR de la proteína E7 de HPV 18 en diferentes órganos de una rata Wistar inoculada por vía intravenosa con el sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa. M: marcador del peso molecular; 1: H₂O; 2: células HeLa (Ctr +); 3: bazo; 4: colon; 5: hígado; 6: ovario; 7: pulmón; 8: riñón; y 9: útero.

b) En el segundo modelo se utilizaron ratones atómicos (ver Fig. 38), los cuales se dividieron en 2 grupos: el grupo control y el de estudio. Al grupo de estudio se les inyectó por vía intraperitoneal, 500µl de sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa durante 90 días; al final de los cuales se sacrificaron y se buscó tanto evidencia tumoral como marcadores genéticos específicos de las células HeLa, como son los genes E6 y E7 de HPV18, en distintos órganos. Al grupo control sólo se les inoculó por la misma vía, solución salina durante 90 días. Como se muestra en la Fig. 39, se detectó señal positiva de E7 de HPV18 sólo en hígado, como en el caso del modelo de rata Wistar.

Estos dos modelos nos demuestran claramente que independientemente de la vía de inoculación del sobrenadante procesado, hay transferencia de DNA circulante *in vivo*.

RESULTADOS

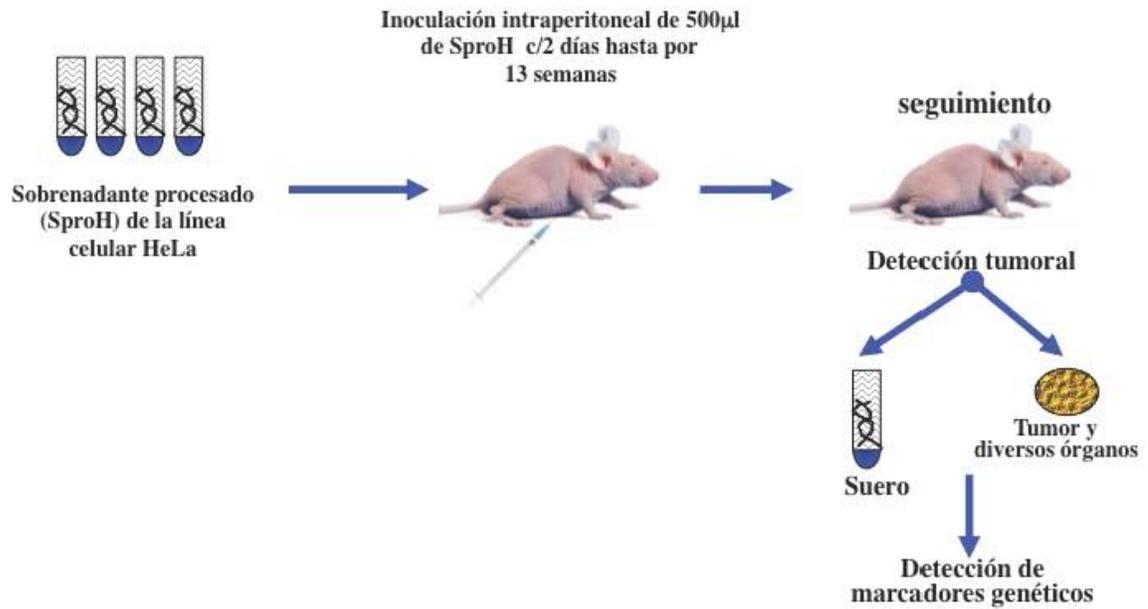


FIG 38. Diseño Experimental para Demostrar la Transferencia Horizontal del DNA Circulante en un Modelo *In Vivo*.

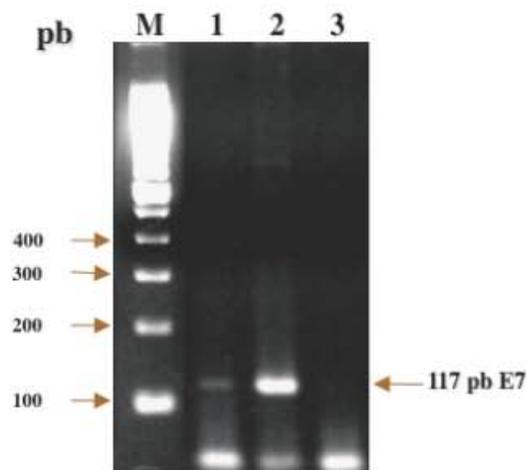


FIG 39. Detección por PCR del gen E7 de HPV 18 en varios órganos de ratones *nu/nu* que se inocularon por vía intraperitoneal con el sobrenadante procesado de la línea celular humana HeLa. M: marcador del peso molecular; 1: hígado; 2: células HeLa (Ctr +); 3: H₂O.

6. *Demostración del papel biológico del DNA circulante en la transformación celular.*

Todos los resultados antes descritos, demuestran que el DNA circulante es capaz de transformar *in vitro* a la línea celular NIH3T3 derivada de fibroblastos de embrión de ratón. Estas células se caracterizan porque carecen de la expresión del gen p16, originando su inmortalidad (95); lo que las hace un excelente modelo para los ensayos de transformación celular. Sin embargo, como esta línea celular ya tiene un hit genético, este no permite determinar el papel del DNA circulante en el proceso de transformación celular. Así que se diseñó un ensayo experimental para investigar el papel del DNA circulante en la transformación celular; ya sea como un iniciador o como un promotor. Brevemente, expusimos células primarias normales de prepucio humano (BB1) al sobrenadante procesado de la línea celular humana SW480 durante 45 días. Posteriormente, para demostrar la transfección de DNA circulante de SW480 a las células normales BB1, se purificó DNA genómico de éstas células y se amplificó, por PCR, el gen mutado *K-ras*^{val12}. Como se observa en la **Fig. 40**, hay una señal claramente positiva para *K-ras*^{val12} en las células BB1SW, así como en los controles positivos NIHSW y SW480. Lo que muestra claramente que hubo transferencia del DNA circulante de SW480 a las células primarias BB1.

RESULTADOS

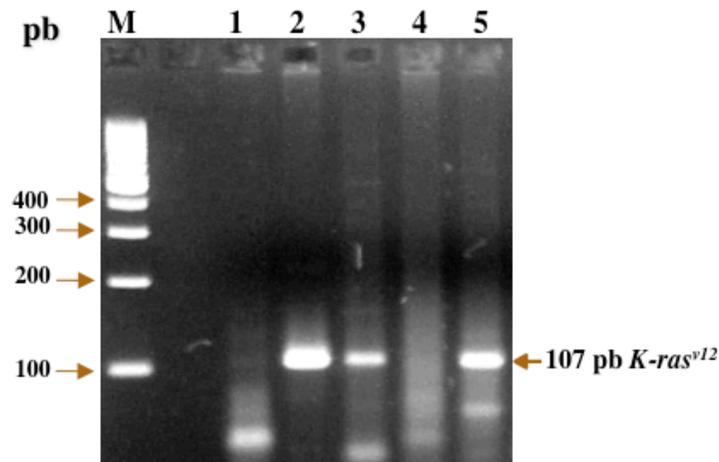


FIG. 40. Detección por PCR del gen mutado *K-ras^{v12}* humano en células primarias normales de prepucio humano (BB1) expuestas al sobrenadante procesado de SW480. Se demostró la presencia del gen mutado *K-ras^{v12}* en células normales transfectadas pasivamente con el sobrenadante procesado de SW480 (BB1SW). M: Marcador de peso molecular; 1: H₂O; 2: SW480 (control +); 3: clona BB1SW; 4: células primarias BB1; 5: NIH3T3 + sobrenadante procesado de la línea celular SW480, control + (NIHSW) .

Posteriormente, se realizaron los ensayos de potencial tumorigénico de las células derivadas de la exposición a sobrenadante procesado de SW480 (BB1SW), en ratones nu/nu. La inoculación fue subdérmica y se incluyeron 2 grupos control: uno positivo que fue células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 (NIH3T3SW); y el control negativo que fueron las células BB1 parentales. Como se observa en la Fig. 41, sólo hubo desarrollo tumoral en el control positivo (NIH3T3SW); tanto el grupo control negativo como el grupo de estudio (BB1SW), no hubo crecimiento tumoral después de 49 días. Estos resultados sugieren fuertemente que para que el DNA circulante transforme, se requiere que las células a las que se introduce, tenga a priori un hit genético; por lo que el DNA circulante actúa como un promotor y no como un iniciador de la transformación.

RESULTADOS

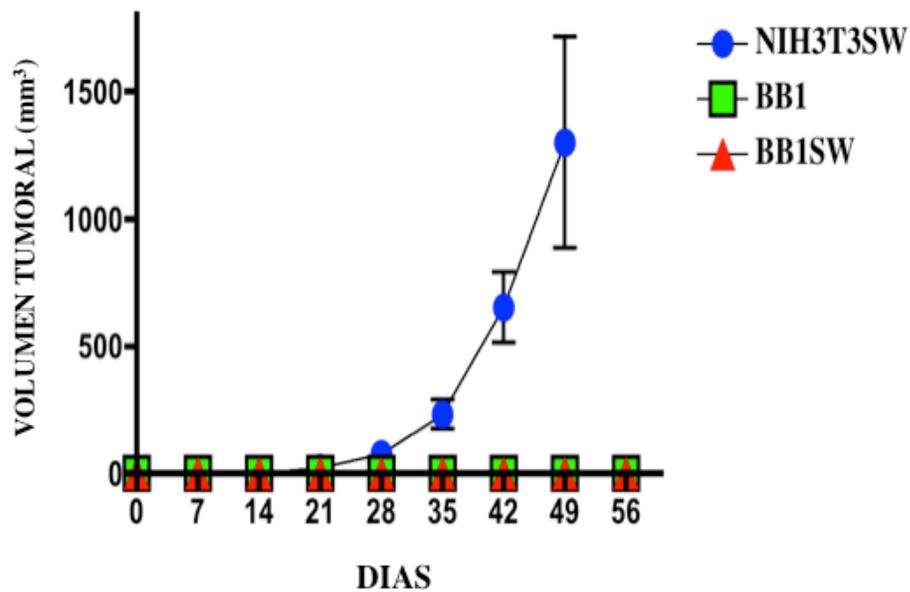


FIG 41. Potencial tumorigénico de las células primarias normales humanas (BB1), expuestas al sobrenadante procesado de la línea celular SW480 (BB1SW). Se utilizó como control negativo a las células parentales BB1 y como control positivo a células NIH3T3 cultivadas con el sobrenadante procesado de SW480 (NIH3SW).

Para confirmar que el DNA circulante no es un iniciador de la carcinogénesis, se diseñó un experimento con un modelo *in vivo* (ver **Fig. 42**) en donde se utilizaron ratas nu/nu a las que previo a la inoculación (vía intravenosa) de cuerpos apoptóticos (los cuales contienen una cantidad alta de ácidos nucleicos), se inmunosuprimieron inyectándoles (vía intraperitoneal) una mezcla de 2 medicamentos que son utilizadas para tratamientos de quimioterapia para pacientes con cáncer: Doxorrubicina y Paclitaxol; a las dosis descritas en material y métodos.

RESULTADOS

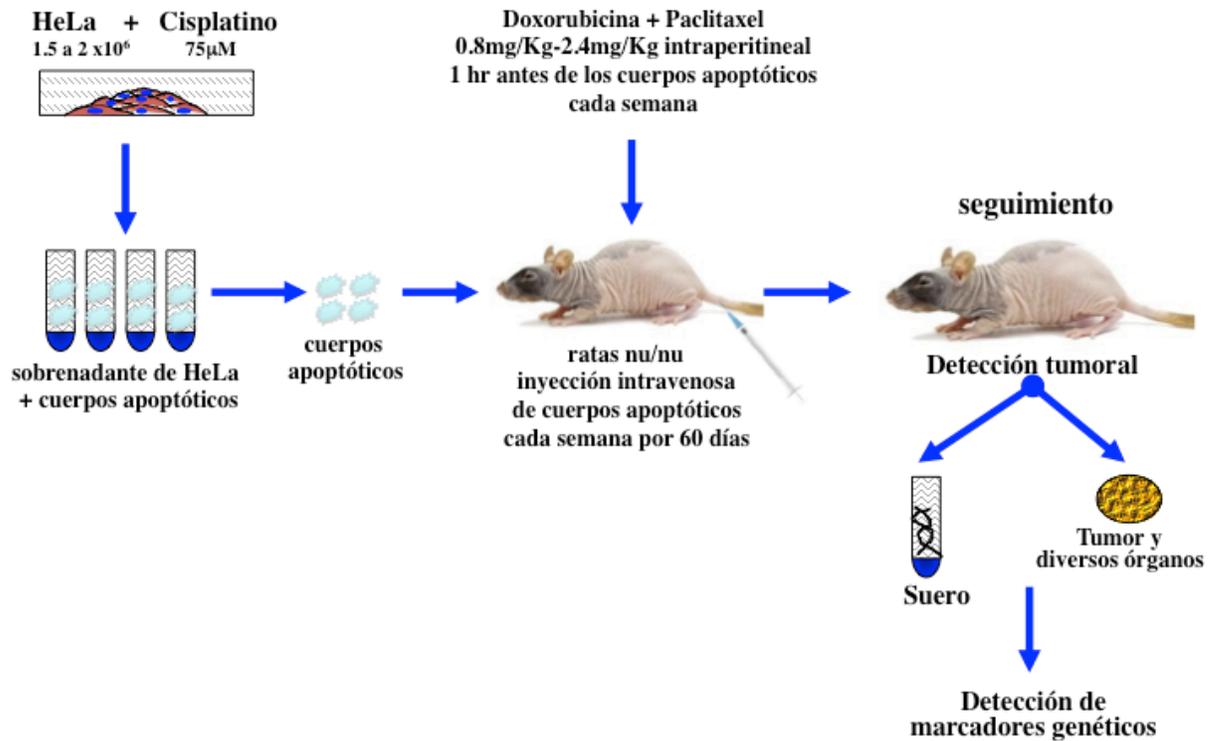


FIG 42. Diseño Experimental para Demostrar la Participación del DNA Circulante en la Transformación Celular en un Modelo *In Vivo*.

En la **Tabla VIII**, se describen los grupos de animales que se formaron así como el tratamiento que se le dio a cada uno. El tratamiento con las drogas así como la inoculación de los cuerpos apoptóticos fue durante 60 días, al término de los cuales se sacrificaron los animales y se realizó la necropsia para buscar evidencia tumoral, tanto macroscópica como microscópicamente. En la **Tabla VIII**, se muestra que en ninguno de los grupos de animales hubo evidencia de tumor y que sólo el grupo que se inoculó con los cuerpos apoptóticos y no se le aplicó el tratamiento con la mezcla de medicamentos, se detectó una señal positiva, por PCR, para la secuencia repetitiva humana *ALU* en bazo, riñón, hígado y pulmón (**Fig. 43**). Mientras que únicamente en hígado, se detectó una señal positiva para E6 y E7 de HPV18 (dato no mostrado).

RESULTADOS

TABLA VIII. Ensayo de Transformación Celular con DNA Circulante: un modelo *In Vivo* (ratas nu/nu)

Grupo (# de animales)	Cuerpos Apoptóticos	Drogas	Tiempo de Exposición	Evidencia Tumoral	Marcador Genético
4	NO	Doxo + Paclitx ^{b,c}	60 días	ninguna	negativo
4	HeLa ^a	NO	60 días	ninguna	+ para <i>ALU</i> en bazo, riñón, hígado y pulmón. + para E6 y E7 de HPV18 en hígado.
4	HeLa	Doxo + Paclitx	60 días	ninguna	negativo

a: 1.5 a 2 x10⁶, 99% de mortalidad con cisplatino (75µM)

b: Doxorubicina (0.8mg/Kg) y Paclitaxol (2.4mg/kg)

c: dosis: una vez por semana por 8 semanas.

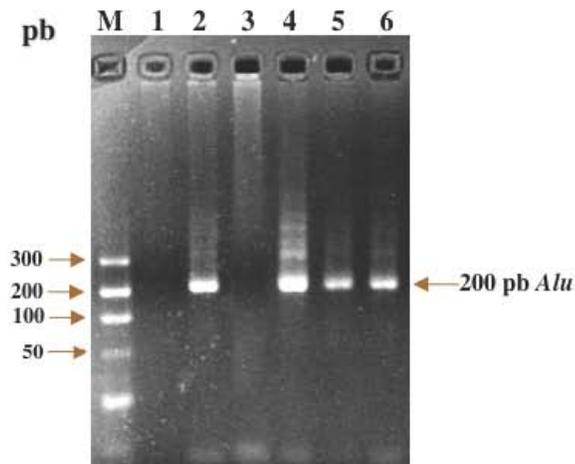


FIG 43. Detección por PCR de la secuencia repetitiva humana *Alu*-YD6 en varios órganos de rata *Hsd:RH-Foxn1^{tmu}* que se inoculó por vía intravenosa con cuerpos apoptóticos provenientes de la línea celular humana HeLa. M: marcador del peso molecular; 1: H₂O; 2: células SW480 (Ctr +); 3: DNA genómico de cola de rata (Ctr -); 4: hígado; 5: riñón; 6: bazo.

RESULTADOS

Es importante hacer notar, que aunque el sistema inmune del animal se mermó con los medicamentos, el DNA circulante no fue capaz de transformar a pesar de haber inoculado cuerpos apoptóticos los cuales contienen una cantidad alta de ácidos nucleicos; sin embargo, si hubo transferencia de DNA en diversos órganos. Lo que confirma los resultados que se obtuvieron *in vitro*, el DNA circulante no es un iniciador de la carcinogénesis, sino un promotor.

7. El papel del DNA circulante en la progresión del cáncer.

En resumen, los resultados han demostrado que el DNA circulante además de transferirse tanto *in vitro* como *in vivo*, es capaz de transformar a células con una alteración genética previa y no a células totalmente normales; lo que sitúa al DNA circulante como un promotor de la carcinogénesis. Para demostrar el papel promotor del DNA circulante, se diseñó un ensayo experimental *in vivo* (ver **Fig. 44**), en donde ratas inmunocompetentes previamente tratadas con un carcinógeno cuyo blanco es colon (1,2-dimetilhidracina), fueron inoculadas en el dorso con células SW480 como fuente de DNA circulante para demostrar si la presencia de éste, aumenta la frecuencia de tumores en colon. Para ello se formaron 8 grupos de ratas Wistar con distintos tratamientos (ver **Tabla IX**).

RESULTADOS

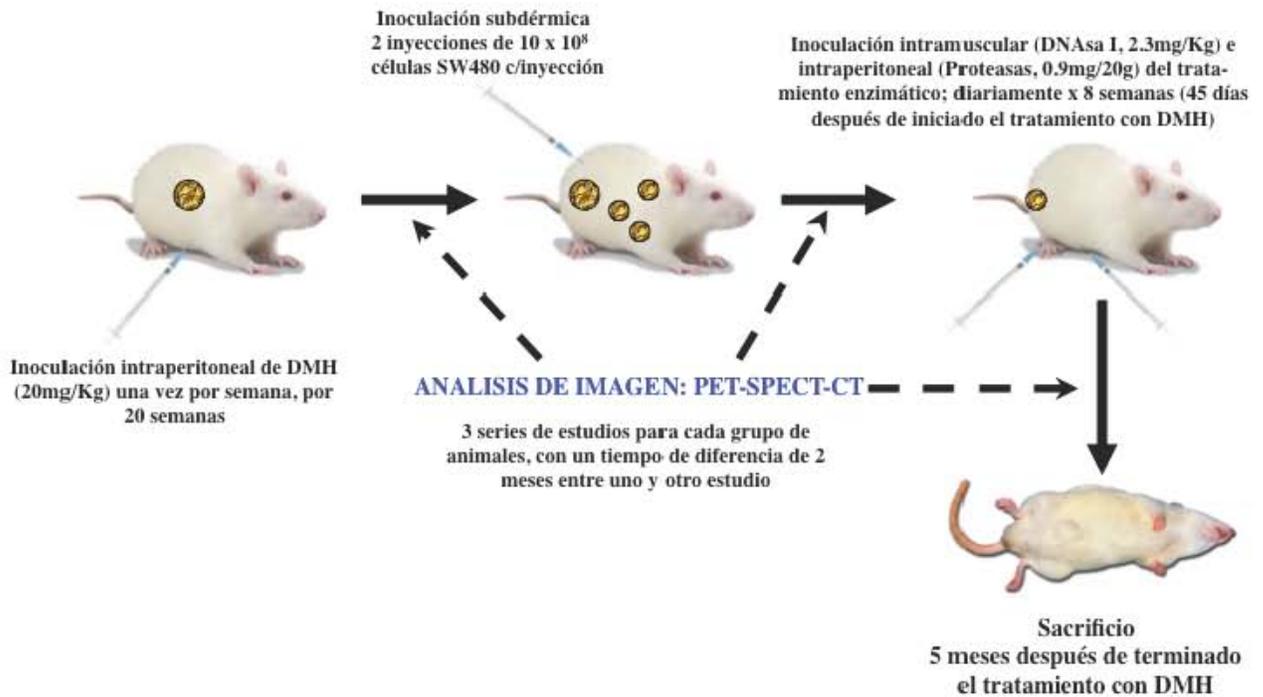


FIG 44. Diseño Experimental para Demostrar el Papel del DNA Circulante en la Progresión del Cáncer en un Modelo *In Vivo*.

TABLA IX. DNA Circulante en la Progresión del Cáncer: un modelo *In Vivo*. Grupos y Tratamiento.

GRUPOS	# de animales	TRATAMIENTO
G1C	7	ninguno
G2D	12	Dimetilhidracina
G3DS	16	Dimetilhidracina + SW480
G4DSP	5	Dimetilhidracina + SW480 + Proteasas
G5DSD	5	Dimetilhidracina + SW480 + DNAsa I
G6DSPD	6	Dimetilhidracina + SW480 + Proteasas + DNAsa I
G7DPD	5	Dimetilhydracine+Prot+DNase I
G8S	7	SW480

Además, durante el tratamiento aplicado a los animales y al final del mismo, se realizó una evaluación clínica de los animales a través de un monitoreo utilizando técnicas de imagen molecular con un equipo de micro**PET-CT** marcando con FDG-F¹⁸ (ver **Fig. 45**).

Después de 15 semanas de haber iniciado el tratamiento con el carcinógeno (DMH); y de 1 y 3 meses después de haber terminado las 20 semanas de administración del DMH (ver **Fig. 45**), se evaluó la formación de tumores, en 2 ratas de cada grupo de estudio, con el microPET-CT. Los resultados mostraron que las 2 ratas de los grupos control G1C y G8S durante los 3 estudios, no mostraron evidencia de tumor; sin embargo, en una de las dos ratas del grupo que recibieron sólo el DMH (G2D), si se detectó una masa abdominal en la tercera evaluación con el microPET-CT, con una relación de SUV de 2.2 (**Fig. 46**).

RESULTADOS

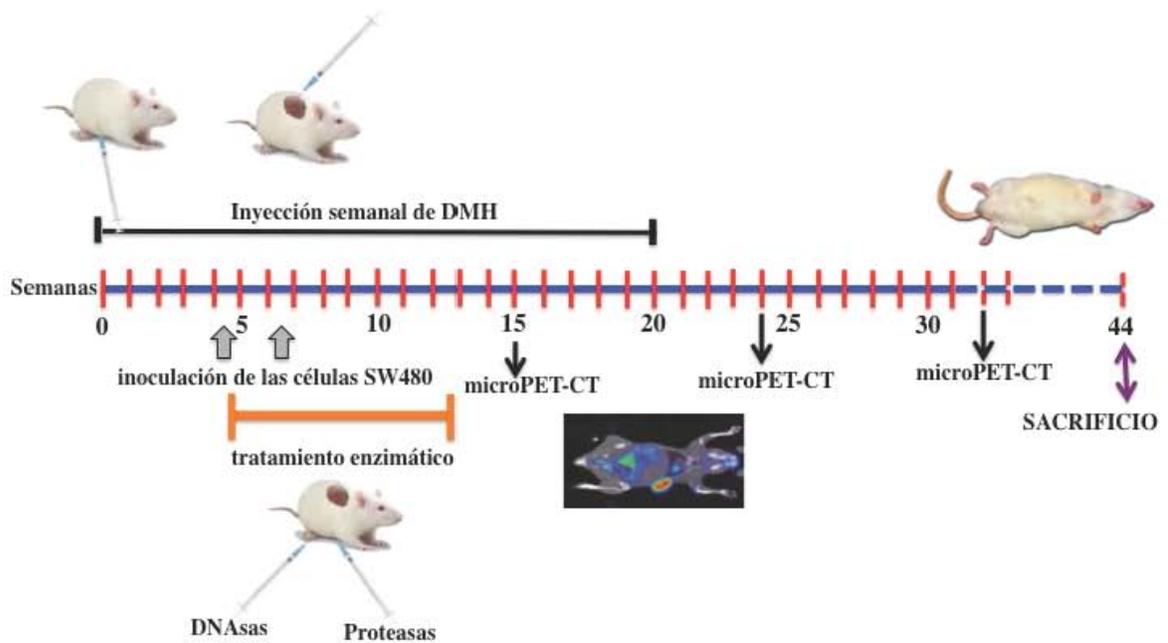


FIG 45. Esquema del Tratamiento Aplicado a Ratas Wistar para Demostrar el Papel del DNA Circulante en la Progresión Tumoral. Las ratas se trataron primeramente con el carcinógeno de colon 1,2-dimetilhidrazina (DMH) por vía intraperitoneal; posteriormente se inyectaron subdérmicamente, células humanas de cáncer de colon SW480 y finalmente se trataron con una mezcla de enzimas (DNasa I, tripsina, papaína y quimotripsina).

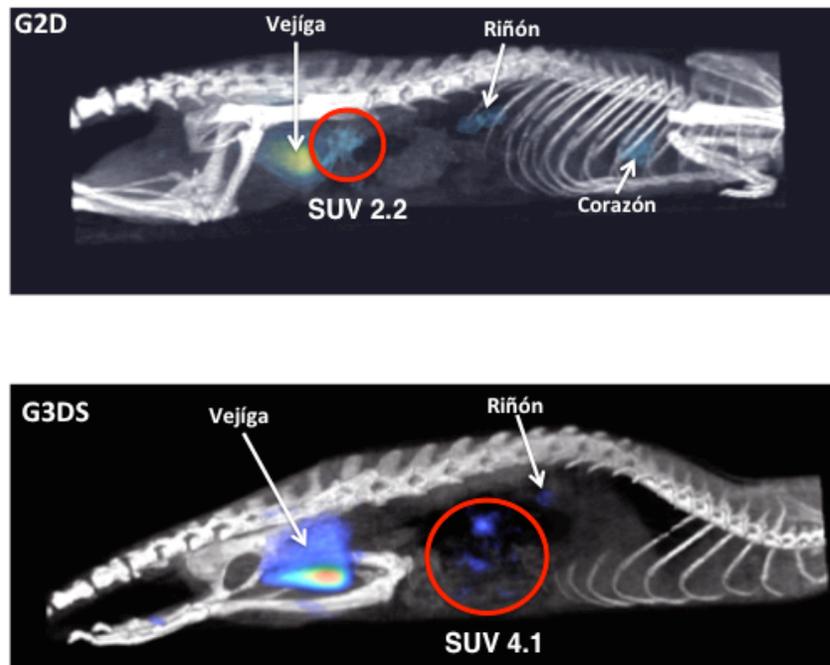


FIG 46. Evaluación clínica del desarrollo tumoral por análisis de imágenes del MicroPET-CT por captación de FDG-F¹⁸ en tumores, en todos los grupos de estudio. La imagen muestra la evaluación clínica del desarrollo tumoral en ratas Wistar de los grupos G2D y G3DS, en la semana 32 (III) del estudio, según el esquema de tratamiento. Una de las ratas del grupo G2D (sólo carcinógeno), muestra una masa irregular en la zona abdominal con un SUV de 2.2. Mientras que una de las ratas del grupo G3DS (DMH+SW480), tenía masas abdominales con un SUV de 4.1; lo que indica la presencia de tumor. Los círculos indican las zonas en donde se midió el SUV.

Cuando se evaluaron las 2 ratas de grupo G3DS, se observó que una de ellas tenía una masa abdominal desde la primera evaluación con una relación de SUV de 2.2 que fue aumentando importantemente hasta 4.1 en la tercera evaluación (ver **Figs. 46 y 47**); lo que sugiere una progresión tumoral. Interesantemente, al analizar las imágenes de microPET-CT del grupo G6DSPD, se observó que una de las 2 ratas presentaba una masa abdominal con una relación de SUV de 3.9 en la primera evaluación; pero ésta relación disminuyó en la segunda (SUV de 1.8) y aún más en la tercera evaluación (SUV de 1.0) (ver **Fig. 47**); probablemente porque hubo una reducción tumoral debido al tratamiento enzimático.

RESULTADOS

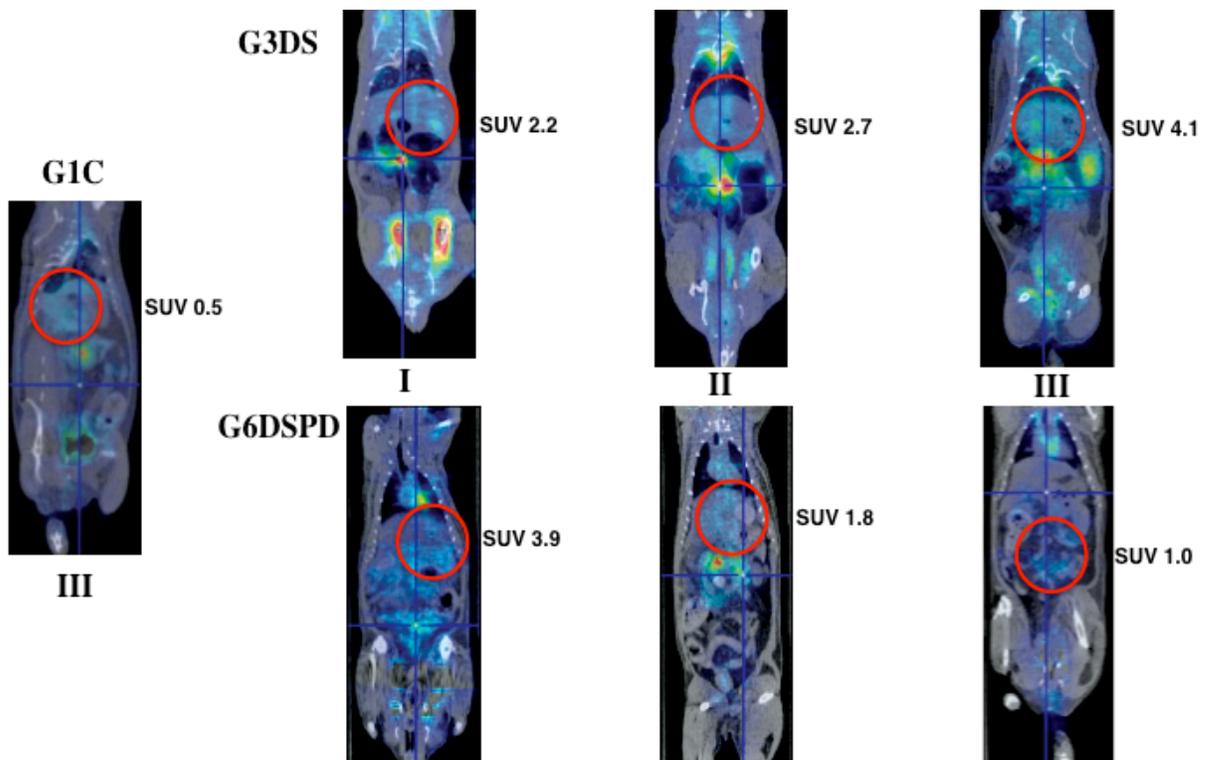


FIG 47. Evaluación clínica del desarrollo tumoral por análisis de imágenes del MicroPET-CT por captación de FDG-F¹⁸ en tumores, en todos los grupos de estudio. La imagen muestra la evaluación clínica del desarrollo tumoral en ratas Wistar de los grupos G3DS y G6DSPD, en la semana 15 (I), 24 (II) y 32 (III) del estudio, según el esquema de tratamiento. Una de las ratas del grupo G3DS (DMH+SW480), tenía zonas con masas abdominales con un SUV de 4.1 (en la tercera evaluación, III), lo que indica la presencia de tumor. Mientras que una de las ratas del grupo G6DSPD, mostró masas abdominales con un SUV de 3.9 en la primera evaluación (I) y a la tercera evaluación no se observó masas abdominales y el SUV fue menor de 1.0; casi comparable con el grupo control G1C (SUV 0.5). Los círculos indican las zonas en donde se midió el SUV.

A las 44 semanas de haber iniciado el experimento (**Fig. 45**), los animales se sacrificaron y se realizó la necropsia para buscar evidencia tumoral, tanto macrocópica como microscópica. En la **Tabla X** y **XI** se resumen los resultados obtenidos. La primera observación es el diagnóstico histopatológico de los tumores que se generaron (ver **Tabla X**); así, mientras que en los grupos de animales que se aplicó el carcinógeno (DMH) como tratamiento principal (G2D y G7DPD) el tipo histopatológico del tumor fue Adenocarcinoma, en los grupos en los que además del DMH se inoculó la línea celular SW480 (G3DS, G4DSP, G5DSD y G6DSPD) el tipo histopatológico fue Adenocarcinoma pero del tipo seroso con células en anillo.

RESULTADOS

TABLA X. DNA Circulante en la Progresión del Cáncer. Desarrollo Tumoral y Diagnóstico Histopatológico

GRUPOS	# ANIMALES CON TUMOR/ # ANIMALES TOTAL	DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO
G1C	0/7	normal
G2D	2/12	Adenocarcinoma
G3DS	10/16	Adenocarcinoma seroso con células en anillo
G4DSP	3/5	Adenocarcinoma seroso con células en anillo
G5DSD	3/5	Adenocarcinoma seroso con células en anillo
G6DSPD	1/6	Adenocarcinoma seroso con células en anillo
G7DPD	3/5	Adenocarcinoma
G8S	0/7	normal

Es de hacer notar que la mayoría de los grupos de animales a los que además de aplicarles el carcinógeno se les inoculó la línea celular SW480 (G3DS, G4DSP y G5DSD), más del 60% de ellos (10 de 16; 3 de 5 y 3 de 5 respectivamente) presentaron tumor comparado con el 16.7% del grupo que sólo se les aplicó el carcinógeno (G2D, 2 de 12 animales) (ver **Tabla X**). Además el número promedio de tumores que se desarrollaron en colon en éstos tres grupos (G3DS, G4DSP y G5DSD), fue mayor de 3 (**Tabla XI**); mientras que en el grupo G2D fue de 1.5 ± 0.71 .

RESULTADOS

TABLA XI. DNA Circulante en la Progresión del Cáncer. Desarrollo Tumoral e Invasión a otros Organos

GRUPOS	# animales con tumor/ # total animales	# tumores macros- cópicos en colon	# animales con invasión a otros órganos/ # animales tumor	ORGANOS INVADIDO
G1C	0/7	ninguno	0/0	ninguno
G2D	2/12	1.5 ± 0.71	0/2	ninguno
G3DS	10/16	3.8 ± 0.84	4/10	diafragma, hígado, pulmón, mesenterio
G4DSP	3/5	4.0 ± 1.0	2/5	ano, recto, laringe, mesenterio hígado
G5DSD	3/5	3.5 ± 0.71	2/5	ovario, hígado, mesenterio
G6DSPD	1/6	1.0	0/1	ninguno
G7DPD	3/5	1.4 ± 0.55	0/3	ninguno
G8S	0/7	ninguno	0/0	ninguno

En la **Fig. 48**, se muestra las imágenes más representativas de las lesiones tumorales en el colon de las ratas; destacando que los grupos G3DS y G4DSP fueron los que tuvieron un mayor número de tumores (ver **Tabla XI**). También es importante mencionar que sólo en los grupos G3DS, G4DSP y G5DSD el 40% de los animales que desarrollaron tumor en colon, mostraron además invasión tumoral a otros órganos (4 de 10, 2 de 5 y 2 de 5 animales respectivamente) (ver **Tabla XI**); como se muestra muy claramente en la **Fig. 49**. Estos resultados sugieren que en aquellos grupos de animales que fueron tratados además del carcinógeno con la línea celular SW480, probablemente se facilitó la entrada del DNA circulante proveniente de la línea celular, a las células que fueron “sensibilizadas” con el DMH; por lo que hubo un mayor desarrollo tumoral además de invasión a otros órganos comparados con el grupo que sólo se trató con el carcinógeno. Esta observación parece confirmarse cuando se analizaron los resultados mostrados por el grupo G6DSPD (ver **Tabla XI**); donde además del tratamiento con el carcinógeno y la inoculación de la línea celular SW480, se les aplicó el tratamiento de una mezcla de enzimas (como en los ensayos

RESULTADOS

in vitro mostrados anteriormente, **Fig. 30**) para eliminar el DNA circulante proveniente de SW480. Y se observó que sólo el 16.7% de los animales de éste grupo G6DSPD (1 de 6 animales, **Tabla XI**), desarrolló un tumor en colon y no hubo invasión a otros órganos; mientras el resto de los animales del grupo al parecer o no desarrollaron tumor en ningún órgano como se muestra en la **Fig. 50**; o si hubo desarrollo tumoral pero probablemente hubo una reducción del mismo debido al tratamiento enzimático, como lo sugieren las imágenes del microPET-CT (**Fig. 47**). En aquellos animales que fueron tratados con la mezcla de enzimas (grupos G6DSPD y G7DPD), se observaron regiones de vascularización abundante en el mesenterio (**Fig. 50**).

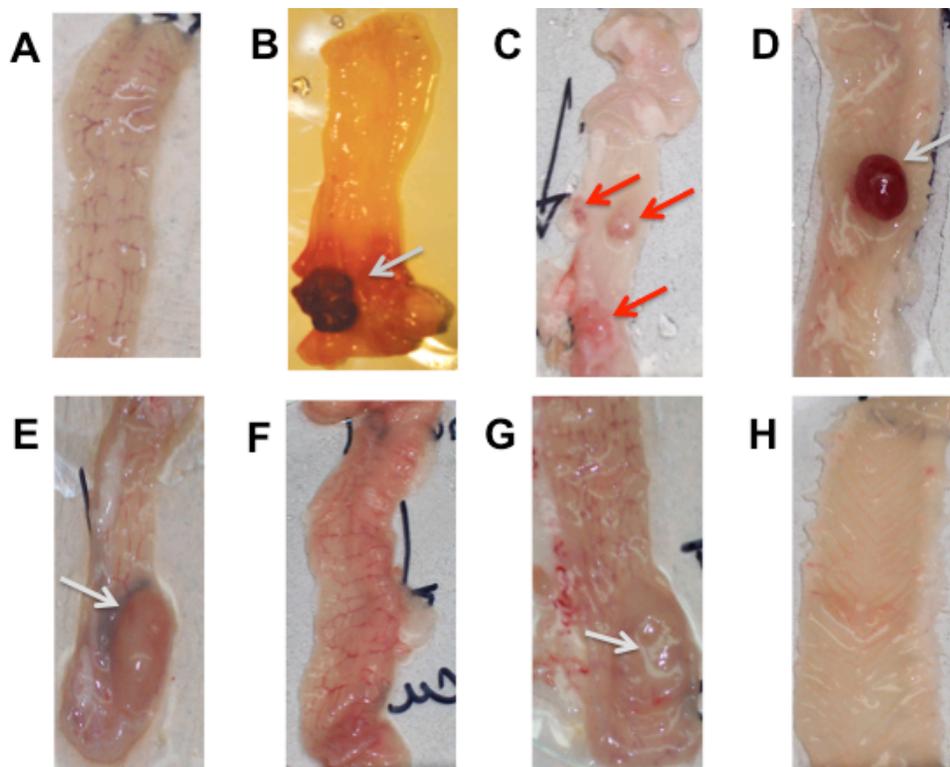


FIG 48. Lesiones tumorales macroscópicas en el colon de ratas Wistar. Después de la aplicación del carcinógeno (DMH) y de acuerdo con los tratamientos descritos en la **Tabla IX**, se realizó la necropsia y el análisis histopatológico de todos los órganos de cada rata y éstas son imágenes representativas del colon de cada grupo de estudio. **A:** Control Negativo (**G1C**); **B:** DMH (**G2D**); **C:** DMH + células SW480 (**G3DS**); **D:** DMH+SW480+Prot (**G4DSP**); **E:** DMH+SW480+DNase I (**G5DSD**); **F:** DMH+SW480+ Prot+DNase I (**G6DSPD**); **G:** DMH+Prot+DNase I (**G7DPD**); y **H:** células SW480 (**G8S**). Las flechas indican las lesiones tumorales.

RESULTADOS

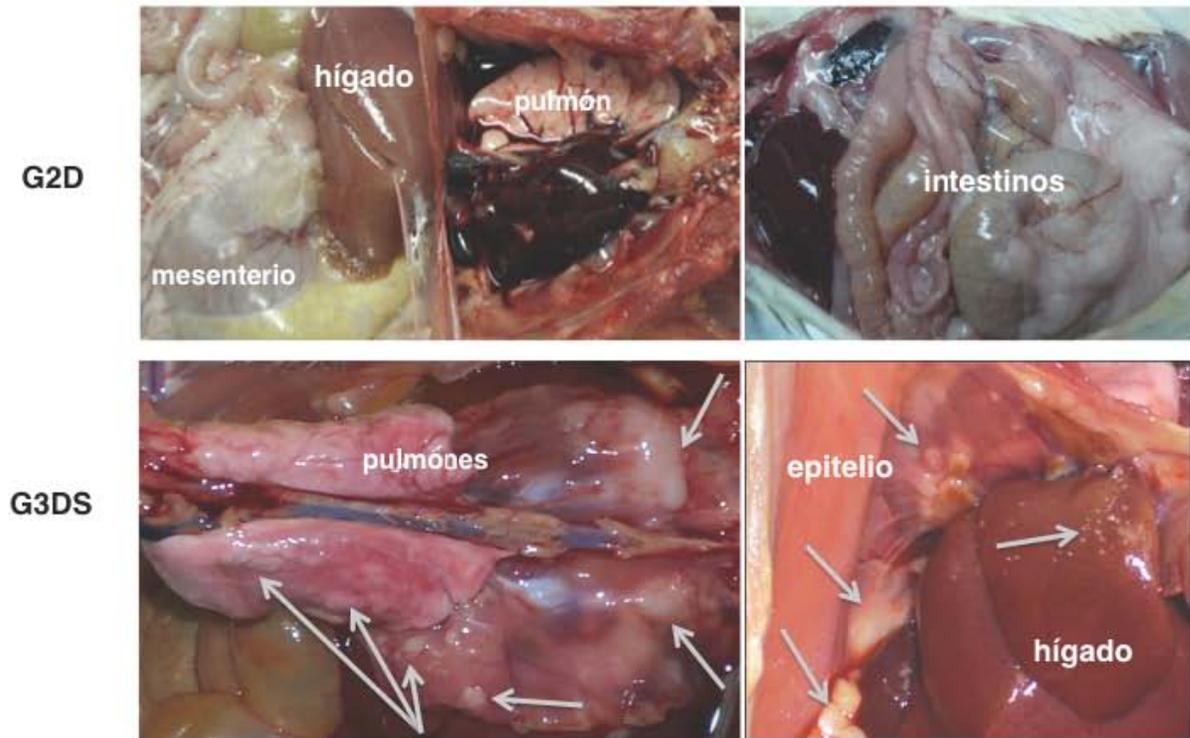


FIG 49. Imágenes de diversos órganos de ratas Wistar con y sin lesiones tumorales macroscópicas. Imágenes representativas de diversos órganos de 2 grupos de estudio; G2D: DMH y G3DS: DMH + células SW480. Las flechas indican las lesiones tumorales.

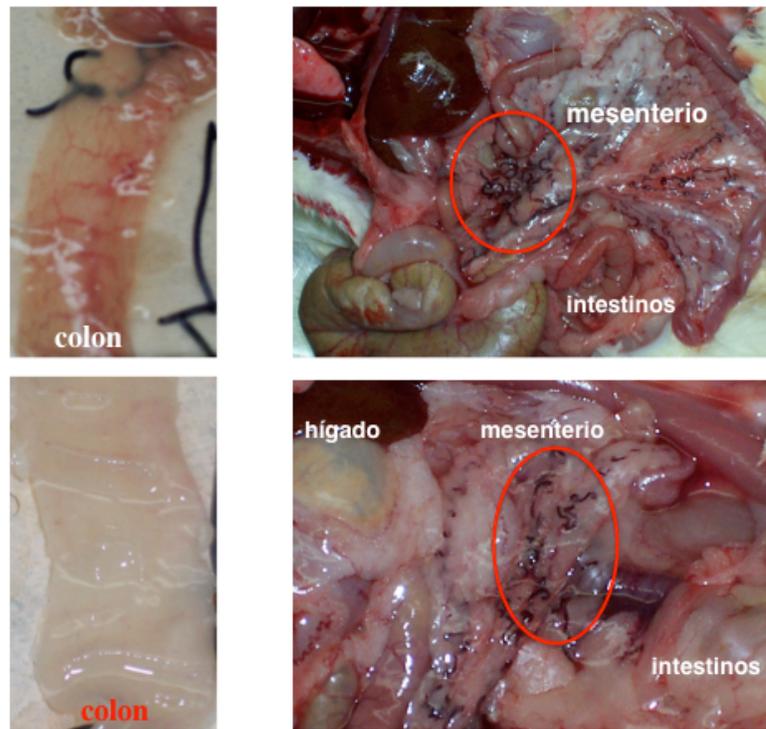


FIG 50. Imágenes de diversos órganos del grupo G6DPD sin lesiones tumorales macroscópicas. Imágenes representativas de diversos órganos, incluyendo el colon, del grupo de estudio **G6DSPD**: DMH +SW480+ Prot+DNAsa I; en donde no se observan lesiones tumorales macroscópicas. Los círculos indican regiones de vascularización abundante en el mesenterio.

Para descartar que los tumores de colon y los de los otros órganos se originaron a partir de células SW480 que se inyectaron en los flancos, otro grupo de ratas (dos animales para cada tiempo) se inocularon en el flanco con la misma cantidad de células SW480 que se inyectaron en el experimento antes descrito. Posteriormente los animales se sacrificaron a los días 1, 2, 3, 7, y 14 después de la inyección; el sitio de inoculación se retiró y se procesó para el análisis histológico. Los resultados mostraron una cantidad decreciente de células viables en los días 1, 2, 3, y 7; en el día 14 no se encontraron células viables (**Fig. 51**). Además, es de destacar que un infiltrado inflamatorio progresivo así como evidencia de apoptosis se observó desde el día 3 (**Fig. 51**). Estos resultados no fueron inesperados, porque las ratas inmunocompetentes rechazan las células humanas; lo cual descarta que los tumores de colon generados por el tratamiento con el DMH más la inoculación de las células humanas malignas SW480, se originaron a partir de células humanas viables como las SW480.

RESULTADOS

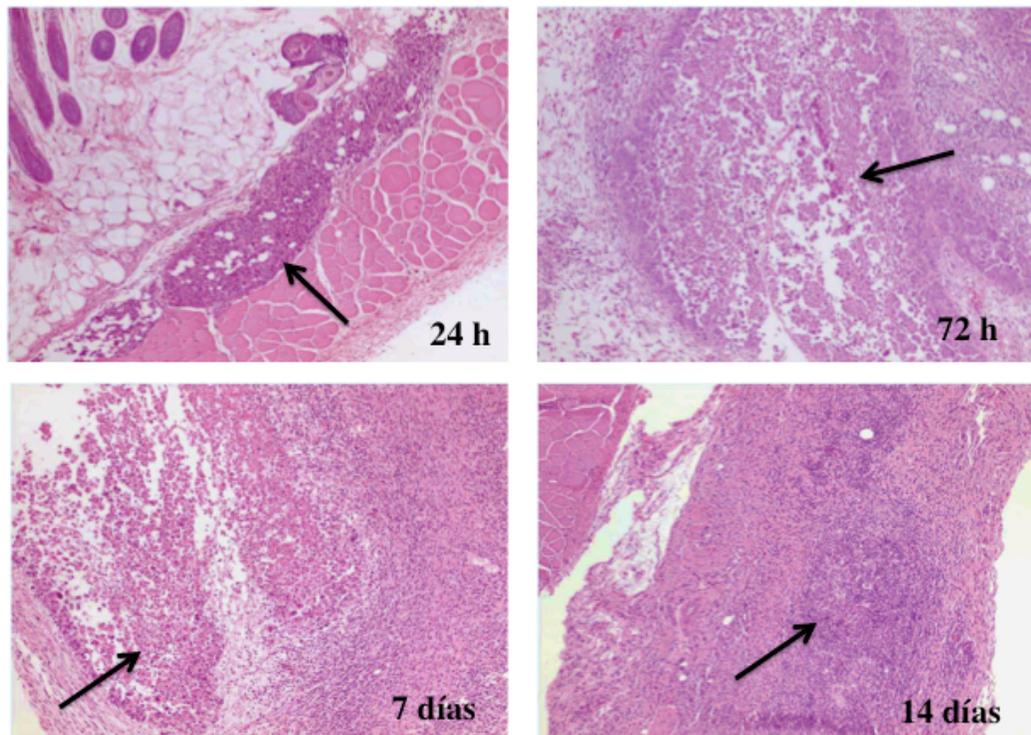


FIG 51. Cortes histológicos del sitio de inoculación de las células SW480. Células tumorales viables se observan a las 24 hrs; a las 72 hrs éstas van disminuyendo; una amplia zona de apoptosis y necrosis central se observan a los 7 días. Y a los 14 días, ya no se observan células viables. Las flechas indican la zona donde se observan las células SW480 inoculadas.

Más aún, para consolidar el resultado anterior y demostrar que la presencia de secuencias humanas en los tumores de colon de rata de los grupos tratados con DMH más la inoculación de la línea celular humana SW480 (G3DS, G4DSP y G5DSD), no eran debido a la contaminación con células humanas, se purificó DNA genómico de un de los tumores de colon de cada grupo de ratas y se amplificó, por PCR, la secuencia repetitiva específica de rata *LINE 1*. Se utilizó como control negativo a la línea celular SW480 y como control positivo DNA genómico de cola de rata. Como se observa en la **Fig. 52**, a excepción del control negativo y el H₂O, todos los tejidos tumorales de colon fueron positivos para *LINE 1*; mostrando la misma intensidad de señal que el control positivo. Lo que demuestra que los tumores de colon generados por el tratamiento con el DMH más la inoculación de las células humanas SW480, son de rata.

RESULTADOS

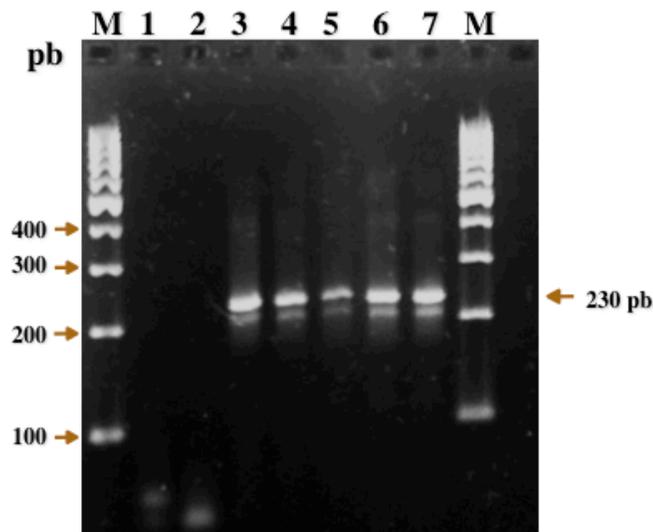


FIG 52. Detección por PCR de la secuencia repetitiva de rata *LINE 1*. Utilizando primers específicos de rata, se analizó la presencia de una secuencia repetitiva de rata (*LINE 1*) en los tumores de colon de rata generados por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y/o por la inoculación de las células humanas (SW480). **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** SW480 (Ctr -); **3:** cola de rata (Ctr +); **4:** tumor de colon de rata, DMH (G2D); **5:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 (G3DS); **6:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 (G3DS); **7:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 + Proteasas + DNAsa I (GDSPD).

De la misma manera que en los ensayos *in vitro* anteriormente descritos, se utilizaron diversas técnicas experimentales para demostrar la transferencia horizontal del DNA humano circulante a los tumores de colon de rata:

a) Se realizó por **PCR**, el análisis de otros genes importantes en el proceso de carcinogénesis de colon y que se encuentran en la línea celular humana SW480. Este análisis se realizó en el mismo tejido tumoral de colon de rata que fueron positivos para la secuencia repetitiva específica de rata *LINE 1*. Se amplificaron diversos genes humanos; como *K-ras^{val12}* mutado, *Rab30*, *CADH8* y la secuencia repetitiva humana *YD6-Alu*. Como se observa en las **Figs. 53** y **54**, sólo en aquellos grupos de animales en los que además del DMH se les inoculó la línea celular SW480, como en el caso del grupo G3DS, hay señal positiva; mientras que en los grupos en los que no se inoculó SW480, como en G2D, no se detectó señal.

RESULTADOS

Es de destacar que no fuimos capaces de detectar cualquiera de estas secuencias humanas en el tumor de la rata del grupo G6DSPD que recibió tratamiento con DNasa I + Proteasas; ya que aunque se inocularon con la línea celular humana SW480, no se observó señal positiva para la presencia de los genes humanos *K-ras^{val12}* mutado y *CADH8* (Fig. 53). Sin embargo, si se detectó señal positiva para la presencia del gen *Rab30* (Fig. 54).

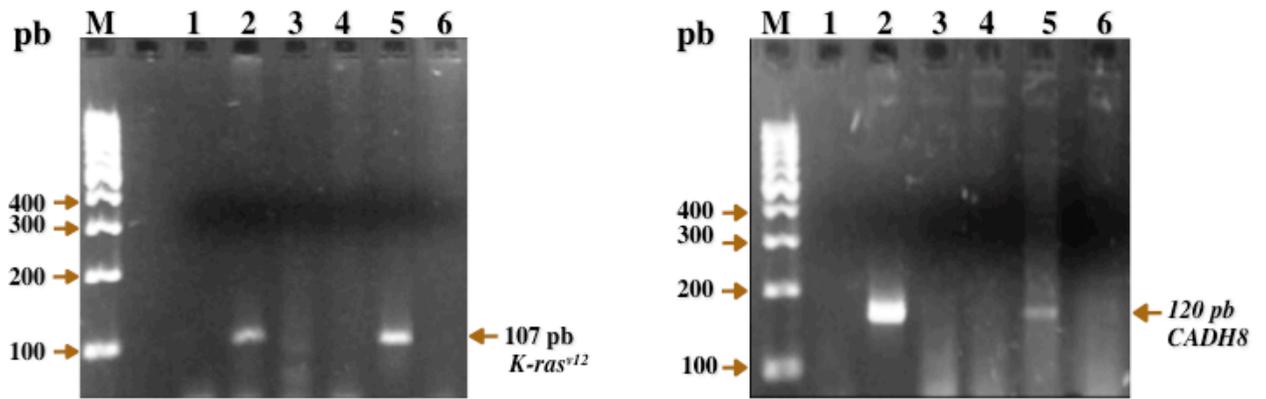


FIG 53. Detección por PCR de los genes humanos *K-ras^{val12}* mutado y *CADH8*, en tumores de colon de rata. Se analizó la presencia de *K-ras^{val12}* mutado y de *CADH8* humanos en tumores de colon de rata generados por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y/o la inoculación de las células humanas SW480. **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** SW480 (Ctr +); **3:** cola de rata (Ctr -); **4:** tumor de colon de rata, DMH (G2D); **5:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 (G3DS); **6:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 + Proteasas + DNasa I (G6DSPD).

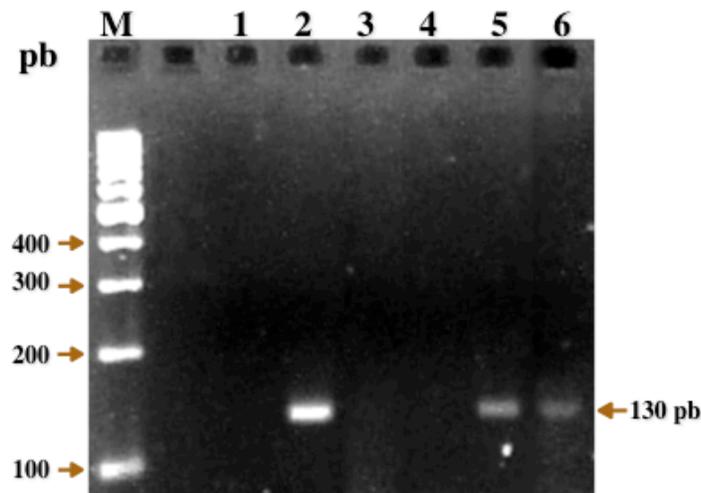


FIG 54. Detección por PCR del gen humano *RAB30*. Se analizó la presencia del gen humano *RAB30* en los tumores de colon de rata generados por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y/ó la inoculación de las células humanas SW480. **M:** marcador de peso; **1:** H₂O; **2:** SW480 (Ctr +); **3:** cola de rata (Ctr -); **4:** tumor de colon de la rata, DMH (G2D); **5:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 (G3SD); **6:** tumor de colon de rata, DMH + SW480 (G3DS).

Una característica morfológica de un tumor es la heterogeneidad celular (109); es decir, que en un mismo tumor hay variabilidad celular tanto morfológica como funcional, incluso coexisten células normales como tumorales. Por lo que para demostrar que las células tumorales de colon de rata en específico, son las que tienen el DNA humano de la línea celular maligna SW480, éstas se microdissectaron de los cortes del tejido tumoral de cada grupo de estudio, de los mismos tejidos de tumor de colon de rata antes analizados para la secuencia repetitiva de rata *LINE 1* y para los genes humanos; y posteriormente se les extrajo el DNA genómico, para amplificar, por PCR, la secuencia repetitiva humana *YD6-Alu*. Como se observa en la **Fig. 55**, hay señal positiva para la secuencia repetitiva humana *YD6-Alu* en las células tumorales microdissectadas de tumor de colon de rata, de 3 diferentes cortes provenientes del grupo G3DS; lo que demuestra la transferencia de DNA humano a las células tumorales de rata.

RESULTADOS

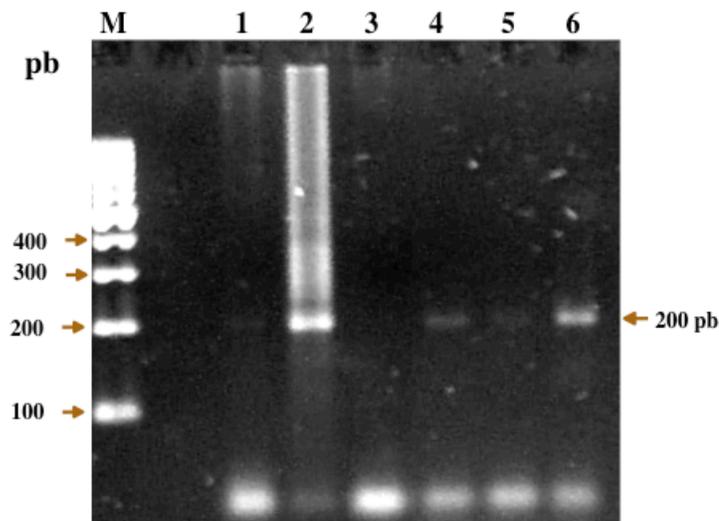


FIG 55. Detección por PCR de la secuencia repetitiva humana *YD6-ALU*, en células tumorales microdisectadas obtenidas a partir de diferentes cortes de un tumor de colon de rata. Se analizó la presencia de la secuencia repetitiva *ALU* en tumores de colon de rata generados por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y/ó por la inoculación de células humanas SW480. **M:** marcador de peso molecular; **1:** H₂O; **2:** SW480 (Ctr +); **3:** cola de rata (Ctr -); **4-6:** células microdisectadas de tumor de colon de rata, de 3 diferentes cortes (G3DS).

b) Por Secuenciación. Como se demostró por PCR, se detectó una señal positiva para varios productos que corresponden a distintas secuencias específicas de genes humanos, en los tumores de colon de cada grupo de ratas; sin embargo, también se observó una señal positiva, para la secuencia repetitiva específica de rata *LINE 1*, en éstos mismos tumores de colon. Nuevamente es importante mencionar que la homología a nivel de genoma entre la rata y el humano es del **99%**; así que para confirmar que las secuencias amplificadas por PCR de los tejidos de tumor de colon de rata corresponden a secuencias humanas, se realizó una secuenciación directa de los productos de PCR que corresponden a los fragmentos de los genes humanos detectados en los mismos tejidos de tumor de colon de rata analizados tanto para la secuencia específica de rata como para las secuencias específicas de humano. En la **Fig. 56** se muestra los Electroferogramas del producto de PCR correspondiente a un fragmento de solamente uno de todos los genes que se analizaron, el gene *RAB30* proveniente de la línea celular humana SW480 (**A**) comparado con el gene *RAB30* proveniente de los tumores de colon de rata del grupo G3DS (**B**). Claramente se observa en el electroferograma **B**, que en la misma posición de los nucleótidos correspondientes a los

RESULTADOS

de rata (indicados con las flechas y letras azúles), también se detectaron los nucleótidos de humano (indicados con letras rojas); es decir, hay una co-existencia de nucleótidos de rata y de humano. Lo que nuevamente sugiere que hubo una transferencia de DNA humano, a los tumores de colon de rata.

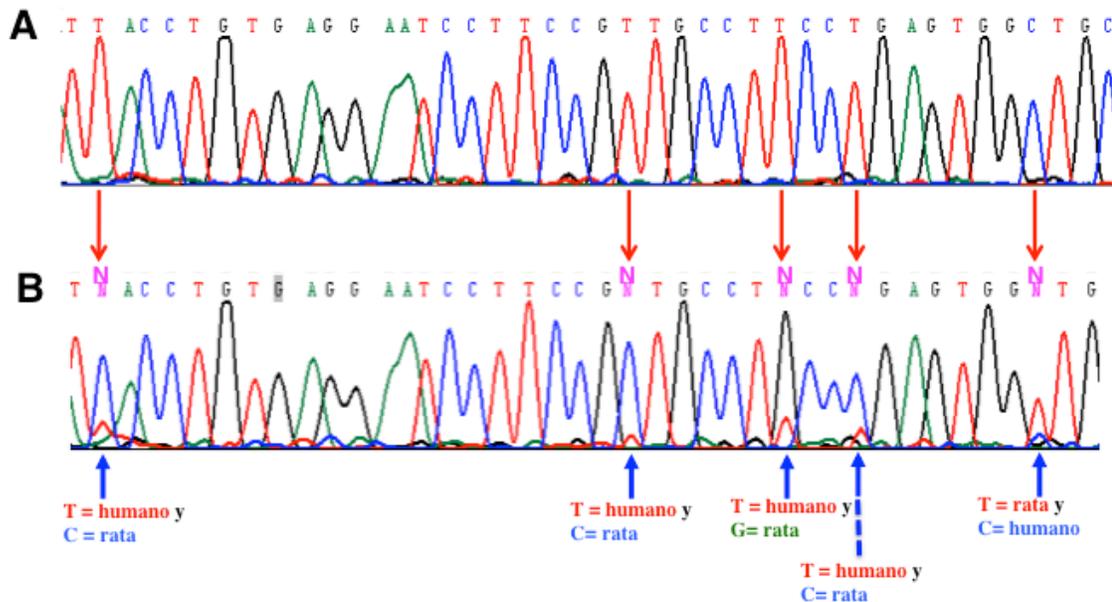


FIG 56. Electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gen *RAB30* proveniente de tumores de colon de rata generados por DMH más SW480. La secuenciación se realizó a partir de un producto de PCR proveniente de DNA genómico de tumores de colon de rata generados por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) más la inoculación de las células humanas SW480 (G3DS). **A:** electroferograma del producto de PCR del gen *RAB30* proveniente de SW480; y **B:** electroferograma del producto de PCR del gen *RAB30* proveniente de tumores de colon de rata del grupo G3DS. Las flechas rojas indican los nucleótidos (en el genoma humano) que difieren con respecto a la secuencia del mismo fragmento del gen *RAB30* pero en el genoma de rata, cuando son comparados. Mientras que las flechas azules indican los nucleótidos del genoma de rata en donde además están presentes los nucleótidos humanos.

Más aún, cuando se comparó el electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gen *RAB30* proveniente de los tumores de colon de rata del grupo G3DS, el cual además de aplicarles el carcinógeno se les inoculó la línea celular humana SW480 (ver **Fig. 57-A**); con el electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gen *RAB30* proveniente del tumor de colon de rata del grupo G6DSPD, el cual además de inyectarles el carcinógeno se les inoculó la línea celular SW480 y se les aplicó el tratamiento enzimático (DNasa I + Proteasas) (ver **Fig. 57-B**); observamos que después del tratamiento enzimático sólo se detectaron nucleótidos de rata (indicados con flechas negras) (**Fig. 57-B**), y los nucleótidos humanos ya no se observan. Estos resultados

RESULTADOS

sugieren que el tratamiento con una mezcla de enzimas (como en los ensayos *in vitro* mostrados anteriormente, **Fig. 30**), eliminaron el DNA circulante humano proveniente de SW480 por lo que no hubo transferencia de DNA circulante humano a los tumores de colon de rata.

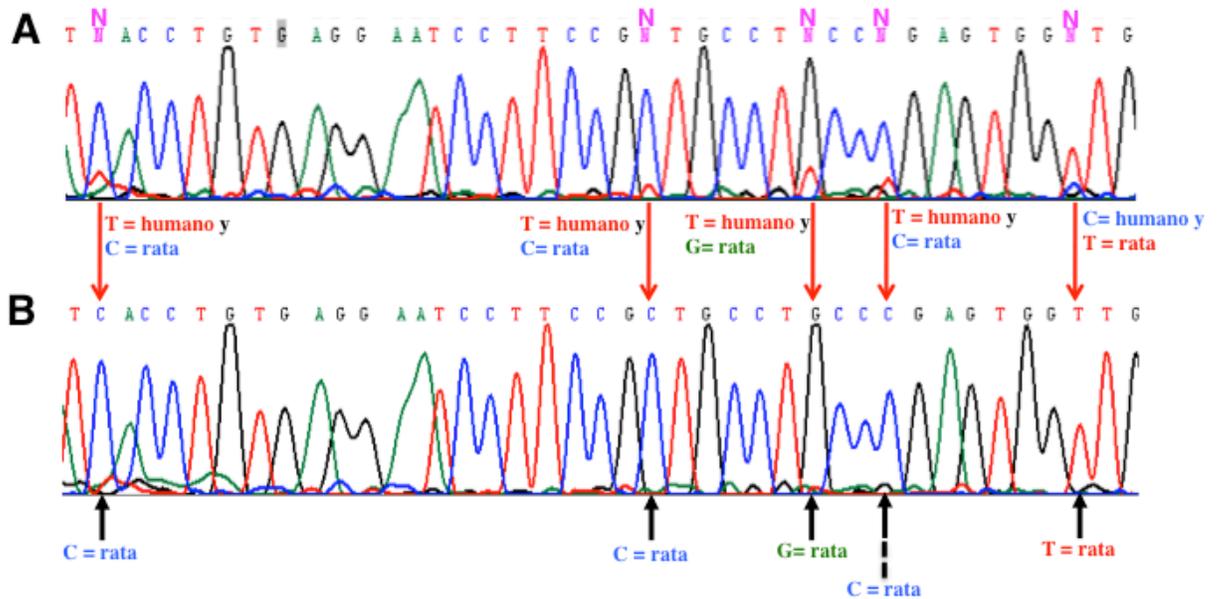


FIG 57. Electroferograma del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gene *RAB30* proveniente de tumores de colon de rata generados por DMH más SW480 y con tratamiento enzimático. La secuenciación se realizó a partir de un producto de PCR proveniente de DNA genómico de tumores de colon de rata generados por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) más la inoculación de las células humanas SW480 (G3DS); y de tumor de colon de rata proveniente del grupo G6DSPD (DMH + SW480 + Proteasas + DNAsa I). **A:** electroferograma del producto de PCR del gene *RAB30* proveniente de un tumor de colon de rata del grupo G3DS; y **B:** electroferograma del producto de PCR del gene *RAB30* proveniente de un tumor de colon de rata del grupo G6DSPD. Las flechas rojas indican los nucleótidos del genoma de rata en donde, además está presente los nucleótidos humanos. Mientras que las flechas azules indican la presencia sólo de los nucleótidos de rata.

c) Se evaluó por **FISH** la presencia de secuencias tanto humana como de rata, en una misma célula proveniente de los tumores de colon de rata de los grupos a los cuales además de aplicarles el carcinógeno se les inoculó la línea celular humana SW480; para demostrar la transferencia de DNA circulante humano a células tumorales de colon de rata así como su participación en la progresión tumoral. Como se demuestra en la **Fig. 58**, en un tejido tumoral de colon de rata proveniente del grupo G2D que sólo fue tratado con el

RESULTADOS

carcinógeno (DMH), no hay señal para las secuencias repetitivas humanas *ALU*, marcadas con rojo; y sólo son positivos para las secuencias repetitivas específicas de rata *LINE 1*. Mientras que en la **Fig. 59**, se observa que las células tumorales provenientes de los tumores de colon de rata del grupo G3DS, el cual además de aplicarles el carcinógeno se les inoculó la línea celular humana SW480, tienen una señal positiva tanto para las secuencias repetitivas de rata como para las de humano; por ello se muestra un color naranja como resultado de la combinación de la marca verde y roja.

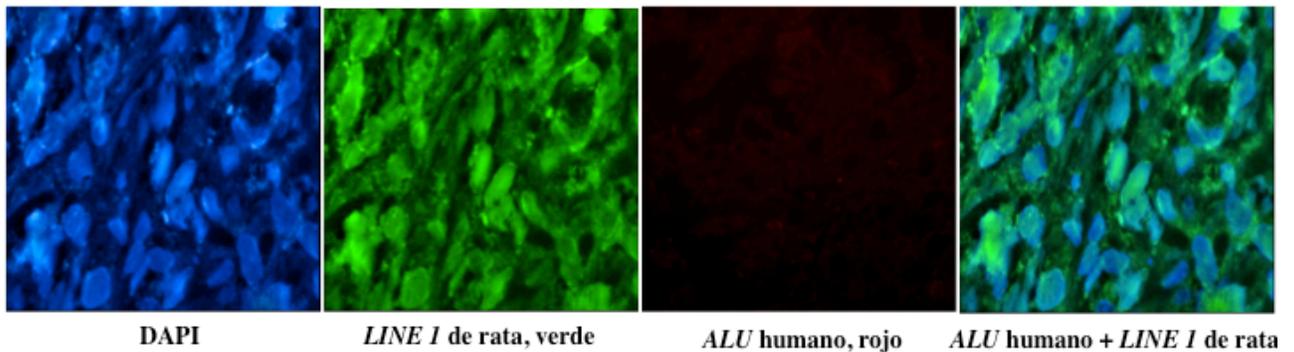


FIG 58. Análisis por FISH de la presencia de la secuencia repetitiva *LINE 1* específica de rata en tejido tumoral de colon de rata. Fotografías representativas de un tumor de colon de una rata tratada sólo con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH). La ausencia de señal roja, representan la falta de secuencias humanas en estas células. La co-incubación con ambas sondas a la derecha confirma la falta de transferencia de DNA humano, ya que no se observa un color naranja que es el resultado de la combinación de verde con rojo (100X).

RESULTADOS

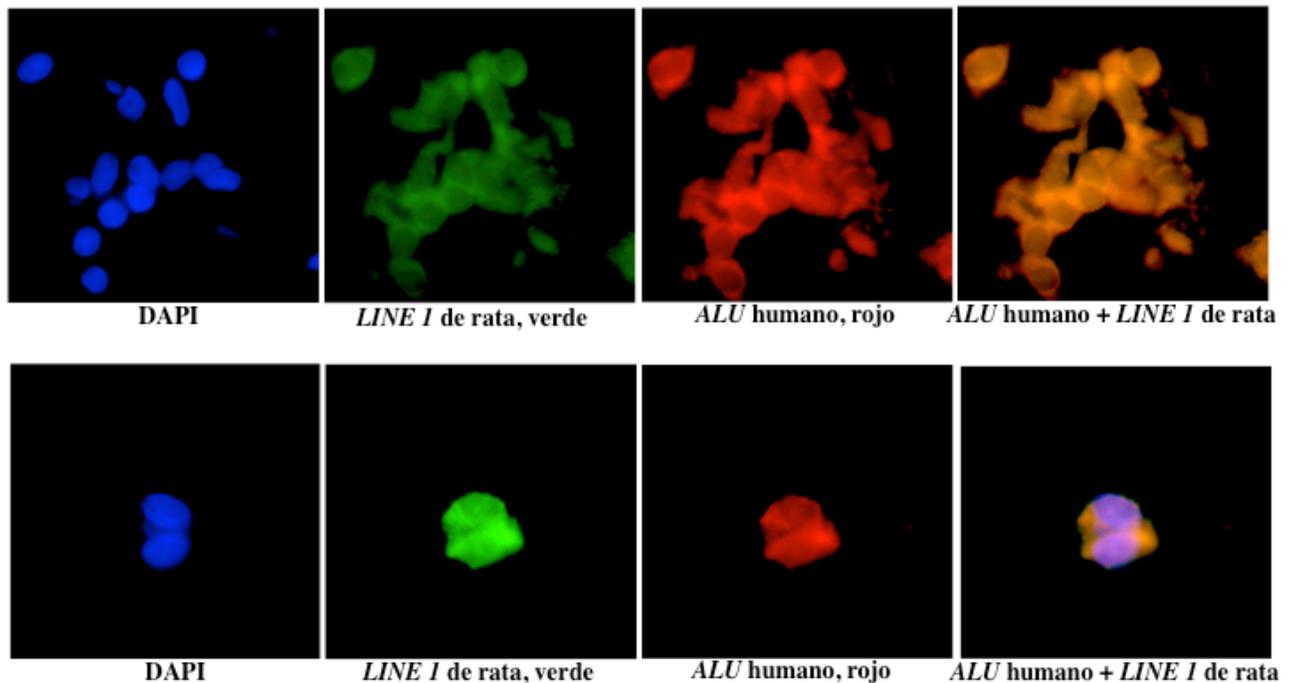


FIG 59. Análisis por FISH de la transferencia de DNA humano a tumores de colon de rata. Fotografías representativas de células tumorales provenientes de colon de rata tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) más la inoculación de células humanas SW480 (grupo G3DS). Para el análisis de FISH, las secuencias repetitivas específicas de rata (*LINE 1*) se marcaron con verde y las secuencias específicas de humano (*YD6-ALU*) con rojo. Las fotos de extrema izquierda, son de los núcleos teñidos con DAPI (azúl); y las fotos de extrema derecha son de las células tumorales de colon de rata del grupo G3DS que son positivas para rata y para humano; por ello muestran un color naranja como resultado de la combinación de verde y rojo. Es decir, hubo transferencia de DNA humano a los tumores de colon de rata (100X).

Estos resultados son muy importantes, porque demuestran nuevamente que el DNA circulante además de transferirse tanto *in vitro* como *in vivo*, es capaz de transformar a células con una alteración genética previa y no a células totalmente normales en un modelo *in vivo*; lo que sitúa al DNA circulante como factor importante en la progresión tumoral.

8. El efecto antitumoral del tratamiento enzimático.

En el modelo *in vivo*, donde se demostró el papel promotor del DNA circulante, se observó que en el grupo G6DSPD (donde además del tratamiento con el carcinógeno y la inoculación de la línea celular SW480 se les aplicó el tratamiento de una mezcla de enzimas); sólo el 16.7% de los animales, desarrolló un tumor en colon y no hubo invasión a otros órganos. Además al analizar la secuencia del producto de PCR correspondiente al

RESULTADOS

fragmento del gene humano *RAB30* detectado en el tumor de colon de rata de éste mismo grupo (G6DSPD) que también fué positivo para la secuencia específica de rata *LINE 1*; mostró que después del tratamiento enzimático sólo se detectaron nucleótidos de rata (**Fig. 57**), y los nucleótidos humanos ya no se observaron. Estos resultados sugieren que el tratamiento con la mezcla enzimática, elimina al DNA circulante humano proveniente de SW480 por lo que no hubo transferencia de DNA humano a los tumores de colon de rata ni a las células de rata “sensibilizadas” con el DMH; por lo tanto no hubo progresión tumoral. Pero, ¿las enzimas tienen algún efecto directamente sobre el tumor?

Para determinar el posible efecto que tienen las enzimas sobre el tumor, se diseñó un ensayo experimental *in vivo* (ver **Fig. 60**), en el que se formaron 4 grupos de ratones atímicos BALB/c con distintos tratamientos enzimáticos (ver **Tabla XII**). El efecto antitumoral del tratamiento enzimático, se evaluó a las 9 semanas después del inicio del mismo. Como se observa en la **Fig. 61**, el crecimiento tumoral fue semejante en los grupos de animales sin tratamiento (**1S**) y en aquellos tratados con solamente Proteasas (**2SP**) o sólo DNAsa I (**3SD**); mientras que en el grupo de animales que fueron tratados con la combinación enzimática de DNAsa I más Proteasas (**4SPD**), el crecimiento tumoral fue menor durante las primeras 4 semanas en comparación con los otros grupos.

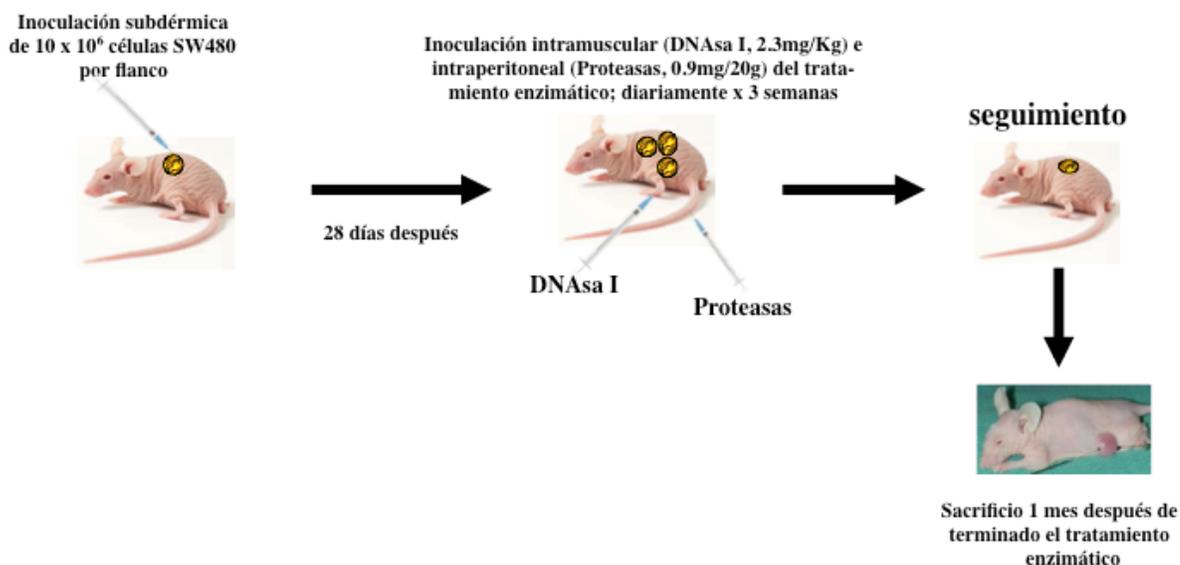


FIG 60. Diseño Experimental para Determinar el Efecto Antitumoral del Tratamiento Enzimático: un Modelo *In Vivo*.

RESULTADOS

TABLA XII. Efecto antitumoral del tratamiento enzimático: un modelo In Vivo. Grupos y Tratamiento.

GRUPOS	# de animales	TRATAMIENTO
1S	12	SW480 (control +)
2SP	12	SW480 + Proteasas
3SD	12	SW480 + DNAsa I
4SPD	12	SW480 + Proteasas + DNAsa I

Pero es de hacer notar que a partir de la semana 5, el crecimiento tumoral del grupo **4SPD** disminuyó drásticamente mientras que los tumores en los otros grupos continuaron creciendo (**1S**, **2SP** y **3SD**) (ver **Fig. 61** y **Fig. 62A-C**). Además, interesantemente cuatro (33%) de los animales del grupo con el tratamiento de la mezcla enzimática, tuvieron respuesta patológica completa (**Fig. 62D**); es decir, hubo una eliminación total del tumor; y los 8 animales restantes mostraron un crecimiento tumoral muy disminuido.

RESULTADOS

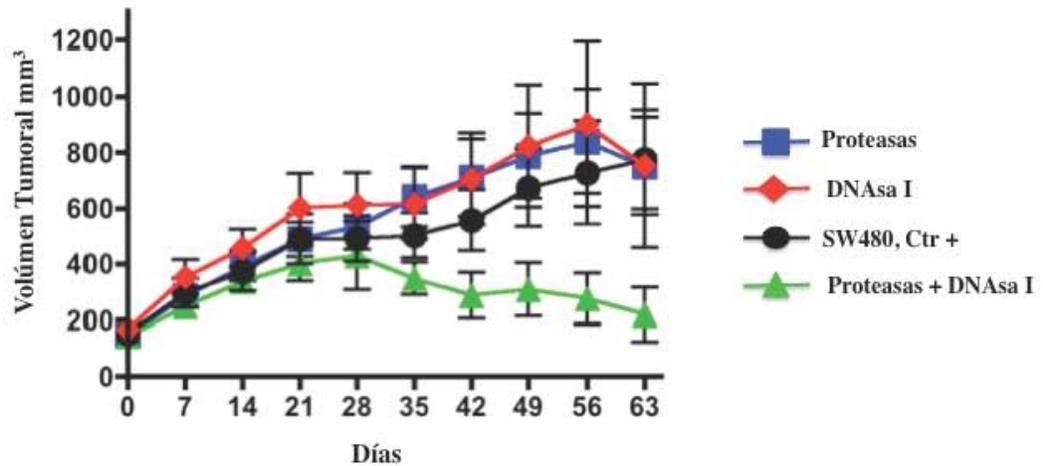


FIG 61. Efecto antitumoral del tratamiento enzimático aplicado en ratones atímicos. En ésta gráfica se muestra el efecto que tiene el tratamiento con una mezcla de enzimas (DNAsa I, tripsina, papaína y quimotripsina), sobre el crecimiento tumoral en ratones atímicos.

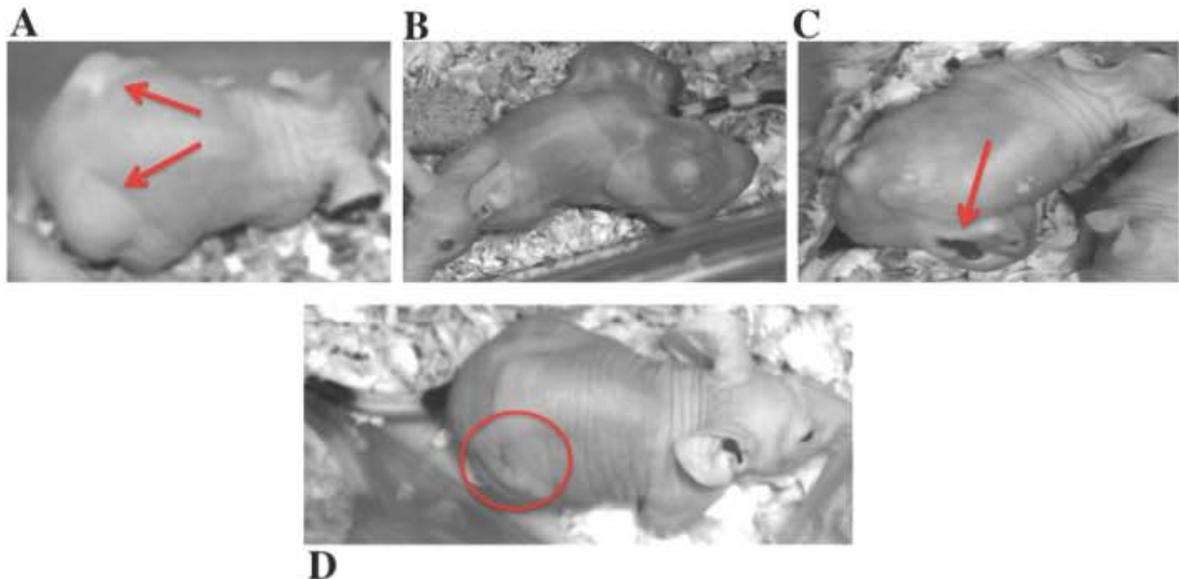


FIG 62. Potencial antitumoral del tratamiento enzimático. A: Grupo control positivo (1S), inoculación de células SW480 parentales. Se muestra el desarrollo tumoral que hubo en 12 de 12 animales inyectados. B: Grupo inoculado con células SW480 parentales más tratados sólo con Proteasas (2SP). El desarrollo tumoral fué en 12 de 12 animales inyectados. C: Grupo inoculado con células SW480 parentales más tratados sólo con DNAsa I (3SD). En 12 de 12 animales inoculados hubo desarrollo tumoral. D: Grupo inoculado con células SW480 parentales más tratados con la combinación enzimática de Proteasas + DNAsa I (4SPD). En 8 de 12 animales hubo un reducido crecimiento tumoral y en los 4 animales restantes, hubo una eliminación total del tumor; como lo muestra el círculo rojo. Las flechas señalan el tumor.

RESULTADOS

Es de hacer notar que no hubo variaciones en el peso de los animales ni anormalidades macroscópicas o histológicas en los órganos evaluados (hígado, riñon pulmón). Sólo se encontró que un tercio de los animales que recibieron proteasas solas o en combinación con DNAsa I, desarrollaron hernia abdominal diagnosticada histológicamente lo cual muy probablemente este en relación al daño local de la pared abdominal inducido por las proteasas. Los resultados sugieren fuertemente que el tratamiento enzimático es un potencial antitumoral en un modelo de cáncer de colon en ratones inmunodeficientes; y que actúa eliminando al DNA circulante. ¿Cual es el mecanismo específico?, es algo que se tiene que discernir en futuros estudios.

DISCUSION

Los resultados de este estudio demuestran que el DNA circulante tiene un significado biológico fundamental en cáncer; ya que no sólo tiene una alta actividad transformante y una capacidad tumorigénica; sino además, induce la progresión tumoral en un modelo *in vivo*; por lo que los datos obtenidos en el presente trabajo, establecen claramente que la progresión del cáncer también se produce por la transferencia horizontal del DNA circulante en este modelo.

Al analizar los resultados obtenidos con respecto a la purificación y caracterización de los ácidos nucleicos circulantes presentes tanto en el sobrenadante celular como en el suero de individuos sanos y con cáncer, se observó que coinciden con lo reportado en la literatura; así: *i*) el DNA circulante que se purificó en los dos diferentes medios celulares (sobrenadante y suero), contiene fragmentos de diferentes tamaños (65); *ii*) la concentración de ácidos nucleicos circulantes (DNA y RNA), difiere bastante si provienen de un sujeto sano (1 a 10ng/ml) o de un sujeto con cáncer (28 n/ml a 5µg/ml) (25); *iii*) hay una mayor concentración de RNA que de DNA en el suero humano, independientemente de si proviene de un sujeto sano o de uno con cáncer (25). En cuanto a los ácidos nucleicos circulantes presentes en el sobrenadante de líneas celulares, nosotros observamos que hay una mayor concentración de DNA circulante que de RNA circulante; caso contrario a lo detectado en suero humano. Aunque cabe mencionar, que el análisis se realizó en un número reducido de líneas celulares y en dos tipos de neoplasias; por lo que sería conveniente aumentar el número de líneas celulares a estudiar para determinar si ésta observación se repite en otras células. En la literatura, aparentemente no hay publicaciones en referencia a este punto; creemos que es debido a que la mayoría de los estudios se han enfocado en el análisis de los ácidos nucleicos circulantes presentes en los fluidos corporales humanos para su posterior aplicación clínica.

Nosotros demostramos, que los ácidos nucleicos circulantes (DNA y RNA) que se purificaron a partir de los dos diferentes medios celulares (sobrenadante y suero) y utilizando la metodología clásica de fenol-cloroformo con modificaciones reportadas por

DISCUSION

Stroun, *et al.* (63), se pueden utilizar para análisis moleculares; como PCR, RT-PCR, Southern blot, Hibridación SNP Array y Secuenciación (con resultados excelentes); donde la pureza de los ácidos nucleicos es fundamental para que los resultados sean totalmente reproducibles. Con el propósito de tener un mayor rendimiento y una nula contaminación por solventes y proteínas en la extracción de los ácidos nucleicos circulantes, nosotros probamos otras técnicas de purificación, como las perlas magnéticas y las columnas de sílica; pero los resultados no fueron los esperados, básicamente porque el rendimiento fue nulo.

En la literatura no hay un consenso con respecto a la forma en la que los ácidos nucleicos circulantes viajan en los diferentes medios extracelulares; ya sea desnudos; unidos a proteínas del plasma/suero; unidos a la superficie celular; empaquetados en vesículas con membrana (como exosomas, micropartículas y cuerpos apoptóticos); asociados a histonas en forma de nucleosomas (como mono u oligonucleosomas); ó en un complejo de lipoproteínas que incluyen polimerasas de DNA y RNA dependientes de DNA llamado virtosoma (70-73). Nuestros resultados de microscopía electrónica sugieren que los ácidos nucleicos circulantes, no están protegidos por una membrana; parece que algunos se encuentran asociados a macromoléculas, mientras que otras estructuras parecen un arreglo semejante a lo que se observa en los nucleosomas. Nuestras observaciones apoyarían al complejo de lipoproteínas (virtosoma) propuesto por Gahan, *et al.*, (72); sin embargo, se tendrían que realizar otro tipo de técnicas ultraestructurales, para definir que tipo de moléculas están unidas a los ácidos nucleicos circulantes (110). Al hacer una búsqueda bibliográfica profunda, no encontramos publicaciones sobre estudios ultraestructurales del DNA circulante; por lo que nuestros resultados podrían ser un punto de inicio para estudiar los ácidos nucleicos circulantes a nivel ultraestructural.

Con el fin de identificar algunas de las estructuras moleculares asociadas al DNA circulante, se realizaron algunos ensayos enzimáticos con DNAsa I y Proteínasa K; y demostramos que el DNA circulante, en específico, está protegido por un complejo de proteínas que evita su degradación por DNAsas. Lo que nuevamente coincide con lo reportado por Gahan, *et al.*, (72), quienes mencionan que el DNA circulante se encuentra asociado a un complejo de

DISCUSION

lipoproteínas. Hay trabajos en la literatura donde observan que al tratar a nucleosomas de ternera con DNAsa I, proteinasa K ó aminoácidos antes de adicionarlos a linfocitos, se evita la muerte celular de éstos; mientras que cuando se incuban con nucleosomas sin tratar, los linfocitos experimentan muerte celular. Aunque el objetivo del estudio fue demostrar los efectos tóxicos de los nucleosomas, nos muestra indirectamente que están asociados a macromoléculas como proteínas (96).

Para elucidar si el DNA circulante contiene la misma información genética que el DNA genómico de la célula de donde es liberado (SW480), se realizó un análisis del número de copias de DNA. Los resultados mostraron que existe un patrón casi idéntico del número de copias de DNA entre el perfil de copias del DNA circulante y el del DNA genómico de las células SW480. En 2009 Beck *et al.* (111), secuenciaron 50 muestras de suero de sujetos sanos y encontraron que las secuencias presentes en el DNA circulante, están esencialmente reflejadas en el DNA genómico. Aunque éstos autores trabajaron sólo con sujetos sanos, básicamente nuestros resultados nos llevan a la misma conclusión.

Nosotros demostramos por diversas técnicas experimentales (Southern blot, PCR, RT-PCR, FISH, Secuenciación), que el DNA circulante presente tanto en el sobrenadante de líneas celulares malignas como en suero de pacientes con cáncer, tiene la capacidad de transferirse horizontalmente; y se observó tanto en un modelo *in vitro* (con células murinas NIH3T3) como en dos modelos *in vivo* (con ratas Wistar y con ratones atímicos); lo cual confirma lo ya reportado en diversos modelos *in vitro*, desde hace muchos años por Gartler SM en 1959 (88), Szybalski W, *et al.* (89), Anker, *et al.*, (90) y Jachertz D, *et al.*, (91) con tecnología menos avanzada. Pero estudios como los de Holmgren, *et al.*, (112) muestran que la transferencia horizontal de DNA, puede también ocurrir a través de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en un modelo *in vitro*; observación que nosotros también comprobamos pero en un modelo *in vivo* utilizando ratas atímicas a las cuales se les inoculó por vía intravenosa cuerpos apoptóticos de células Hela. Lo cual nos demuestra que la transferencia horizontal de DNA, es un proceso presente en eucariontes independientemente como se encuentre el DNA exógeno (unido a proteínas, empaquetado en vesículas con membrana, etc). El mecanismo por el cual se transfiere el DNA circulante

DISCUSION

a células somáticas de organismos superiores, es algo que hoy en día sigue siendo un tema controversial (1, 3).

Anteriormente se había planteado, que el DNA circulante que es transferido a células de mamíferos puede ser replicado, transcrito y traducido en proteínas (89). Nosotros demostramos claramente que el DNA circulante presente tanto en el sobrenadante de líneas celulares malignas como en suero de pacientes con cáncer, tiene la capacidad de expresarse así como de transformar oncogénicamente tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados apoyan lo reportado por Anker, *et al.* (94), quienes demostraron en un ensayo *in vitro*, que el DNA liberado por las células humanas de carcinoma de colon SW480 tiene una alta actividad transformante. Resultados similares fueron obtenidos por García-Olmo, *et al.*, (95) quienes demostraron la transformación de células murinas NIH3T3, por el plasma de pacientes con cáncer de colon.

Hasta este punto, todos nuestros resultados demuestran claramente que el DNA circulante humano se transfiere horizontalmente a las células murinas, se transcribe y tiene la capacidad de transformarlas; lo que sugiere que las secuencias humanas transferidas fueron las responsables de la transformación; sin embargo, también demostramos que éste DNA circulante, está protegido por un complejo de proteínas que evita su degradación por DNAsas u otro tipo de nucleasas, pero que también podrían participar directamente en el proceso de transformación. Por lo que realizamos ensayos con el objetivo de mostrar que el DNA circulante por sí mismo es capaz de inducir transformación celular y tiene potencial tumorigénico. En uno de los ensayos demostramos que las células NIH3T3 expuestas al sobrenadante procesado de SW480 y tratado previamente con DNAsa I ó con Proteinasa K, son claramente tumorigénicas; pero cuando éstas células murinas son expuestas al sobrenadante procesado de SW480 y tratado previamente con DNAsa I y Proteinasa K de manera simultánea, no son tumorigénicas. Es decir, que la disminución del DNA circulante con DNAsa I y con Proteinasa K, elimina su capacidad transformante. En el segundo ensayo se llevó a cabo una transfección activa, en la línea celular murina NIH3T3 utilizando Lipofectamina como vehículo para transferir DNA circulante purificado del sobrenadante de la línea celular SW480. Los resultados mostraron claramente que el DNA

DISCUSION

circulante purificado, tiene capacidad transformante y es altamente tumorigénico. En conclusión demostramos por dos estrategias experimentales distintas, que el DNA circulante por sí mismo es capaz de inducir transformación celular y tiene potencial tumorigénico; es decir, que es muy probable que las secuencias humanas transferidas sean las responsables de la transformación y de la tumorigenicidad. Nuestros resultados son similares a los reportados por Ehnfors, *et al.* (113). Ellos observaron que el DNA de células apoptóticas derivadas de células de fibrosarcoma de rata que expresan H-ras^{v12}, c-myc humano y SV40LT (el cual fue co-transfectado); es transferido y transforma a fibroblastos primarios y células endoteliales de rata *in vitro*; demostrando que el DNA apoptótico que contiene oncogenes, puede transformar a las células receptoras. Cabe hacer mención, que a diferencia de éstos autores, nosotros purificamos el DNA circulante sin manipular; es decir, sin co-transfecciones con genes exógenos, y lo transfectamos para determinar directamente su papel en la transformación celular.

En resumen, todos los resultados antes descritos demuestran que el DNA circulante es capaz de transformar *in vitro* a la línea celular murina NIH3T3. Estas células se caracterizan porque carecen de la expresión del gen p16, originando su inmortalidad (95); lo que las hace un excelente modelo para los ensayos de transformación celular. Sin embargo, como esta línea celular ya tiene un hit genético, esto no nos permite determinar el papel funcional del DNA circulante en el proceso de transformación celular. Así que se diseñó un ensayo experimental para investigar el papel del DNA circulante en la transformación celular; ya sea como un iniciador o como un promotor de la carcinogénesis ó transformación. Expusimos células primarias normales al sobrenadante de las células SW480 durante 45 días. Demostramos la transferencia de DNA circulante de SW480 (el gen mutado *K-ras^{val12}*) a las células normales, pero éstas no fueron tumorigénicas. Estos resultados sugieren fuertemente que para que el DNA circulante transforme se requiere que las células a las que se introduce, tenga *a priori* un hit genético; por lo que el DNA circulante actúa como un promotor y no como un iniciador de la transformación. Para confirmar éstos resultados, se diseñó otro experimento en un modelo *in vivo*, utilizando ratas inmunodeficientes a las que previo a la inoculación de cuerpos apoptóticos (los cuales contienen una alta cantidad de ácidos nucleicos), se inmunosuprimieron con una mezcla de medicamentos que son utilizados para tratamientos de quimioterapia. A pesar que el

DISCUSION

sistema immune de los animal se mermó con los medicamentos, el DNA circulante no fue capaz de transformar aunque si hubo transferencia del mismo en diversos órganos. Lo que confirma los resultados que se obtuvieron *in vitro*, el DNA circulante no es un iniciador de la carcinogenesis, sino un promotor. Ya anteriormente Stroun, *et al.* (97), propusieron a nivel teórico, que un mecanismo adicional de generación de metástasis o recurrencias tumorales lo constituye la *transfección pasiva* de células distantes al tumor por parte de los ácidos nucleicos circulantes. Posteriormente, García-Olmo, *et al.*, (98) sugirieron que las metástasis pueden desarrollarse como resultado de la transfección de células susceptibles en órganos blanco distantes con oncogenes dominantes que circulan en el plasma, los cuales se derivan de un tumor primario; a este fenómeno lo denominaron "genometástasis". Años después, los mismos autores demostraron que el plasma de pacientes con cáncer es capaz de transformar oncogénicamente células susceptibles, apoyando la hipótesis propuesta anteriormente de genometástasis (95). Sin embargo, hoy en día no hay reporte de modelos experimentales donde se demuestre el papel promotor del DNA circulante.

Nosotros diseñamos un modelo experimental *in vivo* para demostrar el papel promotor del DNA circulante (Fig. 45). A ratas inmunocompetentes previamente tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (como un iniciador de la carcinogénesis) (106), cuyo blanco es colon; fueron inoculadas en el dorso con células humanas SW480 como fuente de DNA circulante, para demostrar si la presencia de éste aumenta la frecuencia de tumores en colon (Fig 63).

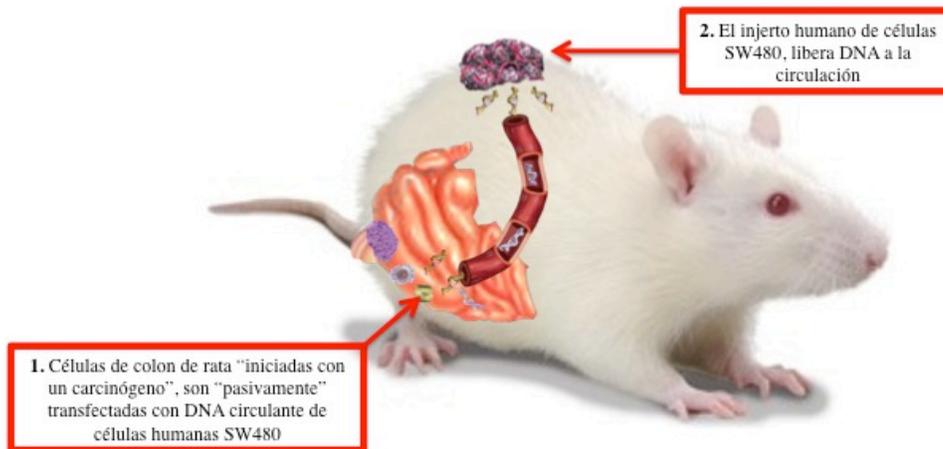


FIG 63. Modelo experimental *in vitro* e *in vivo*, donde se muestra que el DNA circulante derivado de las células tumorales SW480 trasplantadas en el flanco de la rata (2), es capaz de transferirse horizontalmente a las células del colon de la rata, que fue previamente (1) sometida a tratamiento con un agente carcinógeno (1,2-dimetilhidracina, DMH).

A otro grupo de ratas además de aplicarles el carcinógeno y las células SW480, fueron sometidas a un tratamiento con una mezcla de enzimas (DNasa I, Tripsina, Quimotripsina y Papaína, -107-), con el objetivo de disminuir o eliminar el DNA circulante liberado por las células SW480 (Fig 64).

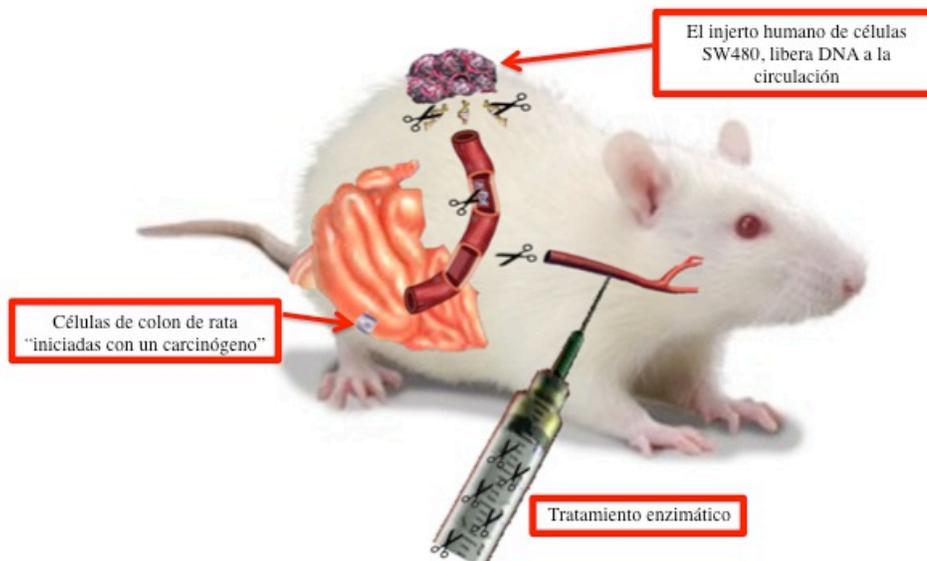


FIG 64. El tratamiento con una mezcla de enzimas (DNasa I, tripsina, papaina y quimotripsina), que se aplicó a ratas Wistar, disminuye el DNA circulante y evita la progresión tumoral.

DISCUSION

Demostramos claramente que en aquellos animales que además de ser tratados con el carcinógeno y fueron inoculados con las células SW480; generaron un mayor número de tumores en colon, éstos tuvieron un crecimiento mayor y hubo una progresión tumoral a otros tejidos a diferencia del grupo de animales que sólo fueron tratados con el carcinógeno ó el grupo que sólo fue inoculado con las células humanas SW480. Es decir, demostramos que el DNA circulante induce la progresión tumoral. Interesantemente también observamos que el grupo de animales que además del carcinógeno y de las células SW480, fue tratado con la mezcla de enzimas no hubo progresión tumoral y sólo en un individuo hubo un tumor en colon. Es decir, el tratamiento con DNAsas y Proteasas, impide la progresión tumoral; debido a que disminuye o elimina el DNA circulante liberado por las células SW480, por lo que ya no hay transferencia de éste a las células tumorales ó “sensibilizadas o iniciadas” de colon ó a células tumorales de otros tejidos.

Nuestros datos proporcionan dos fuertes evidencias de que la progresión tumoral también se produce a través de la transferencia horizontal de DNA circulante oncogénico:

- i)* Demostramos, por diversas técnicas (PCR, Secuenciación y FISH), que secuencias humanas (*K-ras* mutado, *RAB30* y secuencias repetitivas *ALU*) se encuentran sólo en las células tumorales de las ratas inyectadas con las células humanas SW480; y no en las células tumorales de las ratas que únicamente fueron tratadas con el carcinógeno.
- ii)* demostramos una menor frecuencia de formación de tumores en las ratas que fueron tratadas con el tratamiento enzimático; debido a la disminución de los niveles del DNA circulante derivado de las células SW480, que a su vez reduce o evita la transfección "pasiva" de dicho DNA a las células epiteliales de colon de rata.

Los resultados que obtuvimos con respecto al tratamiento enzimático, fueron muy interesantes; ya que observamos tanto en un modelo *in vitro* como *in vivo* que la aplicación simultánea de la DNAsa I y de las Proteasas (Tripsina, Quimotripsina y Papaína), disminuye en el medio extracelular la presencia de el DNA circulante; por lo tanto elimina

DISCUSION

su capacidad de transferencia y su actividad transformante. Pero, ¿las enzimas tienen algún efecto directamente sobre el tumor?. Para determinar el posible efecto que tienen las enzimas sobre el tumor, se diseñó un ensayo experimental *in vivo* (**Fig. 60**). A ratones inmunodeficientes, previamente inoculados con células humanas de cáncer de colon SW480 en los flancos para generar tumores, fueron tratados con una mezcla de enzimas (DNAsa I, Tripsina, Quimotripsina y Papaína), durante 3 semanas.

Nuestros resultados mostraron, que el crecimiento tumoral del grupo de animales que fueron tratados con la mezcla de las 4 enzimas, disminuyó drásticamente en el 67% de los animales y hubo una eliminación total del tumor en el 33% restante; mientras que el crecimiento de los tumores en los otros grupos fue continuo (tumor más proteasas; tumor más DNAsa I y tumor sin tratamiento). Los resultados sugieren fuertemente que el tratamiento enzimático tiene un potente efecto antitumoral y que actúa eliminando al DNA circulante.

Hay diversos trabajos que apoyan nuestros resultados. Por ejemplo, se ha demostrado que la DNAsa I es capaz de disminuir el tamaño de nódulos linfáticos en un modelo de ratones con leucemia linfática espontánea (**114**); o es capaz de inhibir la formación de tumores o metástasis en modelos murinos (**115-116**). También se ha demostrado que las células tumorales disminuyen su proliferación al ser expuestas a DNAsa I (**117**). Los resultados reportados por Taper, *et al.*, (**118**), sugieren la posibilidad de emplear la DNAsa I para el control del cáncer de próstata humano, ya que el uso de ésta enzima es capaz de reactivar a las nucleasas intracelulares e incrementar la muerte celular. Otros autores (**119**) demostraron que la DNAsa I es capaz de evitar el crecimiento tumoral y prevenir la metástasis cuando se aplica en dosis bajas, en un modelo de ratones C57/B1/6J con cáncer de pulmón. El tratamiento con DNAsa I inhibe eficientemente el crecimiento metastásico y resulta en una regresión significativa del tumor primario. Con respecto a las proteasas, gran parte de los estudios en cáncer donde se han emplea estas enzimas, es en modelos animales; y la mayoría de ellos coinciden en que esta terapia es capaz de inhibir el crecimiento tumoral utilizando mezclas de enzimas. Esto se ha evidenciado no sólo en tumores de origen animal (melanoma **-120-121-**, cáncer de pulmón de Lewis **-122-**), sino también en

DISCUSION

tumores generados a partir de células humanas e inoculados en animales inmunocomprometidos (cáncer de mama –123- y cáncer de páncreas –124-). También se ha demostrado que hay una reducción significativa en la formación de metástasis a partir de los tumores primarios, además de prolongar la sobrevivencia de los animales tratados en comparación con el grupo control (120-121). Cabe resaltar, que en los experimentos llevados a cabo con células humanas de cáncer de mama implantados en animales inmunocomprometidos, se demostró que las proteasas dosificadas sistemáticamente, confieren ciertos cambios moleculares y biológicos en la superficie de las células cancerosas. Entre dichos cambios están la reducción en la expresión de moléculas de adhesión CD44 y CD54, de p53 y de c-erbB-2 (122-123).

El único estudio clínico reportado en el cual se evaluó el papel de la terapia enzimática adicional a la quimioterapia convencional en pacientes con mieloma múltiple, fue el trabajo de Sakalova *et al.*, (125); ellos observaron una respuesta significativa del 60% en aquellos pacientes que recibieron la terapia enzimática complementaria, comparado con el 30% de aquellos pacientes que únicamente recibieron la quimioterapia estándar.

Cabe hacer notar que a diferencia de nuestros resultados, todos éstos reportes donde se ha usado a la DNasa I ó a las Proteasas como antitumorales, se han utilizado de forma separada; es decir, o se utiliza la DNasa I o a las Proteasas. No hay reportes donde se utilicen a la mezcla de las 4 enzimas como tratamiento antitumoral. Sin embargo, queda una pregunta muy importante sobre el tratamiento enzimático ¿Cual es el mecanismo específico por el cual actúan sobre el tumor?, es algo que se tiene que investigar en futuros estudios.

Finalmente, es importante mencionar que la propagación de las células cancerosas de un tumor primario a sitios distantes del cuerpo, es la responsable de la morbilidad y mortalidad de la mayoría de los pacientes con cáncer (126). A pesar de los considerables esfuerzos en el campo de la investigación, la diseminación y la formación de tumores secundarios en sitios anatómicamente distantes al tumor primario, sigue siendo poco conocida. Hoy en día, la metástasis es el proceso o mecanismo que se ha propuesto para

DISCUSION

explicar la progresión maligna; desde una lesión temprana a la propagación sistémica hasta el crecimiento metastásico. Lo que parece ser generalmente aceptado, es que las células cancerosas abandonan el tumor primario, se diseminan y colonizan órganos distantes para formar metástasis sólidas, un proceso que ocurre a través de una serie de pasos secuenciales que incluyen la invasión de tejidos adyacentes, la intravasación el transporte a través del sistema circulatorio, detención en un sitio secundario, la extravasación y el crecimiento en un órgano secundario (127). En base a la complejidad del proceso metastásico, parece poco probable que todas las células cancerosas sean capaces de completar con éxito, todas las etapas necesarias para formar metástasis clínicamente relevantes. Entonces, aunque se sugiere que varias etapas del proceso metastásico contribuyen a una metástasis ineficiente, nuestra falta de conocimiento de este proceso sugiere que conocemos sólo algunos de los puntos clave. Esto es debido a la gran complejidad de la cascada metastásica, que abarca no sólo la biología de la célula tumoral, sino también el resto del organismo en el que reside. Por ello, se han propuesto varios modelos y mecanismos de progresión metastásica en un intento de explicar las complejidades biológicas de la metástasis: **1)** Compartimiento transitoria; **2)** Modelo de fusión; **3)** Modelo de oncogénesis temprana; **4)** Modelo de predisposición genética; **5)** Modelo de progresión, y **6)** Modelo de transferencia de genes (128) .

El modelo de metástasis más comúnmente aceptado en los últimos 30 años, es el Modelo de Progresión (129); este modelo sugiere que una serie de eventos mutacionales se producen tanto en las subpoblaciones del tumor primario como en las células diseminadas, lo que da como resultado una pequeña fracción de células que adquieren un potencial metastásico completo.

Sin embargo, Stroun, *et al.* (97) propusieron que un mecanismo adicional de generación de metástasis a distancia o recurrencias regionales lo constituye la transformación de células distantes al tumor, por la *transfección pasiva* o también llamado *transección* de ácidos nucleicos circulantes. Más aún, en 1980 Klein BY (130), propuso una etapa hipotética en la ruta de la tumorigénesis que puede ser común en muchos de los eventos tumorigénicos que tienen lugar *in vivo*. Según esta hipótesis, porciones de DNA de células tumorales

DISCUSION

moribundas, pueden escapar a la degradación enzimática y "transfectar" otras células que, en condiciones adecuadas, pueden transformarse. Ambas propuestas, están relacionadas con la adquisición de la capacidad metastásica o progresión tumoral, a través de la transferencia horizontal de genes. Finalmente, nosotros demostramos que el DNA circulante es un factor fundamental en el Modelo de Transferencia Horizontal de Genes, ya que induce la progresión tumoral a través de este mecanismo.

CONCLUSIONES

- I.** Demostramos, en un modelo *in vivo*, que el DNA circulante es capaz de favorecer la progresión tumoral, ya que aumenta el número de células tumorales previamente iniciadas mediante un carcinógeno y no a las células totalmente normales.
- II.** Demostramos tanto *in vitro* como *in vivo*, que el tratamiento enzimático con DNAsa I y Proteasas, elimina la capacidad transformante del DNA circulante e impide la progresión tumoral en un modelo *in vivo*. Además, el tratamiento sistémico con éstas enzimas tiene un efecto antitumoral en un modelo de cáncer de colon en ratones inmunodeficientes.
- III.** Demostramos que el DNA circulante presente en el suero humano y en el sobrenadante de la línea celular SW480, se encuentra asociado a macromoléculas como proteínas, ya que para eliminarlo del suero o del sobrenadante se requiere del uso concomitante de DNAsas y Proteasas.
- IV.** Nuestros resultados confirmaron las observaciones anteriormente reportadas en la literatura, sobre la capacidad del DNA circulante para transferirse, para expresarse, para inducir transformación celular *in vitro* y la tumorigénesis *in vivo*; así como que el número de copias de genes del DNA circulante es casi semejante al del DNA genómico.
- V.** Demostramos que los ácidos nucleicos circulantes (DNA y RNA) que se purificaron a partir de suero humano y de sobrenadante de líneas celulares humanas, se pueden utilizar para análisis moleculares; como PCR, RT-PCR, Southern blot, Hibridación SNP Array y Secuenciación.

REFERENCIAS

1. Mittra I., Kumar NN and Kumar MP. 2012. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host?. *J. Biosci.* **37**(2): 301-312.
2. Mandel P and Metais, P. 1948. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R. Acad. Sci. Paris.* **142**: 241-243.
3. Peters D and Pretorius PJ. 2011. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—a new paradigm in genetic behaviour. *Clin. Chim. Acta.* **412**(11-12): 806-811.
4. Stroun M, Anker P, Maurice PA and Gahan PB. 1977. Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int. Rev. Cytol.* **51**: 1-48.
5. Anker P, Stroun M. and Maurice P. 1976. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Res.* **36**: 2832-2839.
6. Anker P and Stroun M 1977. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by frog auricles. *Arch. Sci. Geneve* **30**: 263-278.
7. Russell JL and Golub ES. 1978. Leukemia in AKR mice: a defined suppressor cell population expressing membrane-associated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 6211-6214.
8. Rykova EY, Laktionov PP and Vlassov VV. 2010. Circulating nucleic acids in health and disease; in *extracellular nucleic acids: nucleic acids and molecular biology* (eds) Y Kikuchi and E Rykova (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag) 25: 93-128.
9. Swarup V and Rajeswari MR. 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* **581**: 795-799.
10. Holdenrieder S and Stieber P. 2009. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **46**: 1-24.
11. Zeerleder S, Zwart B, Wuillemin Wa, *et al.* 2003. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit. Care Med.* **31**:1947-1951.
12. Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, *et al.* 2004. Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. *Clin. Chem.* **50**:213-216.
13. Chiu TW, Young R, Chan LY, *et al.* 2006. Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **44**:13-17.
14. Butt AN, Shalchi Z, Hamaoui K, *et al.* 2006. Circulating nucleic acids and diabetic complications. *Ann. NY Acad. Sci.* **1075**:258-270.
15. Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, *et al.* 2006. Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc. Dis.* **21**:32-37.
16. Chang CP, Chia RH, Wu TL, *et al.* 2003. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta.* **327**:95-101.
17. Barada FA Jr, Suratt PM, Davis JS, *et al.* 1980. Free plasma DNA in patients with pulmonary embolism. *South. Med. J.* **73**:345-346.
18. Zhong XY, Gebhardt S, Hillermann R, *et al.* 2005. Circulatory nucleosome levels are significantly increased in early and late-onset preeclampsia. *Prenat. Diagn.* **25**:700-703.
19. Lui YY, Woo KS, Wang AY, *et al.* 2003. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin. Chem.* **49**: 495-496.
20. Wu TL, Zhang D, Chia JH, *et al.* 2002. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin. Chim. Acta.* **321**:77-87.
21. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, *et al.* 2004. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleos. Nucleot. & Nucleic Acids.* **23**(6-7):879-883.

22. Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Rykova EY, *et al.* 2005. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clin. Chem.* **51**(7):1317-1319.
23. Beck J, Urnovitz HB, Riggert J, *et al.* 2009. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin. Chem.* **55**(4):730-738.
24. Beck J, Urnovitz HB, Mitchell WM, *et al.* 2010. Next generation sequencing of serum circulating nucleic acids from patients with invasive ductal breast cancer reveals differences to healthy and nonmalignant controls. *Mol. Cancer Res.* **8**(3):335-342.
25. Fleischhacker M. 2006. Biology of circulating mRNA: still more questions than answers?. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1075**:40-49.
26. Board RE, Williams VS, Knight L, *et al.* 2008. Isolation and extraction of circulation tumor DNA from patients with small cell lung cancer. *Ann. NY Acad. Sci.* **1137**:98-107.
27. Goldshtein H, Hausmann MJ and Douvdevani A. 2009. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann. Clin. Biochem.* **46**:488-494.
28. van der Vaart M and Pretorius PJ. 2010. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated?. *Clin. Biochem.* **43**:26-36.
29. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, *et al.* 2011. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin. Chim. Acta.* **412**:2085-2088.
30. Kuroi K, Tanaka C and Toi M. 1999. Plasma nucleosome levels in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer.* **6**:361-364.
31. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmuller H., *et al.* 2001. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int. J. Cancer.* **95**:114-120.
32. Sozzi G, Conte D, Mariani L., *et al.* 2001. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* **61**:4675-4678.
33. Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Treviño-Cuevas H., *et al.* 2003. Circulating nucleosomes and response to chemotherapy: an *in vitro*, *in vivo* and clinical study on cervical cancer patients. *Int. J. Cancer.* **104**:663-668.
34. Leon SA, Shapiro DM, Sklaroff MJ, *et al.* 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**: 646-650.
35. Kremer A, Wilkowski R, Holdenrieder S, *et al.* 2005. Nucleosomes in pancreatic cancer patients during radiochemotherapy. *Tumour Biol.* **26**:44-49.
36. Langlois S, Brock JA, Wilson RD, *et al.* 2013. Current status in non-invasive prenatal detection of down síndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J. Obstet Gynaecol. Can.* **35**(2): 177-181.
37. Hahn S, Rusterholz C, Hosli I, *et al.* 2011. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta.* **32**:S17-20.
38. Swarup V and Rajeswari MR. 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* **581**(5):795-799.
39. Glasuddin AS, Jhuma KA and Haq AM. 2008. Applications of free circulating nucleic acids in clinical medicine: recent advances. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.* **34**(1): 26-32.
40. Pisetsky DS and Ullal AJ. 2010. The blood nucleosome in the pathogenesis of SLE. *Autoimmun. Rev.* **10**(1):35-37.
41. Kohler C, Barekati Z, Radpour R, *et al.* 2011. Cell-free DNA in the circulation as a potential cancer biomarker. *Anticancer Res.* **31**(8):2623-2628.
42. Schwarzenbach H, Hoon DS and Pantel K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* **11**:426-437.
43. González-Masiá JA, García OD and García OC. 2013. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Onco. Targets Ther.* **6**:819-832.

44. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, *et al.* 2013. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: Clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat. Rev.* **S0305-7372**(13)00207-7.
45. Fleischhacker M and Schmidt B. 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta.* **1775**(1):181-232.
46. Jung K, Fleischhacker M and Rabien A. 2010. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin. Chim. Acta.* **411**(21-22):1611-1624.
47. Sorenson G, Porter D, Berth R, *et al.* 1997. Detection of mutated KRAS2 sequences in plasma from patients with pancreatic carcinoma in comparison with the Ca19-9 assay. *J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **18**:66.
48. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, *et al.* 1994. Point mutations of the N-ras in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. *Brit J Haemat.* **86**:774-779.
49. Yamada T, Nakumori S, Ohzato H, *et al.* 1998. Circulating DNA K-ras mutation in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* **4**:1527-1532.
50. Silva J, González R, Domínguez G, *et al.* 1999. TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* **24**:160-161.
51. Ling E, Fich A, Man M, *et al.* 2000. Detection of tumor mutant APC DNA in plasma of patients with sporadic colorectal cancer. *In Vivo.* **14**:543-546.
52. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, *et al.* 2012. Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol.* **7**(9):1369-1381.
53. Shaw JA, Page K, Blighe K, *et al.* 2012. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res.* **22**:220-231.
54. Summers KE, Goff LK, Wilson AG, *et al.* 2001. *J. Clin. Oncol.* **19**(2):420-424.
55. Chen X, Stroun M, Magnenat J, *et al.* 1996. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Med.* **2**:1033-1035.
56. Nawroz H, Koch W, Anker P, *et al.* 1996. Microsatellite alterations in plasma DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med.* **2**:1035-1037.
57. Wong IH, Lo YM, Zhang J, *et al.* 1999. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* **59**:71-73.
58. Sánchez-Céspedes M, Esteller M, Wu M, *et al.* 2000. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patient. *Cancer Res.* **60**:892-895.
59. Esteller M, Wu M, Nawroz-Danish L, *et al.* 1999. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* **59**(1):67-70.
60. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, *et al.* 2000. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science.* **287**(5469):2017-2019.
61. Yu M. 2012. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA.* **23**(5):329-332.
62. Beljanski M, Bourgarel P and Beljanski M. 1981. Correlation between *in vitro* DNA synthesis, DNA strand separation and *in vivo* multiplication of cancer cells. *Expl Cell Biol.* **49**:220-231.
63. Stroun M, Anker P, Lyautey J, *et al.* 1987. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **23**:707-712.
64. Stroun M, Anker P, Maurice P, *et al.* 1989. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patient. *Oncology.* **46**:318-322.
65. Jarh S, Hentze H, Englisch S, *et al.* 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61**:1659-1665.

66. Dennin RH. 1979. DNA of free and complexed origin in human plasma: concentration and length distribution. *Klin. Wochenschr.* **57**:451-456.
67. Giacomini MB, Ruben GC, Iczkowski G, *et al.* 1998. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* **17**:89-97.
68. Raptis L and Menard HA. 1980. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **66**:1391-1399.
69. Fournie G, Courtin J and Laval F. 1995. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death: investigation in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumour. *Cancer Lett.* **2**:221-227.
70. Anker P, Mulcahy H, Chen X, *et al.* 1999. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer and Metastasis Rev.* **18**:65-73.
71. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmuller H, *et al.* 2001. Circulating nucleosomes in serum. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **945**:93-102.
72. Gahan PB and Stroun M. 2010. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular Messenger. *Cell Biochem. Funct.* **28**(7):529-538.
73. Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova A, *et al.* 2012. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**(Suppl. 1):S141-S153.
74. Stroun M, Maurice P, Vasiokhin V, *et al.* 2000. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann New Y Acad Sci.* **906**:161-168.
75. Lo, Y.M. 1999. Quantitative and temporal correlation between circulating cell free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* **59**:5452-5455.
76. Caone RB, Pai SI, Koch W, *et al.* 2000. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* **6**: 4171-4175.
77. Dueñas-González A, Carrillo A, Fresnedo L, *et al.* 1999. DNA del virus del papiloma humano en el plasma de pacientes con carcinoma cervicouterino: un marcador potencial de enfermedad residual. *Rev. Inst. Nac. Cancerol.* **45**:203-207.
78. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, *et al.* 2001. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer.* **1**:2.
79. Boddy J, Gal S, Malone P, *et al.* 2005. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin. Cancer Res.* **11**:1394-1399.
80. van der Vaart M and Pretorius PJ. 2008. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann NY Acad Sci.* **1137**:18-26.
81. Gahan PB, Anker P and Stroun M. 2008. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA. *Ann. NY Acad. Sci.* **1137**:7-17.
82. Stroun M and Anker P. 1972. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem. J.* **128**:100.
83. Anker P, Stroun M, Maurice M, *et al.* 1975. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* **35**:2375-2382,
84. Roger J, Boldt D, Kornfeld S. *et al.* 1972. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* **60**: 1685-1689.
85. Roger J and Kerstiens J. 1981. Capping of DNA on phytohemagglutinin stimulated human lymphoblast. *J. Immunol.* **126**: 703-705.
86. Ochman H, Lawrence JG and Groisman EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* **405**:299-304.

87. Stegemann S and Bock R. 2009. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*. **324**:649-651.
88. Gartler SM. 1959. Cellular uptake of deoxyribonucleic acids by human tissue culture cells. *Nature*. **184**:1505-1506.
89. Szybalski W, Szybalska EH and Ragni G. 1962. Genetic studies with human cell lines. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **7**:75-89.
90. Anker P and Stroun M. 1972. Bacterial ribonucleic acid in the frog brain after a bacterial peritoneal infection. *Science*. **178**:621-623.
91. Jachertz D, Stroun M, Anker P, et al. 1979. Transfer of genetic information from T to B lymphocytes in the course of an immune response. *Biomedicine*. **31**:153-154.
92. Sparow S, Jones M, Billington, S, et al. 1986. The *in vivo* malignant transformation of mouse fibroblasts in the presence of human tumour xenografts. *Br. J. Cancer*. **53**:793-797.
93. Gupta V, Rajaraman S, Gadson P, et al. 1987. Primary transfection as a mechanism for transformation of host cells by human tumor cells implanted in nude mice. *Cancer Res*. **47**:5194-5201.
94. Anker P, Lyautey J, Lefort F, et al. 1994. Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying a K-ras mutation. *C.R. Acad Sci. III*. **317**:869-874.
95. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, et al. 2010. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res*. **70**:560-567.
96. Decker P, Wolburg H and Rammensee HG. 2003. Nucleosomes induce lymphocyte necrosis. *Eur. J. Immunol.* **33**:1978-1987.
97. Stroun M, Anker P, Gahan P, et al. 1971. *Agrobacterium tumefaciens* ribonucleic acids synthesis in tomato cells and crown gall induction. *J. Bacteriol.* **106**(2):634-639.
98. García-Olmo D, García-Olmo C, Ontanon J, et al. 1999. Tumor ADN circulating in the plasma might play a role in metastasis: the hypothesis of the genomestasis. *Histopathol.* **4**:1159-1164.
99. Miyakis S, Sourvinos G and Spandidos DA. 1998. Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **251**:609-612.
100. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
101. Serwer P. 1978. A technique for observing extended DNA in negatively stained specimens: observation of bacteriophage T7 capsid-DNA complexes. *J. Ultrastru. Res.* **65**:112-118.
102. Raptis L and Vultur A. 2001. Neoplastic transformation assays. *Methods Mol. Biol.* **165**:151-64.
103. Sambrook J and Russell D. *Molecular cloning a laboratory manual*. 3^a edition. 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
104. Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, et al. 2003. Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **315**:122-128.
105. Szeles A, Bajalica-Lagercrantz S, Lindblom A, et al. 1996. Mapping of a new MAP kinase activated protein kinase gene (3PK) to human chromosome band 3p21.2 and ordering of 3PK and two cosmid markers in the 3p22-p21 tumour-suppressor region by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res.* **4**:310-313.
106. Perse M and Cerar A. 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**:473964.

107. Wald M, Olejar T, Pouckova P and Zadinova M. 1998. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57B16 mice with the Lewis lung carcinoma. *Pharmacol. Lett.* **63**:PL237-243.
108. Soares MB, Schon E and Efstratiadis A. 1985. Rat LINE1: the origin and evolution of a family of long interspersed middle repetitive DNA elements. *J. Mol. Evol.* **22**:117-133.
109. Chekhun VF, Sherban SD and Savtsova ZD. 2013. Tumor cell heterogeneity. *Exp. Oncol.* **35**(3):154-162.
110. Hajibagheri MAN. 1999. Electron microscopy and protocols. *Methods in Molecular Biology*. Edit. Humana Press Inc. **117**.
111. Beck J, Urnovitz HB, Riggert J, *et al.* 2009. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin. Chem.* **55**:730-738.
112. Holmgren L, Szeles A, Rajnavoigyl E, *et al.* 1999. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* **93**(11):3956-3963.
113. Ehnfors J, Kost-Alimova M, Luna PN, *et al.* 2009. Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells *in vivo*. *Cell Death and Differentiation.* **16**:749-757.
114. Salganik RI, Martynova, RP, *et al.* 1967. Effect of deoxyribonuclease on the course of lymphatic in AKR mice. *Nature.* **214**:100-102.
115. Sugihara S, Yamamoto T, *et al.* 1993. Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice. *Br J Cancer.* **67**:66-70.
116. Tokita K, Sugihara S, *et al.* 1995. Effects of serine protease and deoxyribonuclease on intravascular tumor cell arrest in rat blood-borne lung metastasis. *Invasion Metastasis.* **15**:46-59.
117. Alcázar-Leyva S, Cerón E, Masso F, *et al.* 2009. Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation. *Med Sci Monit.* **15**(2): CR51-55.
118. Taper HS, Jamison JM, *et al.* 2001. In vivo reactivation of DNases in implanted human prostate tumors after administration of a vitamin C/K(3) combination. *J Histochem Cytochem.* **49**:109-20.
119. Shklyayeva OA, Mironova NL, *et al.* 2008. Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I. *Dokl. Biophys Mol Biol.* **420**:108-111.
120. Wald M, Zavadova E, *et al.* 1998. Polyzyme preparation wobe-mugus inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Life Sci.* **63**: PL43-48.
121. Wald M, Olejar T, *et al.* 2001. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57B16 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol.* **47**(suppl): S16-22.
122. 36. Wald M, Olejar T, *et al.* 1998. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57B16 mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sci.* **63**(17): PL237-43.
123. Wald M, Sebková V, *et al.* 2001. Proteinases reduces formation of metastases and increase survival time in C57B16 mice with lung carcinoma. *Int J Immunother.* **2-4**: 65-73.
124. Wald M, Pouckova P, *et al.* 1999. Wobe-mugus inhibits growth of solid tumors. *Eur J Cancer.* **4(suppl)**: 148.
125. Sakalová A, Bock PR, *et al.* 2001. Retrospective cohort study of an additive therapy with an oral enzyme preparation in patients with multiple myeloma, *Cancer Chemother Pharmacol.* **47(suppl)**: S38-S44.
126. Liotta LA. 2004. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature.* **430**(7003):973-974.
127. Geiger TR and Peeper DS. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1796**(2):293-308.
128. Hunter KW. 2008. Context-dependent cancer risk. *Nat. Genet.* **38**(8):864-865.

- 129.** Nowell PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. **194**(4260):23-28.
- 130.** Klein BY. 1980. A suggested mechanism for changing tumor cell phenotype: transfection of host cells with DNA sequences of dead tumor cells. *Med. Hypotheses*. **7**(5):645-650.

ANEXO

Material Biológico

1. Líneas celulares:

- a) SW480 de cáncer de colon humano (con una mutación puntual de Gly por Val en el codón 12 del exón 1 del oncogén K-ras, # de cat. CCL-228);
- b) HeLa de cáncer cérvico-uterino humano (línea celular positiva para el VPH tipo 18; # de cat. CCL-2);
- c) NIH/3T3 (fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratón; # de cat. CRL-1658);
- d) Swiss-3T3 (fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratón; # de cat. CCL-92);
Estas 4 líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC);
- e) Caski, Calo, ViBo y ViPa de cáncer cérvico-uterino humano. Líneas celulares obtenidas de biopsias de pacientes del servicio de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología.
- f) BB1, un cultivo primario de fibroblastos de prepucio humano que se obtuvo de la circuncisión del prepucio de un niño recién nacido con el consentimiento por escrito de sus padres y se utilizó en el segundo pasaje.

2. Muestras humanas:

- a) sangre periférica y biopsia tumoral de 3 pacientes con diagnóstico histopatológico de Cáncer de Colon Avanzado;
 - b) sangre periférica de 3 donadores sanos, como control.
- ### 3. Ratones atímicos Balb/c (nu/nu), hembras de 5-6 semanas de edad (Harlan Laboratories, # de cat. Hsd:athymic nude-Foxn1^{nu}).
- ### 4. Ratas Wistar hembras de 5-6 semanas de edad (Harlan Laboratories, # de cat. RccHan:WIST).

Reactivos

- 1. DMEM-F12 medio de cultivo para líneas celulares (INVITROGEN # de cat. 12500-054).
- 2. DMEM medio de cultivo para líneas celulares (INVITROGEN # de cat. 12100-046).
- 3. Amortiguador salino de fosfatos (PBS, Sigma-Aldrich, # de cat. P4417).
- 4. Alcohol absoluto (vol/vol) (Sigma-Aldrich, # de cat. E7023)
- 5. Tripsina-EDTA, 0.5% (Gibco, # de cat. 15400054).
- 6. 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (Sigma-Aldrich, # de cat. D161802).
- 7. Penicilina-Streptomicina (Life Technologies, # de cat. 15140148).
- 8. DNAsa I de pancreas de bovino (Sigma-Aldrich, # de cat. D4263).
- 9. Tripsina (Sigma-Aldrich, # de cat. T1426).
- 10. Quimotripsina (Sigma-Aldrich, # de cat. C4129).

11. Papaína (Sigma-Aldrich, # de cat. P4762).
12. Suero Fetal Bovino (Life Technologies, # de cat. 16000044).
13. Solución salina (NaCl) 0.9% (w/v) (Sigma-Aldrich, # de cat. S0817).
14. Isoflorano (Baxter Healthcare Corporation).
15. Azul Tripán (Sigma-Aldrich, # de cat. T8154).
16. Kit de extracción de DNA Arcturus[®]PicoPure[®] (Applied Biosystems by Life Technologies, # de cat. KIT0103).
17. Kit para PCR (Applied Biosystems, # de cat. 4328217).
18. Kit para RT-PCR (Applied Biosystems, # de cat. N8080143)
19. Kit de Secuenciación ABI BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, # de cat. 4337455).
20. Kit de Marcaje de ácidos nucleicos para FISH, FISHBright (Kreatech Diagnostics, # de cat. FLK-003 y FLK-006).
21. 4',6'-Diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, # de cat. H-1200).
22. Membrana de nylon (GE Healthcare Life Sciences, # de cat. RPN119B).
23. Kit de Quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare Life Sciences, # de cat. RPN2105).
24. Hiperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences, # de cat. RPN2104K).
25. Enzima EcoR1 (New England, Biolabs; # de cat. R3101T).
26. Enzima HindIII (New England, Biolabs; # de cat. R3104S).
27. Agarosa (Life Technologies, # de cat. 16550100).
28. Agar noble (Sigma-Aldrich, # de cat. A5431).
29. DNA Cot humano (Roche Applied Science, # de cat. 11581074001).
30. Kit de DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science, # de cat. 11745816910).
31. Digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science, # de cat. 11573179910).
32. Lipofectamina (Life Technologies, # de cat. 15338-100).
33. Proteínasa K (Life Technologies, # de cat. 25530015).
34. DNA de esperma de salmon (Life Technologies, # de cat. 15632011).
35. Dodecil sulfato de sodio (Life Technologies, # de cat. 15525017).
36. Fenol (Sigma-Aldrich, # de cat. P4557).
37. Cloroformo (Sigma-Aldrich, # de cat. C7559).
38. Isopropanol (Sigma-Aldrich, # de cat. I9516).
39. PicoGreen (Life Technologies, # de cat. P7581).
40. Glicógeno (Life Technologies, # de cat. 10814010).
41. Acetato de Amonio (Sigma-Aldrich, # de cat. A1542).
42. Kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen, # de cat. 52904).
43. DNA Oligonucleótidos (Life Technologies, Invitrogen Custom DNA Oligos).
44. Geneticina (Life Technologies, # de cat. 10131019).
45. Kit para cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Sigma-Aldrich, # de cat. B6916).
46. Acrilamida (Sigma-Aldrich, # de cat. A3553).
47. *N,N'*-Methylenebis(acrylamida) (Sigma-Aldrich, # de cat. M7279).

48. *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamina, TEMED (Sigma-Aldrich, # de cat. T9281).
49. Persulfato de amonio (Sigma-Aldrich, # de cat. A3678).
50. Arreglo para análisis de copias para DNA (500K Affymetrix).
51. Hematoxilina (Sigma-Aldrich, # de cat. H3136).
52. Eosina (Sigma-Aldrich, # de cat. 861006).
53. NP40 (Sigma-Aldrich, # de cat. 74385).
54. 4', 6-diamidino-2-phenylindol –DAPI- (Vector Laboratorios, # de cat. H-1500).
55. Kit de accesorios para FISH (Dako, # de cat. K5799).
56. Xilol (Sigma-Aldrich, # de cat. 534056).
57. Cisplatino, *-cis*-Diamminoplatinum(II) dichlorido (Sigma-Aldrich, # de cat. 479306).
58. Kit NEBlot (New England, Biolabs; # de cat. N1500S).
59. pEGFP-1 (Clontech, # de cat. 632468)

Equipo

1. Sistema de anestecia con unidad de vaporizador (E-Z Anesthesia, # de cat. 7000).
2. Sistema de Eutanasia para pequeñas especies (E-Z Euthanex, # de cat. E-20018)
3. Centrifuga clínica (Sorvall-Heraeus. Biofuge Primo R, # de cat. 75005441)
4. Campana de flujo laminar (Nuair, # de cat. NU-425-400).
5. Balanza analítica (Sartorius, # de cat. CPA3245).
6. Contador de células (Bio-rad, # de cat. TC20).
7. Sistema de Microdisector PALM Laser-MicroBeam (Carl Zeiss Microscopy, Germany).
8. Termociclador 2400 (Applied Biosystems).
15. Cámara de hibridación (Life Technologies, # de cat. 762000-001).
16. Microscopio de Fluorescencia Zeiss Axioplan (Carl Zeiss) con interfase y sistema CytoVision (Applied Imaging).
17. Microscopio óptico con contraste de fases (Carl Zeiss).
18. Microscopio invertido CK2 (Olimpus).
19. Incubadora de CO₂ (ThermoForma).
20. Sistema de Ultrafiltración (Amicon, modelo 8010).
21. Dispositivo de vacío (Speed vacuum Vacufuge Plus, Eppendorf).
22. Ultracongelador -80°C (Revco).
23. Congelador -20°C (Revco).
24. Refrigerador 4°C (Nieto)
25. Tanque de N₂ líquido (Thermo Scientific, # de cat. TY509X4).
26. Vernier eléctrico (Electronic Calipers, # de cat. 799A-6/150).
27. Micro PET-CT (Albira ARS, Oncovision).
28. Secuenciador (ABI Prism3100 Genetic, Applied Biosystems).
29. Horno de Hibridación (Labolan, # de cat. 360036).

30. Microcentrífuga (Sorvall-Heraeus, Fresco).
31. Cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad, # de cat. 165-8005)
32. Cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad, # de cat. 170-4486 y 170-4489)

Consumibles

1. Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml (Axygen, # de cat. MCT-150-A).
2. Tubos para microcentrífuga de 2 ml (Axygen, # de cat. MCT-200-A).
3. Tubos cónicos de 50 ml (Corning, # de cat. 430829).
4. Tubos cónicos de 15 ml (Corning, # de cat. 430053).
5. Cajas de cultivo de 175 cm² (Corning, # de cat. 3298).
6. Cajas de cultivo de 75 cm² (Corning, # de cat. 430725).
7. Jeringas con aguja de 30G (BD # de cat. 326709) ó de 25G (BD # de cat. 305903).
8. Filtros con poro de 0.45- μ m (Sartorius, # de cat. 16555).
9. Membranas con poro de 40kDa (Amicon).
10. Crioviales (Corning, # de cat. 430658).
11. Cajas de 6 pozos para cultivo (Corning, # de cat. 3335).
12. Cajas de 12 pozos para cultivo (Corning, # de cat. 3336).
13. Cajas de 24 pozos para cultivo (Corning, # de cat. 3337).
14. Caja de cultivo de 25cm² (Corning, # de cat. 3055).
15. Tubos para colecta de sangre (Vacutainer, Becton Dickinson, # de cat. 368162).
16. Cajas Petri para cultivo (Corning, # de cat. 3296).

Cancer Progression Mediated by Horizontal Gene Transfer in an *In Vivo* Model

Catalina Trejo-Becerril¹, Enrique Pérez-Cárdenas¹, Lucía Taja-Chayeb¹, Philippe Anker², Roberto Herrera-Goepfert³, Luis A. Medina-Velázquez⁴, Alfredo Hidalgo-Miranda⁵, Delia Pérez-Montiel³, Alma Chávez-Blanco¹, Judith Cruz-Velázquez⁶, José Díaz-Chávez¹, Miguel Gaxiola⁷, Alfonso Dueñas-González^{8*}

1 Division of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico, **2** OncoXL, Geneva, Switzerland, **3** Department of Pathology, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico, **4** Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico, **5** Cancer Genomics Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico, **6** Department of Cytogenetics, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico, **7** Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico, **8** Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM/Instituto Nacional de Cancerología, México City, Mexico

Abstract

It is known that cancer progresses by vertical gene transfer, but this paradigm ignores that DNA circulates in higher organisms and that it is biologically active upon its uptake by recipient cells. Here we confirm previous observations on the ability of cell-free DNA to induce *in vitro* cell transformation and tumorigenesis by treating NIH3T3 recipient murine cells with serum of colon cancer patients and supernatant of SW480 human cancer cells. Cell transformation and tumorigenesis of recipient cells did not occur if serum and supernatants were depleted of DNA. It is also demonstrated that horizontal cancer progression mediated by circulating DNA occurs via its uptake by recipient cells in an *in vivo* model where immunocompetent rats subjected to colon carcinogenesis with 1,2-dimethylhydrazine had increased rate of colonic tumors when injected in the dorsum with human SW480 colon carcinoma cells as a source of circulating oncogenic DNA, which could be offset by treating these animals with DNase I and proteases. Though the contribution of biologically active molecules other than DNA for this phenomenon to occur cannot be ruled out, our results support the fact that cancer cells emit into the circulation biologically active DNA to foster tumor progression. Further exploration of the horizontal tumor progression phenomenon mediated by circulating DNA is clearly needed to determine whether its manipulation could have a role in cancer therapy.

Citation: Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Taja-Chayeb L, Anker P, Herrera-Goepfert R, et al. (2012) Cancer Progression Mediated by Horizontal Gene Transfer in an *In Vivo* Model. PLoS ONE 7(12): e52754. doi:10.1371/journal.pone.0052754

Editor: Brian Lichty, McMaster University, Canada

Received: July 23, 2012; **Accepted:** November 20, 2012; **Published:** December 28, 2012

Copyright: © 2012 Trejo-Becerril et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by CONACyT grants 34649-M, 50699 and from PAPIIT UNAM IN214902. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interest. Co-author Phillipe Anker is affiliated to OncoXL. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: alfonso_duenas@yahoo.com

Introduction

The current paradigm in cancer progression is that it occurs via vertical gene transfer; this means that the offspring of initiating tumor cell inherit the genetic and epigenetic alterations leading to tumor progression. This model, however, ignores that horizontal or lateral transfer of DNA connects and shapes nearly all living things [1] and that within an organism, circulating DNA, such as exosomes that contain transcriptionally active mRNA and microRNA, may potentially act as an endocrine or paracrine messenger, able to affect the functionality of recipients cells [2]. Accordingly, it has been proposed that cell-free DNA (circulating DNA) could participate in the development of metastases via “passive” transfection-like uptake of such nucleic acids by susceptible cells [3]. In 1994, Anker et al., first demonstrated that the supernatant of cultured colon cancer cell line SW480 was able to transform recipient immortal murine NIH3T3 cells, which acquire mutated human *K-ras* [4]. Transformation of these

recipient cells by plasma of colon cancer patients has been reported as well [5].

The ability of genetic material to circulate in eukaryotes has been known since 1948 [6], and that this DNA can be released by bacteria and higher organisms and enter into recipient cells was demonstrated by Anker and Stroun [7–9]. These findings led to the concept that DNA could act as a messenger [10–16]. This view has been supported by the ease with which administered bacterial and eukaryote DNA can circulate freely throughout animal and plant bodies and in its ability to enter individual cells naturally, where it can locate in the host cell nuclei [12,17–18]. The uptake of circulating DNA by eukaryotes shows that the biology of the recipient cells/organisms could be modified regardless of whether it is integrated or not [19–27].

It is noteworthy that such DNA administration does not require any special vehicles, e.g., liposomes, electroporation, and gene guns, to aid entry into cells in order for it to be biologically active. How genetic material circulates and transfers into somatic cells of

higher organisms remains controversial. Although this is not mutually exclusive, some authors have demonstrated that this occurs via the uptake of apoptotic bodies [28], while others have characterized circulating DNA as a complex of DNA/RNA-lipoprotein termed “virtosome”, which is spontaneously released by living cells [29]. Here we demonstrate that circulating DNA is able to drive horizontal tumor progression in an immunocompetent colon-carcinogenesis rat model.

Materials and Methods

Cell Lines

SW480 (human colon cancer cell line that has the point mutation Gly to Val at codon 12 of exon 1 of the *K-ras* oncogene), HeLa (human cervical cancer cell line positive for HPV-18), and NIH3T3 (mouse immortalized fibroblasts) were purchased from the American Type Culture Collection. Primary culture of foreskin

fibroblasts (BB1) was derived from circumcision foreskin of newborn boy under written consent from his father and used in the second passage.

Supernatant Preparation

When cell cultures had a confluence of 80%, supernatants were collected by pipetting and cleared of any remaining cells and cell debris by a centrifugation step at 400 ×g for 20 min (Biofuge primo R, Heraeus) and passed through a 0.45-µm filter (Sartorius, 16555) to remove potentially contaminating cells. Aliquots of each supernatant samples were seeded in a culture flask and incubated at 37°C for 120 h to verify the absence of living cells. For DNA analysis, 50 ml of supernatant were concentrated, first with an ultrafiltration system with a 40 kDa membrane pore (Amicon, Stirred Ultrafiltration Cell, model 8010) and then with a speed vacuum device (Vacufuge Plus, Eppendorf) up to 10 ml. The

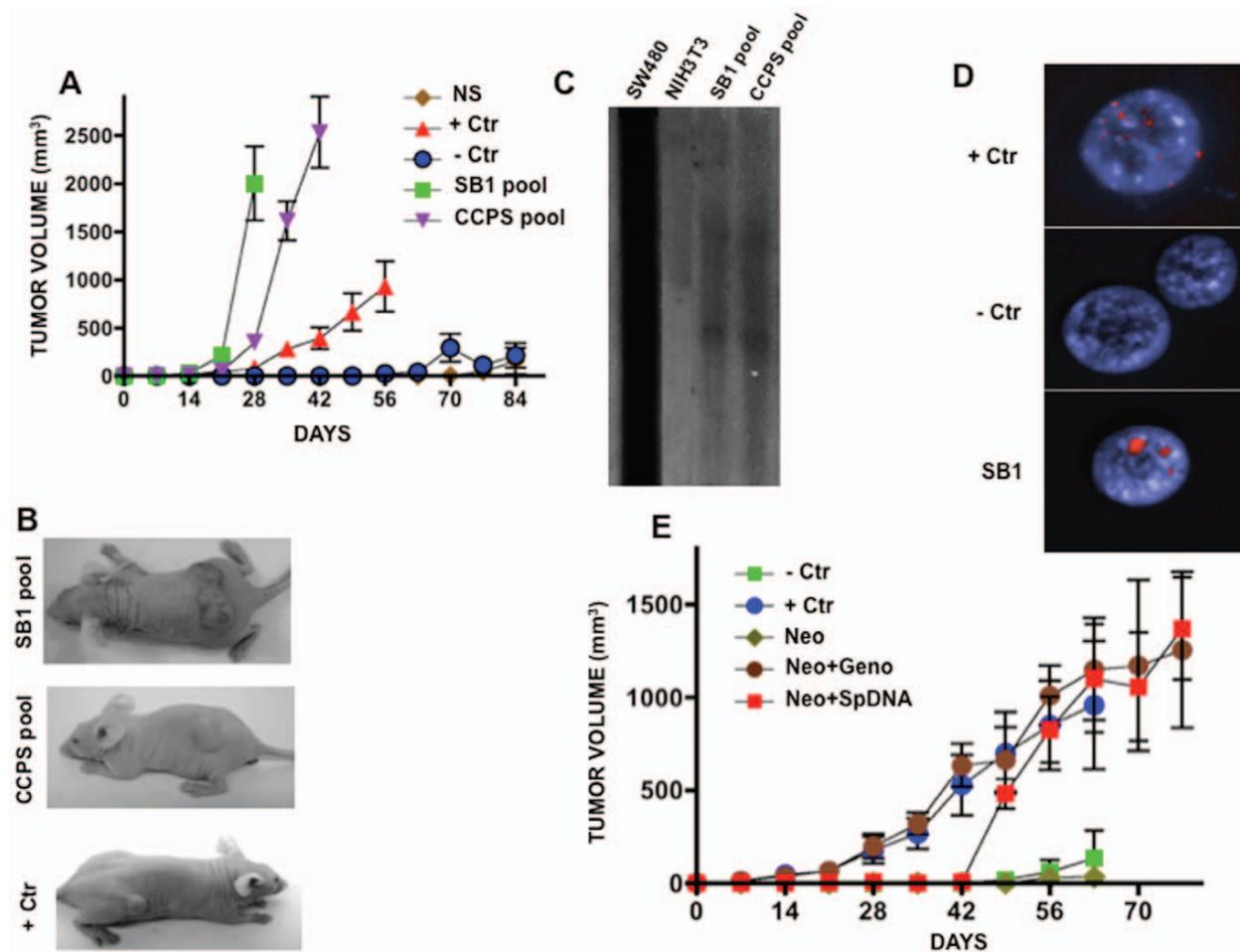


Figure 1. Tumorigenesis and DNA transfer in recipient murine NIH3T3 cells after passive transfection. **A.** Tumor growth in nude mice from “passively” transformed cells. Faster and higher tumor growth was observed in SB1 pool and CCPS pool (NIH3T3 exposed to supernatant of SW480 cells and to the serum of a patient with colon cancer, respectively). SW480 cells were used as positive control, whereas NIH3T3 and NIH3T3 exposed to normal serum showed essentially no growth. **B.** Representative pictures of tumors in mice from each group. **C.** Southern blot hybridization of SB1 and CCPS pools of cells against genomic DNA of SW480 cells. Lane SW480 cells are the positive control and NIH3T3, the negative one. A clear hybridization signal is only observed in SB1 and CCPS lanes. **D.** FISH analysis of repetitive human sequences. Positive control is human lymphocytes and murine cells negative control. SB1 cells shows strong signal. **E.** Tumor growth is similar in NIH3T3 actively transfected with genomic DNA from SW480 cells (Neo-Geno) and actively transfected DNA extracted from supernatant of SW480 cells as compared with no growth in NIH3T3 (- Ctr) and transfected with the empty-vector only. Positive control, SW480 cells. doi:10.1371/journal.pone.0052754.g001

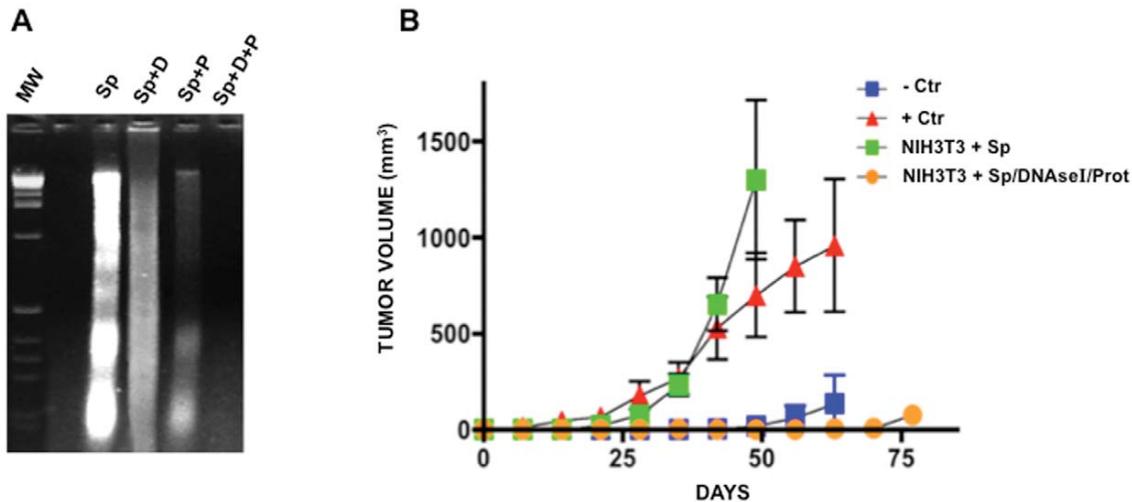


Figure 2. Tumorigenesis after “active” transfection with DNA supernatant of SW480 cells and passive transfection using DNA-depleted supernatant. **A.** Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from supernatant (Sp), DNA from supernatant treated with DNase I (Sp+D), protease only (Sp+P), and both (Sp+D+P). DNA is partially degraded by DNase I and protease, but fully degraded when exposed to both treatments. **B.** No tumor growth was observed in NIH3T3 exposed to DNA-depleted (DNase I/Prot) supernatant of SW480 cells, while passively transfected NIH3T3 with untreated supernatant are tumorigenic. +Ctr are SW480 cells and –Ctr are NIH3T3 cells. doi:10.1371/journal.pone.0052754.g002

concentrated supernatant was immediately cryopreserved at -80°C .

Enzymatic Digestion of the Processed Supernatants

Fifty ml of the processed supernatants from SW480 (SW) and NIH3T3 (NH) were divided into 12.5 ml aliquots and incubated with proteinase K and/or DNase I as follows: 1) SW+DNase I; 2) SW+Proteinase K; 3) SW+DNase I+Proteinase K, and 4) no enzyme. The control digestions were DMEM+2% FBS+salmon sperm DNA, and b) DMEM+2% FBS+salmon sperm DNA+DNase I. Digestion was performed with 1.5 units (50 μg) of proteinase K per mg of total protein contained in supernatant for 60 min at 37°C followed by inactivation at 80°C for 20 min. For DNase I, enzyme concentration was 12 units (3.6 Kunitz) per 12 μg of DNA content in the supernatant for 60 min at 37°C and then inactivation at 65°C for 15 min. Digestion with both enzymes was done with the same concentration and times but digesting first with proteinase K and then DNase I. Following enzymatic digestion, the supernatant was used for “passive” transfection as indicated above. Degradation of proteins and/or DNA was verified by gel electrophoresis.

Serum Collection and Preparation

Sera were extracted from blood of three patients with advanced colon cancer and healthy subjects. Blood was obtained from peripheral vein in two vacutainer tubes (Becton Dickinson, 368162) containing clot-activation additive and a barrier gel to isolate serum. The blood was kept at 4°C , and processed within 2 h, and centrifuged at $1000 \times g$ for 20 min (Biofuge primo R, Heraeus) at room temperature; serum was collected and passed through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ filter (Sartorius, 16555) to remove cells. Blood samples were obtained with written consent from source patients.

Passive Transfection of Mouse NIH3T3 Cells

NIH3T3 cells -as recipient for the transformation assays- were seeded in 24-well plates and exposed to human serum or supernatants SW480 (digested or not) in a 1:1 proportion (DMEM

with 2% FBS/serum or supernatant) for 14 days, refreshing the media every 24 hrs [4]. After 14 days of exposure (only seven days in plates exposed to serum), the cells were dispersed and propagated under standard conditions. Then the exposed cells were analyzed for the presence of mutated human *K-ras* sequences by PCR, RT-PCR, and sequencing. Experiments were performed by triplicates.

Active Transfection (Lipofectamine)

One day before transfection, NIH3T3 cells were seeded at a density of 1×10^5 cells per well (six-well plates) in 500 μl of growth medium without antibiotics (DMEM). Transfections were done using 5 μg of DNA (either genomic DNA or supernatant DNA from SW480 cells plus 0.5 μg plasmid (pEGFP-CMV). Lipofectamine transfections were done following manufacturers instructions (InvitrogenTM, LTX & Plus Reagent). Cells were incubated at 37°C for 24 h; medium was refreshed and the G418 selection was started to get stable transfectants.

Transformation Assays

NIH3T3 that were passively transfected were employed to perform the transformation assays. As control, we used NIH3T3 cells exposed to the serum of a healthy donor and to their own supernatant. The characteristics used as indicators of malignant transformation were morphological changes (focus formation), anchorage-independent growth (growth in soft agar), and tumorigenicity [30].

Morphological Analysis

Transfected NIH3T3 cells were examined for foci formation and counted under phase-contrast microscopy.

Growth of Cells in Soft Agar

Foci were isolated from plastic culture plates and expanded for soft agar analysis. After trypsinization cells were suspended in DMEM medium containing 0.3% noble agar and 15% FBS. A layer of this suspension was plated on top of a layer of medium

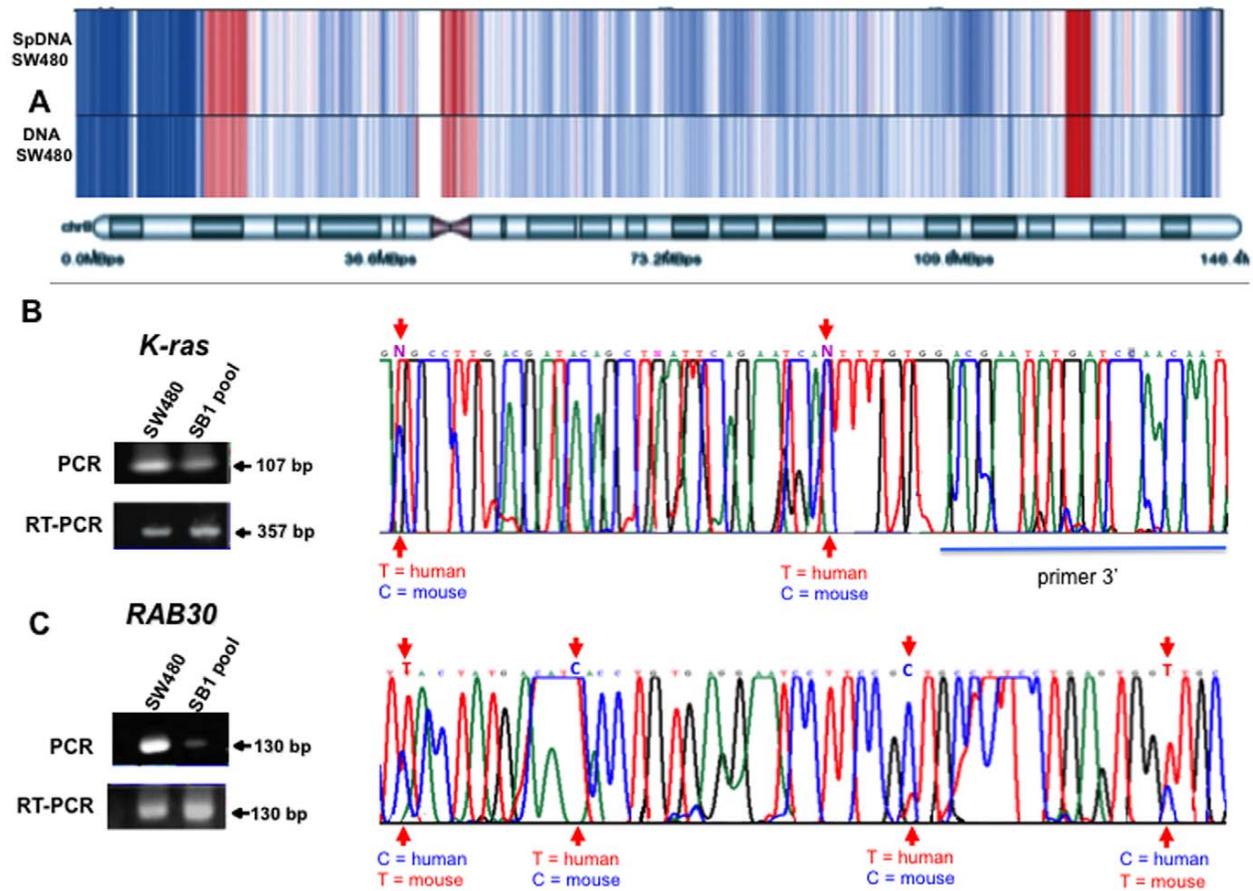


Figure 3. DNA copy number analysis of extracellular and intracellular DNA from SW480 cells and gene transfer to murine NIH3T3 cells. A. Heat map representing the DNA copy number along chromosome 8. Blue represents regions with deletions and red regions with amplifications. A nearly identical pattern of DNA copy number changes between extracellular (SpDNA SW480) and intracellular (DNA SW480) DNA, compared to a common normal reference can be observed. RT-PCR, PCR and sequencing of Human *K-ras* (**B**) and *RAB30* (**C**). Negative control was NIH3T3 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0052754.g003

containing 0.7% agar without serum. Cells were plated at a density of 5×10^5 cells per 10-cm dish. Colonies was scored after 14 days of culture (a colony was defined as if contained at least 50 cells).

In vivo Experiments

Tumorigenesis assays were performed in 6-week-old athymic BALB/c (nu/nu) female mice (Harlan Laboratories). In all experiments, groups of six mice were injected subcutaneously with 2 million cells suspended in 100- μ l of FBS-free DMEM. Tumor growth was monitored in and recorded weekly. Tumor size was measured with an electronic caliper and size-volume estimated using the formulae $a \times b^2 \times (\pi/6) = V$ (mm^3) (a = major diameter; b = minor diameter and V = volume). In experiments to assess the tumorigenesis ability of supernatant of HeLa cells in unmanipulated animals, 6-week-old athymic BALB/c (nu/nu) female mice were also used. Animals were injected daily by intraperitoneal route with 500 μ l of supernatant of HeLa cells for 30 days. At day 31, the animals were sacrificed. Athymic Hsd:RH-*Foxn1*^{tmu} female rats and immunocompetent Hsd:Wistar female rats as well (Harlan Laboratories) were injected with apoptotic bodies from HeLa cells, which were obtained after high-dose exposure for 24 hours to cisplatin at 75 μ M. Detached cells were harvested and centrifuged step at 400 $\times g$ for 10 min (Biofuge primo R, Heraeus)

in PBS three times to remove any remaining cisplatin. Injections of apoptotic bodies were done every other day by intravenous injection in the tail in a total volume of 100 μ l of normal saline. Treatment lasted for 60 days. At day 61 rats were sacrificed and necropsy performed to macroscopically evaluate tumor formation. Major organs (liver, spleen, kidney, lung and uterus) were processed for H&E pathological examination.

To assess horizontal tumor progression, Hsd:Wistar 6-week-old female rats (Harlan Laboratories) were treated with either: i) no treatment; ii) subcutaneous injection of 1×10^6 SW480 cells (diluted in 100 μ l of normal saline) in the flank at days 28 and 49 of DMH treatment; iii) the colon carcinogen DMH by intraperitoneal route for 20 weeks as reported [31]; iv) the regimen of DMH plus SW480 cells; and v) as group iv plus DNase I/protease treatment which consisted on DNase I at a dose of 2.3 mg/Kg by intramuscular injection and a mix of proteases (trypsin, chymotrypsin, and papain) by intraperitoneal injection at doses of 10 mg/Kg, 10 mg/Kg and 25 mg/Kg respectively, as reported in [32]. Both DNase I and proteases mix were diluted in 100 μ l of normal saline. Injections were administered daily except weekends from week 4 to 12. Group vi received DMH+DNase I/proteases. After evaluation with micro PET-CT (as described

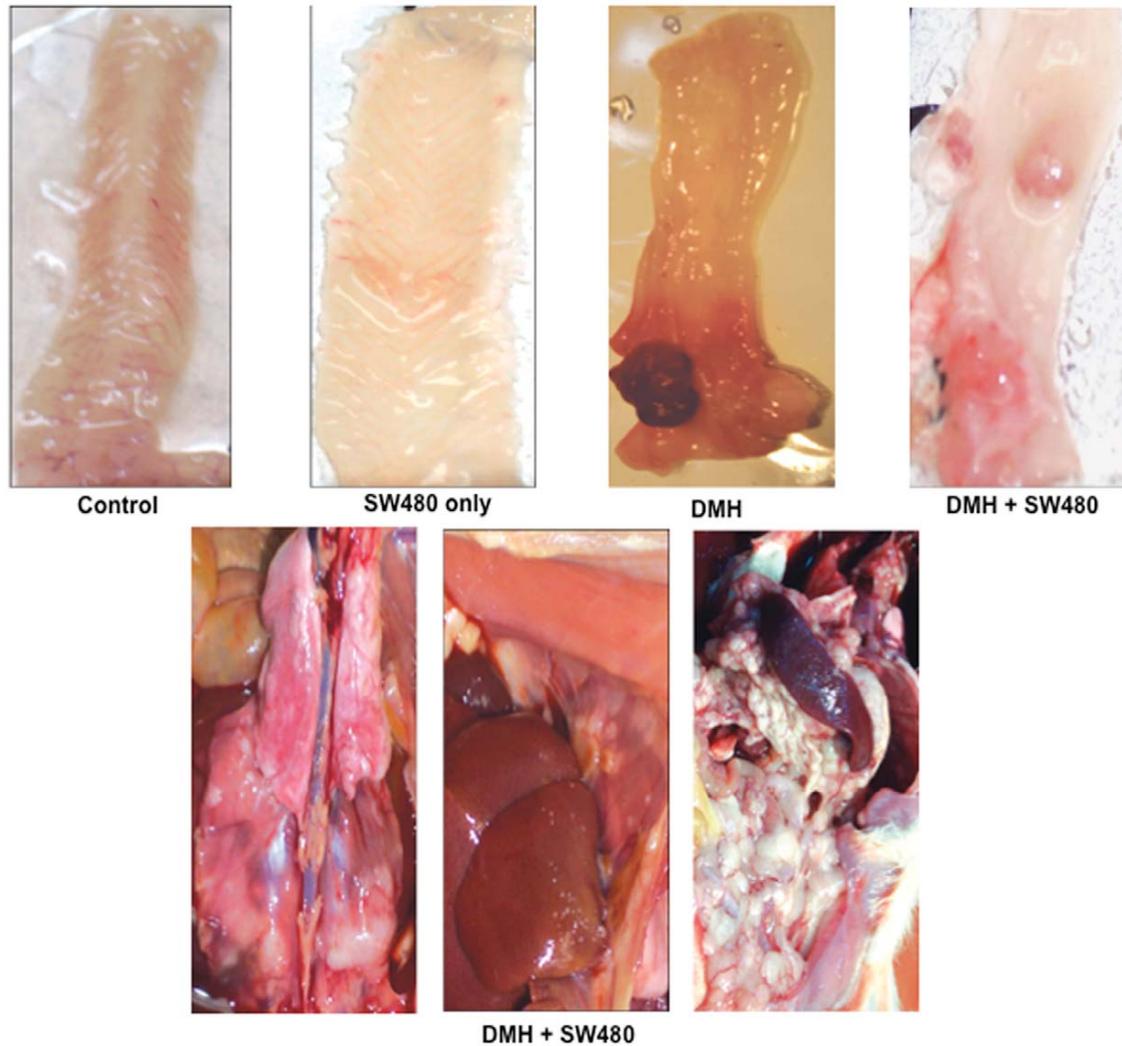


Figure 4. Tumorigenesis in the immunocompetent Wistar rat model. Macroscopic aspect of colon in rats. Control rats and those only receiving SW480 cells had no tumor formation. A colon tumor is observed in the rat treated with DMH, (group iii), whereas 3 tumors are observed in a rat receiving both DMH and SW480 cells (group iv). The inferior panel shows representative pictures of a rat from group iv (DMH+SW480 cells) showing extensive peritoneal carcinomatosis.
doi:10.1371/journal.pone.0052754.g004

Table 1. Results from the *in vivo* tumorigenesis en the immunocompetent Fisher rats.

Group	Treatment	Animals	Tumors (%)
(i)	none	6	0 (0)
(ii)	SW480 cells injection	7	0 (0)
(iii)	DMH	12	2 (16.6)
(iv)	DMH+SW480 cells injection	16	10 (62.5)*
(v)	DMH+SW480+D/P	6	1 (16.6)
(vi)	DMH+D/P	5	2 (40%)

D/P means DNaseI/protease treatment.

*Statistically significant with the Fisher exact test as compared to group (iii).
doi:10.1371/journal.pone.0052754.t001

below) animals were sacrificed and autopsied 6 months after finishing the 20 weeks of carcinogen (DMH).

To evaluate the fate of human SW480 cells injected into immunocompetent animals Hsd:Wistar 6-week-old female rats (Harlan Laboratories) were subcutaneously injected with 10-million SW480 cells in the flank and sacrificed at days 1, 2, 3, 7, and 14 after injection to remove the injection site and processed for routine H&E histological analysis. Ethical approvals were obtained from the Institutional Research Ethics Board and Animal Care Committee.

Micro PET-CT

Tumor formation in the animals was monitored using molecular imaging techniques with a micro PET-CT (Albira ARS, Oncovision) and ^{18}F -FDG. Tumor monitoring was conducted at weeks 15 and 24 after the start of treatment (DMH). To quantify tumor activity, the standard uptake value (SUV) was calculated utilizing

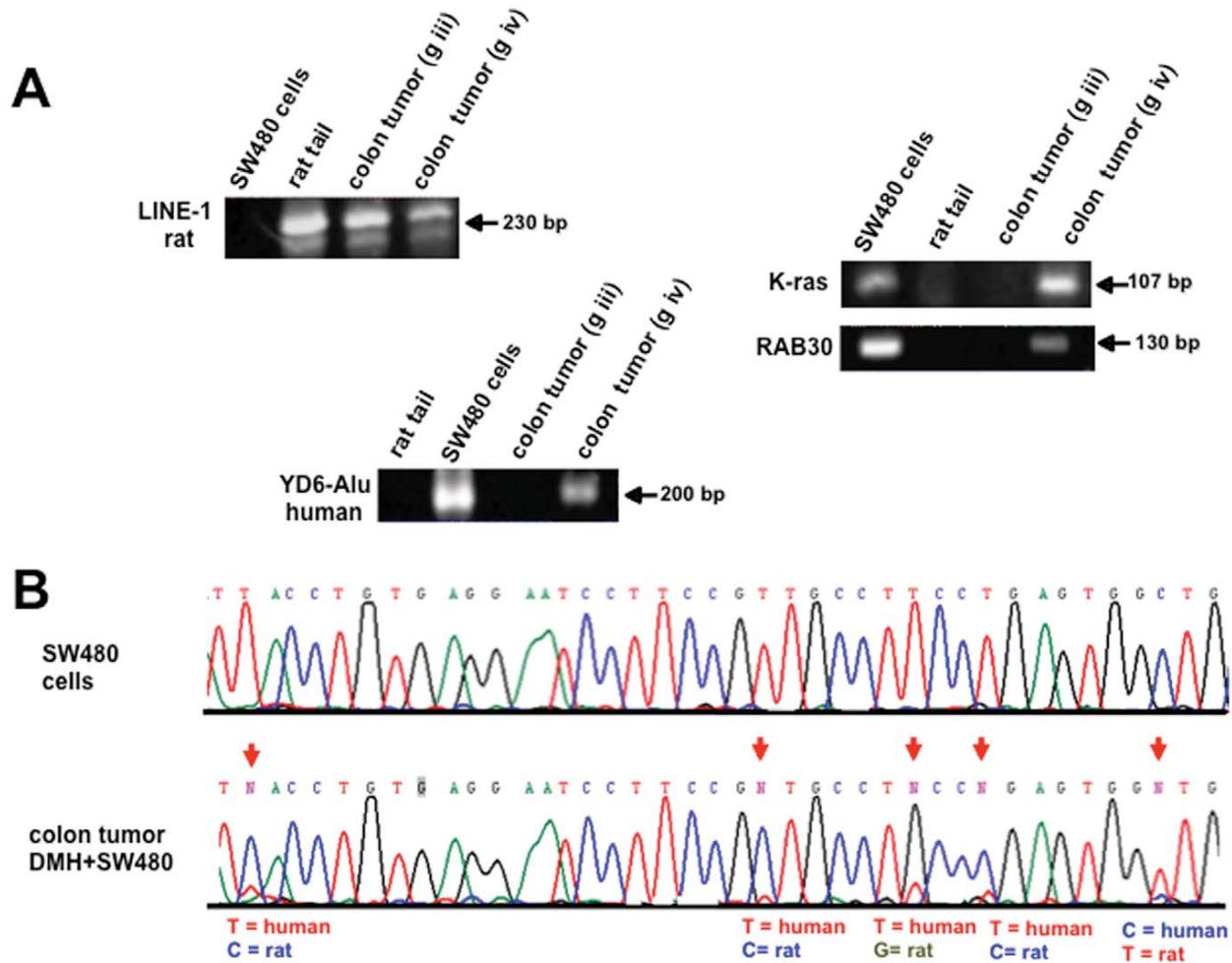


Figure 5. Human DNA transfer in rat colon tumors by PCR-sequencing. Representative pictures of PCR detection of a repetitive sequence of rat (*LINE 1*) in a rat tumor (DMH and DMH+SW480). (A) *Alu Yd6* human sequences were only amplified from the colon tumors of DMH+SW480-treated rats. Rat tail and human cells were used as positive and negative controls. Human *K-ras* and *RAB30* genes were only detected in the tumors of rats receiving DMH and SW480 cells. (B) Sequence analysis of the PCR product of *RAB30* in a colon tumor treated with DMH+SW480 cells. Arrows indicate the position where the nucleotide sequence is different between species and clearly shows the existence of both sequences. Human SW480 cells (control).

doi:10.1371/journal.pone.0052754.g005

Albira system software tools (Carestream Molecular Imaging, CT, USA). SUV is a quantitative tool for PET-CT studies that allows for determination of the ^{18}F -FDG concentration in a specific region-of-interest (i.e., tumor activity). Tumor presence was defined when the SUV (tumor/liver) ratio was ≥ 1.5 .

Tissue Preparation and Microdissection

The formalin-fixed, paraffin-embedded colonic tumors (one of each group) from each group of DMH-treated rats were cut into 5- μm -thick sections on a microtome with a disposable blade. For microdissection, sections were deparaffinized in two changes of xylene for 10 min, rehydrated in 100% ethanol, 90% ethanol, and 70% ethanol for 5 min each, stained with hematoxylin and eosin (H&E) for 45 sec, rinsed in RNase-free H_2O for 30 sec, and finally immersed in 100% ethanol for 1 min. The PALM Laser-MicroBeam System (P.A.L.M., Wolfraatshausen, Germany) was used for microdissection. After selecting the cells-of-interest, adjacent cells were photolysed by the microbeam. To retrieve

the selected cells from the slide, a computer-controlled micromanipulator and conventional sterile needles were used to pick up and transfer the cells into a reaction tube.

DNA Extraction

Circulating DNA extraction was performed by SDS/proteinase K digestion followed by phenol/chloroform extraction as described by Anker, P [4]. Briefly, 500 μl of serum or supernatant were mixed with 500 μl of a solution of SDS/proteinase K (Invitrogen) and incubated overnight at 55°C. An equal volume of phenol/chloroform (1:1 v/v) was added, vortexed briefly, and centrifuged at 800 $\times g$ for 10 min (Biofuge primo R, Heraeus). The aqueous phase was recovered and mixed with an equal volume of chloroform and centrifuged at 800 $\times g$ (Biofuge primo R, Heraeus) for 5 min. The aqueous phase was precipitated overnight at -20°C with 1/10 volume of 7.5 M ammonium acetate, 1 μl of glycogen, and 2.5 volumes of 100% ethanol and then centrifuged at 1200 $\times g$ (Biofuge primo R, Heraeus) for 45 min. The DNA

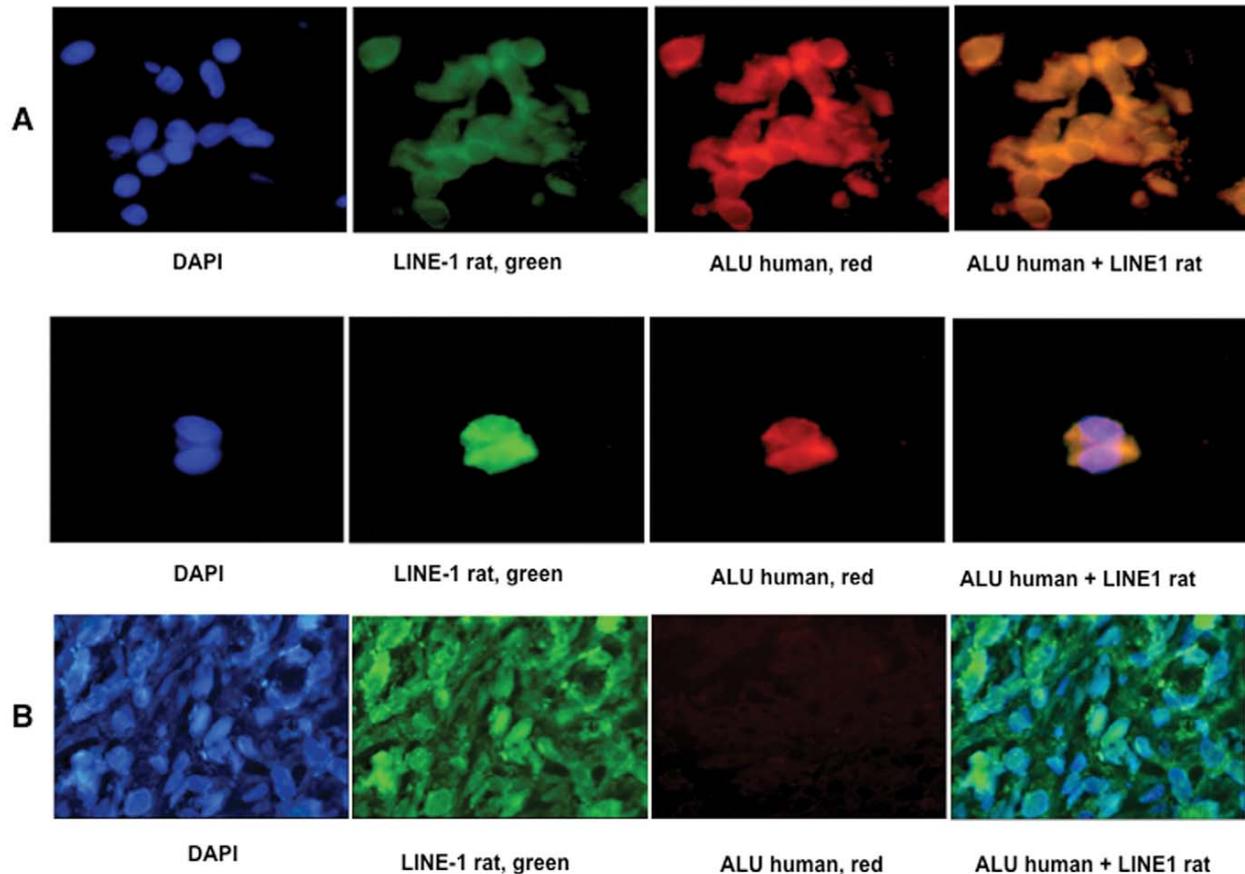


Figure 6. Human DNA transfer in rat colon tumors by FISH. Representative photographs FISH analyses of rat repetitive sequences (*LINE 1*) and human (*Alu Yd6*) in a colon tumor from a rat treated with DMH+SW480 cells (A). Pictures at left (blue) are nuclei stained with DAPI, green are rat specific *LINE 1* signals. Red are human *Alu Yd6* signals and orange are cells showing both signals. B. Representative photographs of a colon tumor from a rat treated with DMH only. Absent red signals represent the lack of human sequences in these cells. Co-incubation with both probes at the right confirms the lack of DNA transfer. doi:10.1371/journal.pone.0052754.g006

pellet was washed with 70% ethanol, air-dried, and resuspended in water. Quantification of total DNA was performed using the PicoGreen assay (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. DNA from microdissected tumors of paraffin-embedded tissue was extracted with the PicoPure™ DNA isolation kit (ARCTURUS Mountain View CA) following manufacturers instructions.

RNA Extraction

Total RNA was isolated from processed supernatant and human serum using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.

PCR

All reactions were performed in 20 μ l containing 100 ng of template DNA, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl₂, (1 mmol/l MgCl₂ for *RAB30*, and 5 mmol/l MgCl₂ for *Alu Yd6*), 200 μ mol/l of each dNTP, 0.25 U Taq polymerase (Applied Biosystems), and 1 μ mol/l of each specific primer: human *K-ras* (5'-gactgaatataaactgtgtagt-3', and 3'-ggcgaatgatcaacaatag-5'), 107 bp amplicon; *E6* (5'-ggggatcatggegccgttgaagatcaaca-3', and 3'-ggggaattcttactgtgtttctctgcgtc-5'), 450 bp amplicon; *E7* (5'-cccgcagagcc-

gaaccacaac-3', and 3'-gggatgcacaccaggacacac-5'), 300 bp amplicon; human *DHFR* (5'-agaaccaccagaggagc-3', and 3'-acagaactgcctccgactatc-5'), 120 bp amplicon; human *ACTIN* (5'-ggagtctgtggcatccacg-3', and 3'-ctagaagcattgctggtgga-5'), 320 bp amplicon. Human *RAB30* (5'-gtccattaccagattactaccg-3', and 3'-gacctgtgtggtcatattgttc-5'), 130 bp amplicon; *Alu Yd6* (5'-gagatc-gagaccaggtgaaa-3', and 3'-ttgctcaggcagagttt-5'), 200 bp amplicon [33].

An initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 40 cycles of amplification and a final extension step 5 min at 72°C, (*E6*, *E7* and *Alu Yd6* had extension time for 30 sec). The cycles included denaturation at 94°C for 30 sec, 30 sec of annealing (60°C for *K-ras* and *RAB30*, 59°C for *ACTIN* and *DHFR*, 57°C for *E6* and *E7* and 61°C for *Alu Yd6*), PCR reactions were carried out in a 2400 Thermalcycler (Applied Biosystems). The amplification products were verified by agarose gel electrophoresis. For rat specific *LINE 1* sequences the amplification was performed in 20 μ l reactions containing 100 ng of template DNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L of each dNTP, 0.25 U Taq polymerase (Applied Biosystems) and 1 μ mol/L of each primer specific for rat *LINE 1* (5'-aaatcagggactagacaaggctgc-3', and 3'-cccagccattgtctgaagtgt-5') [34]. Initial denaturation at 94°C for 5 minutes was followed by

40 cycles of amplification and a final extension step (5 minutes at 72°C). Amplification cycles consisted on denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 59°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds. PCR reaction was carried out on a 2400 Thermalcycler (Applied Biosystems). The amplification products were verified by agarose gel electrophoresis.

RT-PCR

For first-strand cDNA synthesis 1–5 µg of total RNA was reverse-transcribed in a 20-µl reaction volume containing 2 µl of 10× PCR buffer, 50 ng of random hexamers, 50 mM MgCl₂, 200 ng nM dNTP, 0.1 M DTT, and 200U Reverse Transcriptase, (GeneAmp, Applied Biosystems) for 50 min at 42°C. PCR amplification of cDNA was performed in a 20 µl reaction volume containing 100 ng cDNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂ (for *K-ras*^{v12} and *RAB30*), and 200 µmol/L of each dNTP, 0.25 U Taq polymerase (Applied Biosystems), and 1 µmol/l of each primer specific for human *K-ras*^{v12} (5'-actgaataataaactgtgtagtggacct-3', and 3'-caaatcacattattctaccaggacct-5'), and for *RAB30* (5'-gtccattaccagagttaccacg-3', and 3'-gacctgtgtcggcatattgttc-5'). Initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 40 cycles of amplification and a final extension step (5 min at 72°C). The cycles included denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58°C (*K-ras*^{v12}), and at 56°C (*RAB30*) for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec. The size of the amplicons and the sequence of the primers used for PCR for *K-ras*^{v12} is 357 bp, and for *RAB30*, 130 bp. The PCR reaction was carried out on a 2400 Thermalcycler (Applied Biosystems). The amplification products were subjected to electrophoresis on a 3% agarose gel.

DNA Sequencing

To verify the origin of the amplified sequence (human or murine), the PCR products were sequenced. PCR amplicons were purified using isopropanol precipitation and then sequenced in both forward and reverse directions from at least two independent amplification products. Purified DNA was diluted and cycle-sequenced using the ABI BigDye Terminator kit v3.1 (ABI, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Sequencing reactions were electrophoresed in an ABI3100 genetic analyzer. Electropherograms were analyzed in both sense and antisense directions. The sequences obtained were compared with the reference *KRas* sequence (GenBank DQ893829) and the *RAB30* sequence (GenBank NM_014488).

Southern Blot

Labeled SW480 genomic DNA was hybridized to the following cell lines: SW480 (positive control); NIH3T3 (negative control), and a pool of *K-ras* positive cell clones derived from NIH3T3 exposed to human serum from a patient with colon cancer. Ten µg of high-molecular-weight genomic DNA of each DNA sample was digested with *Hind III* (New England Biolabs). The DNA fragments were separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, denatured, and transferred onto nylon membrane (Amersham). Hybridization was performed in a solution of the BM Chemiluminescence Blotting kit (Roche Applied Science) containing the DNA probe (100 ng/ml) for 20 h at 42°C. The blots were washed under high-stringency conditions in 0.1×SSC, 0.1% SDS for 90 min at 65°C, incubated in streptavidin for 30 min at room temperature, placed on Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences), and exposed for 60 sec.

SNP Array Hybridization and DNA Copy Number Analysis

DNA from parental SW480 cells, DNA isolated from supernatant of SW480 cells, and genomic DNA from SB1 cells (NIH3T3 passively transformed by SW480 supernatant) was hybridized onto the 500K Affymetrix genotyping array set for DNA copy number analysis, following the manufacturers protocol. Analysis was performed using the DNA copy number pipeline in the Partek Genomics Suite software. All samples were compared against a common normal human DNA copy number reference baseline.

FISH

Interphase nuclei and metaphase chromosomes of the transfected NIH3T3 cells (SB1) were analyzed in standard cytogenetic preparations, as previously described [35], with a consensus sequence of human interspersed repeats. The human Cot DNA probe (which is placental DNA that is predominantly 50–300 bp in size and enriched for repetitive DNA sequences such as *Alu* and *Kpn* family members) was labeled by nick translation with digoxigenin-11-dUTP (Roche) by using the DIG-Nick Translation Mix (Roche) and detected utilizing a fluorochrome-conjugated antidigoxigenin antibody. One hundred nuclei were microscopically analyzed.

FISH analysis of histological sections of colon tumors of rats was done as follows: Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol series. The slides were pre-treated with 0.2 M HCl, 8% sodium thiocyanate, and 0.5% pepsin. Afterward, red-fluorescein-labelled *ALU* human (FISHBright, Kreatech Biotechnology) and green-fluorescein-labelled *LINE 1* rat (FISHBright, Kreatech Biotechnology) probes were added simultaneously; the slides covered with coverslips and sealed with rubber cement. Sections were denatured and hybridized in a Hybridizer (Life Technologies) at 37°C overnight. The rubber cement and the coverslips were removed and the sections were washed stringently using SSC: 2×SSC for 30 min at room temperature, 0.4×SSC/0.3% NP40 for 5 min at 75°C, and 2×SSC/0.1% NP40 for 4 min at room temperature. Nuclei were counterstained using 4',6'-Diamino-2-phenylindole (DAPI) at a concentration of 0.1-µg/ml in Antifade (Vector Laboratories). Analyses were performed using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope (Zeiss) interfaced with the CytoVision system (Applied Imaging).

Results

Extracellular DNA Transforms Immortalized Murine Cells Associated with DNA Transfer

Cell-culture supernatants of human malignant cell lines SW480 and HeLa (grown in DMEM with 2% FBS), as well as serum of the three advanced untreated colon cancer patients and two healthy controls were cleared of viable cells and cell debris by centrifugation and filtering (0.45-µm filter). The DNA extracted from these sources, (SW480 and HeLa supernatants) were PCR-positive for mutant human *K-ras* at codon 12, and *E6* and *E7* oncogenes respectively. The three serum samples for cancer colon patients harbored the *K-ras* mutation at codon 12, which also was proven in DNA extracted from their paraffin-embedded primary tumors. These material (supernatants and serum of colon cancer patients and healthy controls) were PCR positive for constitutive human *DHFR* and *ACTIN* genes (not shown). Serum DNA concentrations in serum were 2.04, 0.66 and 0.93 µg/ml for patients and 0.28 and 0.178 µg/ml for healthy individuals. Supernatants from five independent cell cultures of SW480 which were taken at 80% cell confluence, had a mean concentration of 0.1875±0.007 µg/ml. "Passive" transfections with supernatants or

sera were done as follows: 0.5 ml (serum or supernatant containing 1.815 μg or 0.09 μg respectively) were added to 0.5 ml of medium (1:1 ratio) of cultured recipient murine immortal cells NIH3T3 (which were proven murine by cytogenetic analysis and by the absence of repetitive human *Alu Yd6* by PCR, not shown) in 24-well microtiter plates. Medium plus serum or supernatant were changed daily for 7 or 14 days (shorter time for serum due to the limited amount), thus, cells were exposed daily to 1.815 μg of DNA contained in the serum or to 0.09 μg of DNA contained in the supernatant DNA. At day 8 or 15, the number of transformation foci of recipient NIH3T3 cells in plastic and colony formation in agar were overwhelmingly superior for both serum and supernatant (as compared with the control (NIH3T3 cells exposed to their own supernatant and to normal serum). Among established transformed clones, 11 of 27 exposed to SW480 and 5/9 (exposed to the serum of the patient with cancer) had the *K-ras* mutation as proven by PCR utilizing primers specific for amplifying human *K-ras*. Likewise, 8/24 clones exposed to HeLa were PCR-positive for *E6* and *E7* HPV oncogenes. Tumorigenesis assays in *nu/nu* female mice showed larger and faster growing tumors from a pool of clones “passively” transfected with supernatant of SW480 (SB1 pool) and colon-cancer serum (CCPS) as compared with parental SW480 cells (+Ctr), with murine NIH3T3 exposed to normal serum (NS), as well as with parental NIH3T3 (–Ctr) (**Fig. 1 A, B**). These results confirm previous observations on the transforming ability of the supernatant of SW480 cells, as well as those of plasma from patients with cancer [4,5]. Southern hybridization of these NIH3T3-transformed pools of clones (SB1 pool) against genomic DNA from SW480 cells showed clear hybridization signals, confirming the horizontal transfer of human DNA to recipient murine cells (**Fig. 1 C**). Further, FISH analysis of passively transformed murine cells (SB1) emitted positive signals for human repetitive sequences (**Fig. 1 D**), which confirms that cell transformation was associated with DNA transfer.

To demonstrate that the transforming ability of the supernatant resides in the DNA, 5 μg of purified DNA from the SW480 supernatant was co-transfected with a eukaryotic pNeo vector utilizing lipofectamine (active transfection). Multiple genetecin-resistant clones were established. A pool of these clones was able to form tumors in *nu/nu* female mice (**Fig. 1 E**). Contrariwise, “passive” transfection using 5 μg of purified DNA (extracted from cell-culture supernatant) and added daily for 14 days to NIH3T3 cells) was unable to transform NIH3T3 cells and also failed to transfer DNA sequences into recipient cells (as evaluated by PCR of mutant human *K-ras* and *Alu Yd6*, not shown).

DNA-depleted Supernatant does not Transform Immortalized Murine Cells

It has been shown that cell-free DNA circulates as a complex of the DNA/RNA-lipoprotein (virtosome) that is spontaneously released by living cells [29] and this complex could protect DNA from being degraded by circulating nucleases. To investigate this, fresh supernatant of SW480 cells was exposed to DNase I, to proteinase K, and to both, and then the DNA was extracted and electrophoresed. Results showed that DNase I failed to digest DNA fully. Likewise, exposure of supernatant to proteinase K only mildly digested DNA. Contrariwise, exposure first to proteinase K and then to DNase I completely degraded the DNA (**Fig. 2 A**). This finding allowed us to probe further that the supernatant DNA is responsible for transformation as “passive” transfection with DNA-depleted supernatant (treated with both enzymes) on NIH3T3 cells failed to

induce focus formation, growth in agar, and tumorigenesis in nude mice (**Fig. 2 B**). In summary, these results show that the transforming ability of the supernatant of SW480 cells resides in the DNA.

Gene Copy Number is Nearly Identical between Intracellular and Extracellular DNA Compartments

Sequencing analyses, indicate that circulating DNA comes from the whole genome, with minimal indications of sequence clustering, although there is incomplete coverage of all chromosomes [36]. In contrast, unequal distributions of genes have been described [37]. In any case, the results of our Southern hybridization experiments (**Fig. 1 C**) at the very least suggest that transfer may not be limited to a few DNA sequences. To gain further insight into this, we hybridized genomic DNA (intracellular) from parental SW480 cells, DNA isolated from supernatant of SW480 cells (extracellular), and genomic DNA from SB1 cells (NIH3T3 passively transformed by SW480 supernatant) onto the 500 K Affymetrix genotyping array set for DNA copy number analysis. All samples were compared against a common, normal human DNA copy number-reference baseline. High-quality hybridization was obtained with the SW480 genomic DNA (intracellular), as well as with the DNA obtained from the SW480 supernatant (extracellular). Results showed that there is a nearly identical pattern of DNA copy number profile between the “intracellular” and “extracellular” DNA of SW480 cells as profiled in **Fig. 3 A** showing chromosome 8, and **Suppl. Fig. S1** showing all chromosomes. DNA (intracellular) from SB1 cells was hybridized as a potential way to acquire human DNA genes transferred into the NIH3T3 cell genome; however, the overall quality of the hybridization using this DNA was poor and we were unable to obtain any clear signal that might suggest that recipient cells possess preferential uptake of the specific genomic regions present in the supernatant DNA of SW480 cells (GEO accession number GSE35052). To confirm the copy number analysis data, we selected the human *K-ras* and *RAB30* genes, which were found amplified and single copy respectively in both DNAs (intracellular and extracellular). These genes were PCR- and RT-PCR-amplified using human-specific primers followed by sequencing in SB1 cells (**Fig. 3**) illustrates that for both genes (**B** *K-ras*, **C** *RAB30*), mice and human bases were detected in the mRNA sequences, confirming, at least for these two genes, that regardless of whether the gene in supernatant is amplified or not, recipient cells can acquire these from the supernatant.

Extracellular DNA Fails to Transform Primary Human Cells

NIH3T3 cells are embryonic murine fibroblasts, which are immortalized and prone to spontaneous transformation; hence, we wanted to investigate whether the supernatant DNA was able to transform early-passage primary human-foreskin fibroblasts (BB1). Exposure of these primary cells to SW480 supernatant even for 45 days failed to induce foci formation, and when injected into *nu/nu* mice exhibited no tumorigenesis at all (**Suppl. Fig. S2A**). The inability of extracellular DNA to transform primary cells was also confirmed *in vivo*. Six *nu/nu* mice received daily intraperitoneal (i.p.) injection of HeLa supernatant for 30 days. No tumors were clinically observed and a comprehensive autopsy found no histological alterations in the organs examined (lung, liver, spleen, colon, and kidney), supporting the *in vitro* observations. Further, six female *nu/nu* rats and six immunocompetent Wistar rats were intravenously injected every other day with apoptotic bodies obtained from HeLa cells for two months and animals sacrificed after finishing injections. Again, no clinical alterations were observed and no dysplastic or neoplastic cells were found in these

organs on histological analysis. To rule out that the lack of tumorigenesis was due to the non-occurrence of DNA transfer, liver, spleen, colon, uterus, lung, and kidney of these animals were examined for the presence of *E6* and *E7* oncogenes both at the genomic and the expression level as evaluated by PCR and RT-PCR. The results showed that both *E6* and *E7* were detected by PCR while *E7* expressed, although only in liver (**Suppl. Fig. S2 B**).

Transfer of Extracellular DNA and Tumor Progression in Rats

All of these data indicated that, most probably, lateral transfer of oncogenes by extracellular DNA is insufficient to induce tumor formation in primary normal cells and in unmanipulated animals (either immunodeficient or -competent), and that perhaps an *initiating* event was required to develop malignant tumors in line with the current model of carcinogenesis -*initiation-promotion-progression*. To prove this, immunocompetent female Wistar rats were treated with the colon carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) by i.p. route for 20 weeks (20 mg/kg of DMH each week). At week 4, rats were injected s.c. (twice, 15 days apart) with 10 million of SW480 colon-cancer cells in the flank. The experimental scheme is depicted in **Suppl. Fig. S3**. The groups were treated as follows: i) control (no DMH, no SW480 injection, 7 rats); ii) SW480 cell injection only (7 rats); iii) DMH only (12 rats), iv) DMH+SW480 cells injection (16 rats), v) DMH+SW480 injection plus DNase I/proteases, 6 rats and vi) DMH plus DNase I/proteases, 5 rats.

After 15 weeks of starting treatment with DMH and 1 month after finishing the 20 weeks of carcinogen (DMH) administration, 2 rats from each group were evaluated for tumor formation with micro PET-CT (Albira ARS) studies with ^{18}F -FDG using the SUV ratio (Tumor/Liver). Tumor presence was defined when the SUV ratio was ≥ 1.5 . Results showed that rats from groups (i), (ii) and (v) had no tumors; one of two animals receiving DMH (group iii) had a tumor detected (**Suppl. Fig. S4 A**), whereas two of two from group (iv) had tumors (**Suppl. Fig. S4 B**). The initial micro PET-CT evaluation in the rat from group (iii) with tumor had a SUV ratio of 2.7, and 2.2 at the second evaluation. The respective SUV ratios for the two rats of group (iv) were 1:6 and 1:51 in one rat, and 3:9 and 4:1 for the second rat. Then, the rats were sacrificed and a comprehensive autopsy performed. Macroscopic and histological evaluation of animals showed that two of 12 (17%) rats from group (iii) had tumors. In these cases, no extra-colonic dissemination was observed. In group (iv) rats that received DMH and injection of SW480 cells, 10 of 16 (62.5%) had tumors (two-tailed Fisher exact test, $p = 0.0235$). Interestingly, only one out of 6 rats from group (v) which were treated like group iv plus DNaseI/protease had tumors (16.6%) which are similar to rats treated only with DMH (group iii) and proportionally inferior to group (iv) 62.5% though this difference was not statistically significant ($p = 0.144$). Two out of 5 (40%) rats from group (vi) DMH+DNase I/protease treatment had tumors. (**Table 1**). Three animals from group iv presented extensive peritoneal (accompanied by ascites) and pleural dissemination of tumor cells (representative pictures are shown in **Fig. 4**). Macroscopic colonic tumors were counted in these groups. Group (iii) had a mean of 1.5 ± 0.70 tumors, whereas in group iv, this number was 3.85 ± 1.2 tumors (unpaired Student *t* test, $p = 0.0305$; [95% CI]: -4.30 to -0.270).

Neither control rats nor those receiving only SW480 cell injection had macroscopic or microscopic evidence of tumors. To rule out that colon tumors in these rats originated from metastatic SW480 cells injected in the flank, another group of rats (two animals each time point) were injected in the flank with the same

amount of SW480 cells used in the DMH experiments and the animals were sacrificed at days 1, 2, 3, 7, and 14 after injection; the injection site was removed and processed for histological analysis. The results showed a decreasing amount of viable cells at days 1, 2, 3, and 7, but viable cells were not found at day 14. It is noteworthy that a progressive inflammatory infiltrate and apoptosis were found at these time points (**Suppl. Fig. S5**). These results were not unexpected, because immunocompetent rats reject malignant human SW480 cells, ruling out that colon tumors from DMH-treated and SW480-injected cells, originated from viable, metastatic, SW480 human cells.

A colonic tumor from each group of rats was microdissected and DNA was extracted from tumor cells (DNA from SW480 human cells and rat tail were used as controls for PCR reactions). All tumors were positive for rat *LINE 1* sequences, but *ALU* human sequences were positive only in the tumors of rats that received DMH plus SW480 injection (group iv) as also were positive for human mutant *K-ras* and human *RAB30*. **Fig. 5 (A)**. Of note, we were not able to detect either of these human sequences in the tumor of the rat from group (v) which received DNase I/protease treatment. Sequencing of these amplicons showed rat and human bases in the sequences as shown in **Fig. 6 (B)** for the *RAB30* gene. The transfer of human DNA to rat colonic tumors was also evaluated by FISH analysis in paraffin-embedded tumors (**Fig. 6**). Colon tumor cells from a DMH-treated and SW480-injected rat (group iv) were FISH-positive for both *ALU* human and rat repetitive sequences (*LINE 1*) (**A**), whereas rat tumors from the DMH-only group and from group (v) were negative for human, but positive for rat sequences (**B**). These results confirmed that circulating DNA-induced transformation also occurs *in vivo* and that it accounted for tumor progression.

Discussion

The results of this study show that extracellular DNA does not only induces cell transformation and tumorigenesis but also drives tumor progression *in vivo*, establishing that cancer progression also occurs by horizontal or lateral DNA transfer in this model.

Our results support that circulating DNA behaves as a signaling endocrine molecule that contributes to cancer progression. This is based primarily on two facts; i) tumor cells shed DNA into the circulation of cancer patients [38,39] and ii) circulating DNA has the ability to enter individual cells [12,17–18] and it can modify the biology of the recipient cells/organisms regardless of whether it is integrated or not [19–27]. In line with these data and our results, we hypothesize that in cancer patients the tumor DNA shed into the circulation is inserted into “normal-appearing” initiated stem cells, which are transformed by the circulating DNA, leading to “second primary tumors” (**Suppl. Fig. S6**). In this scenario, although “second primary tumors” can clinically be considered metastatic tumors, would, in fact, originate via horizontal DNA transfer, and this concept fits well into the in-field carcinogenesis concept, in which multiple “initiated” cells are prone to transformation. It also can be hypothesized that circulating DNA could be a trigger for tumor progression according to the currently proven metastatic progression concept. In this scenario, as it is known, primary tumors disseminate into distant organs by the process known as micrometastases at a very early stage, even prior to being invasive [40]. Micrometastatic cells then could acquire DNA from the primary tumor via horizontal DNA transfer, which would induce these micrometastases to grow and to form metastatic lesions as clinically defined. In any case, DNA-induced cell transformation and tumor progression could possibly be aided by the concurrent transfer of one or several biologically active

molecules or humoral factors, known to be present in particles shed into the circulation by cancer cells [41].

Other studies on horizontal DNA-induced cell transformation using different models came in general, to the same conclusions on the ability of exogenous tumor DNA to induce cell transformation and/or tumorigenesis. By using supernatant of cultured SW480 cells Anker et al., showed NIH3T3 transformation associated with mutant *K-Ras* transfer [4]. Garcia-Olmo et al, observed both cell transformation and tumorigenesis of NIH3T3 “passively” transfected with human plasma of colon cancer patients. In addition, they showed that plasma from healthy individuals was unable to do so, and that plasma of colon cancer patients failed to induce transformation of human adipose-derived stem cells obtained from lipoaspirates of non-cancer patients [5]. Similar results have been obtained using apoptotic bodies as a source of exogenous DNA. Bergsmedh et al., used *H-ras*/human *c-myc*-transfected rat fibroblasts as donor and mouse embryonic fibroblasts as recipient cells [28] while Gaiffe et al., [42] used human HPV-positive cervical cancer cells and human mesenchymal cells taken from an adult human after abdominoplasty as source and recipient cells respectively. Interestingly, they were able to show cell transformation in these recipient non-immortalized cells. All together, our and these results confirm the ability of exogenous malignant DNA to horizontally drive transformation and tumorigenesis regardless of the model used.

The “endocrine” capacity of tumors influencing tumor progression has already being reported. McAllister et al., showed that “instigating” tumors, even when relatively small (<0.08% of total body mass), facilitate the outgrowth of already-established, otherwise-indolent tumor cells located at distant sites via the humoral factor osteopontin [43]. Our study provides evidence that tumor progression also occurs via horizontal transfer of oncogenic DNA. This is supported by the fact that human DNA (mutated *K-Ras*, *RAB* and *Alu Yd6* sequences) were found only in the tumor of the rat injected with SW480 cells and by the lower frequency of tumor formation in the rats that were treated with DNase I/proteases which strongly suggests that this treatment decreased the levels of SW480-derived DNA in the circulation of rat that in turn reduced or avoided “passive” transfection of such DNA into rat colon epithelial cells. Ongoing research in our laboratory shows that DNase I/protease treatment reduces the levels of circulating DNA in rats blood.

Limitations of our study are the small numbers of rats treated with DNase I/proteases that did not allow to show a statistically significant reduction in the number of tumors as compared to rats receiving both DMH and SW480 injection; the fact that we only microdissected a single tumor from each group of rats and that we did not evaluate that these human genes (mutated *K-Ras* and *RAB*) transferred to rat colon tumors were actually expressed. It cannot be ruled out that humoral factors other than DNA could also have contributed to tumor progression as well as the potential unspecific effect of the SW480 injection into rats even that they were immunocompetent.

The results of this work need to be expanded by further research, nevertheless, we believe that the realization that circulating extracellular DNA is responsible for cancer progression may derive to the application of an antitumor therapy aimed to deplete this “oncogenic DNA”. In fact, the antitumor and antimetastatic effects of DNase I and proteases have already being suggested [44–48]. The exploration of the horizontal tumor progression mediated by either DNA and/or other biologically active circulating molecules is clearly needed to determine whether its manipulation could have value in cancer therapy.

Supporting Information

Figure S1 Heat map representing the DNA copy number along all chromosomes. Blue represents regions with deletions and red regions with amplifications. A nearly identical pattern of DNA copy number changes between extracellular (SpDNA SW480) and intracellular (DNA SW480) DNA, compared to a normal reference can be observed. (PDF)

Figure S2 Lack of transformation and DNA transfer in primary cells. A. Primary human-foreskin fibroblasts (BB1) exposed for 45 days to the SW480 supernatant failed to transform and to form tumors in nude mice. Negative control was the wild-type BB1 cell line and positive control, NIH3T3 cultured with the SW480 supernatant (NIH3T3+Sp). **B.** PCR and RT-PCR of viral oncogenes of HPV-18 in several organs of Wistar rats treated every other day with intravenous injections of apoptotic bodies from HeLa cells. Transfer and expression of viral oncogenes were demonstrated to occur in liver. (PDF)

Figure S3 Experimental design to demonstrate horizontal tumor progression in Wistar rats. Rats were treated with the colon carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) and subcutaneously (s.c.) injected with human SW480 colon cancer cells. (PDF)

Figure S4 Micro PET-CT using ¹⁸F-FDG tumor uptake in rats. A rat receiving only DMH, **A** shows an irregular mass in the abdominal area with a SUV of 2.2 (at second evaluation). The rat receiving DMH and SW480 cells had abdominal areas of masses with a SUV of 4.1 (at second evaluation), indicating the presence of tumor (**B**). (PDF)

Figure S5 Histological sections of the site of inoculation of SW480 cells. Viable tumor cells are observed at 24 h (**A**); at 72 h these are decreasing (**B**), extensive apoptosis and central necrosis are observed at 7 days (**C**). At 14 days, no viable cells were found (**D**). (PDF)

Figure S6 Proposed model of tumor progression mediated by horizontal DNA transfer. The scheme at left summarizes the lateral tumor progression in rats. The SW480 xenograft sheds DNA into circulation which transforms DMH initiated colon cells to form tumors. The figure at the right is the proposed model where a primary tumor regardless of its location and type sheds “oncogenic” DNA to the circulation which “passively” transfects initiated stem cells from any site giving rise to metastases. According to this model some “metastases” can be in fact, secondary tumors. (PDF)

Acknowledgments

This work is submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree of Trejo-Becerril C., at the Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Authors want to thank Dr. Patricia Ostrosky for her continuous support for this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CT-B EP-C AD-G. Performed the experiments: CT-B EP-C LT-C AH-M RH-G DP-M MG JD-C AC-B JC-V LAM-V. Analyzed the data: CT-B EP-C PA AD-G. Contributed

reagents/materials/analysis tools: AH-M LAM-V JD-C MG JC-V. Wrote the paper: CT-B AD-G.

References

- Sleator RD (2011) Phylogenetics. *Arch Microbiol* 193: 235–239.
- Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M (2011) Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol* 81:1171–1182.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318–322.
- Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M (1994) [Transformation of NIH/3T3 cells and SW480 cells displaying K-ras mutation]. [Article in French]. *CR Acad Sci III* 317:869–874.
- García-Olmo DC, Dominguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, et al. (2010) Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 70:560–567.
- Mendel P, Métais P (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 142:241–243.
- Strou M, Anker P, Auderset G (1970) Natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells. *Nature* 227:607–8.
- Stroun M, Anker P (1972) Nucleic acids acid spontaneously by living frog auricles. *Biochem J* 128:00P–101P.
- Anker P, Stroun M, Maurice PA (1975) Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res* 35:2375–2382.
- Anker P, Jachertz D, Stroun M, Brögger R, Lederrey C, et al. (1980) The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *J Immunogenet* 7:475–481.
- Anker P, Jachertz D, Maurice PA, Stroun M (1984) Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell Biochem Funct* 2:33–37.
- Anker P, Stroun M (1968) Bacterial nature of radioactive DNA found in tomato plants incubated in the presence of bacterial DNA-3H. *Nature* 219:932–933.
- Gahan PB, Silcox A, Chayen J (1962) Cytoplasmic localization of deoxyribonucleic acid in *Allium cepa*. *Nature* 195:1115–1116.
- Gahan PB, Chayen J (1965) Cytoplasmic deoxyribonucleic acid. *Int Rev Cytol* 18:223–248.
- Pelc SR (1968) Turnover of DNA and function. *Nature* 219:162–163.
- Adams DH (1985) The problem of cytoplasmic DNA: its extrusion/uptake by cultured cells and its possible role in cell-cell information transfer. *Int J Biochem* 17: 1133–1141.
- Stroun M, Anker P, Charles P, Ledoux L (1967) Translocation of DNA of bacterial origin in *Lycopersicon esculentum* by ultra-centrifugation and caesium chloride gradient. *Nature* 215:975–976.
- Gahan PB, Anker P, Stroun M (1973) An autoradiographic study of bacterial DNA in *Lycopersicon esculentum*. *Ann Bot* 37:681–685.
- Benoit J, Leroy P, Vendreley C (1960) Modifications de caractères raciaux du canard Pékin par l'acide désoxyribonucléique de canard khaki Campbell et leur transmission à la descendance. *Biochem Pharmacol* 4:181–194.
- Slotová J, Karpfel Z (1968) The influence of exogenous DNA of different origin on the mitosis and chromosomes of irradiated meristematic cells of *Vicia faba*. *Biol Plant (Praha)* 10:190–198.
- Slotová J, Karpfel Z (1969) Influence of exogenous DNA on ypenyl-treated chromosomes of *Vicia faba* L. *Biol Plant (Praha)* 10:216–225.
- Fahmy OG, Fahmy MJ (1961) Induction of mutations by DNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 191:776–779.
- Gahan PB, Wyndaele R, Mantell SH, Baggetti B (2003) Evidence that direct DNA uptake through cut shoots leads to genetic transformation of *Solanum aviculare* Forst. *Cell Biochem Funct* 21:11–17.
- Fox AS, Yoon SB (1970) DNA-induced transformation in *Drosophila*: locus-specificity and the establishment of transferred stocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 67:1608–1615.
- Nawa S, Yamada MA (1968) Hereditary changes in *Ephesia* after treatment with DNA. *Genetics* 58:573–584.
- Hess D (1969) Versuche zur Transformation an höheren Pflanzen: Wiederholung der Anthocyan-Induktion bei *Petunia* und erste Charakterisierung des transformierenden Prinzips. *Zeit Pflanzenphysiol* 61:286–298.
- Senaratna T, McKersie BD, Kashsa KJ, Procunier JD (1991) Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells. *Plant Sci* 79:223–228.
- Bergsmédh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, et al. (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6407–6411.
- Gahan PB, Stroun M (2010) The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct* 28:529–538.
- Raptis L, Vultur A (2001) Neoplastic transformation assays. *Methods Mol Biol* 165:151–64.
- Perse M, Cerar A (2005) The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol Oncol* 39:61–87.
- Wald M, Olejar T, Pouckova P, Zadinova M (1998) Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in *C57B16* mice with the Lewis lung carcinoma. *Pharmacol Lett* 63:PL237–243.
- Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, et al. (2003) Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 315:122–128.
- Soares MB, Schon E, Efstratiadis A (1985) Rat LINE1: the origin and evolution of a family of long interspersed middle repetitive DNA elements. *J Mol Evol* 22: 117–133.
- Szeles A, Bajalica-Lagercrantz S, Lindblom A, Lushnikova T, Kashuba VI, et al. (1996) Mapping of a new MAP kinase activated protein kinase gene (3PK) to human chromosome band 3p21.2 and ordering of 3PK and two cosmid markers in the 3p22-p21 tumour-suppressor region by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 4:310–313.
- Van der Vaart M, Semenov DV, Kuligina EV, Richter VA, Pretorius JJ (2009) Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Clin Chim Acta* 409:21–27.
- Puszyk WM, Crea F, Old RW (2009) Unequal representation of different unique genomic DNA sequences in the cell-free plasma DNA of individual donors. *Clin Biochem* 42:736–738.
- Taback B, Hoon DS (2004) Circulating nucleic acids in plasma and serum: past, present and future. *Curr Opin Mol Ther* 6:273–278.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11:426–437.
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, et al. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13:58–68.
- Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, et al. (2011) Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular ‘debris’. *Semin Immunopathol* 33:455–67.
- Gaiffe E, Pretet JL, Launay S, Jacquin E, Saumier M, et al. (2012) Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties. *PLoS One* 7: e36766.
- McAllister SS, Gifford AM, Greiner AL, Kelleher SP, Saelzler MP, et al. (2008) Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* 133:994–1005.
- De Lamirande G (1961) Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Nature* 192:52–54.
- Patutina O, Mironova N, Ryabchikova E, Popova N, Nikolin V, et al. (2011) Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie* 93:689–96.
- Shklyayeva OA, Mironova NL, Malkova EM, Taranov OS, Ryabchikova EI, et al. (2008) Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I. *Dokl Biochem Biophys* 420:108–111.
- Beuth J (2008) Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction? *Integr Cancer Ther* 7:311–316.
- Leipner J, Saller R (2000) Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. *Drugs* 59:769–80.