



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Estudio preclínico del tratamiento sistémico con proteasas y
DNasa-I en dos modelos tumorales *in vivo***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MAURICIO MISAEL GONZÁLEZ BALLESTEROS

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alfonso Dueñas González
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Greco Hernández Ramírez
[Instituto de Nacional de Cancerología](#)

Ciudad de México. Abril, 2016



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.

Formato: mgt_1
VoBo Tutor,
Revisión de tesis de Maestría.

20/01/2016
dd-mm-aaaa

Subcomité Académico

Yo Dr.(a): Afonso Dueñas González

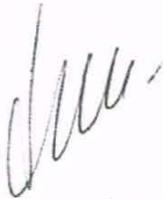
Tutor (asesor de tesis) del estudiante: Mauricio Misael González Ballesteros

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

Estudio preclínico del tratamiento sistémico con proteasas y DNasa-I en dos modelos tumorales *in vivo*

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Maestro en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente


Afonso Dueñas González

Nombre completo y firma

Tutor

PMDCB/364/2016...1a

Mauricio Misael González Ballesteros
Alumno de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

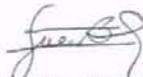
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 15 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio preclínico del tratamiento sistémico con proteasas y DNasa- I en dos modelos tumorales *in vivo***", dirigida por el Dr. Alfonso Dueñas González.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Marcela Lizano Soberón
VOCAL	Dra. María Elena Ibarra Rubio
VOCAL	Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas
VOCAL	Dra. Lucía Guadalupe Taja Chayeb
SECRETARIO	Dra. Elizabeth Langley McCarron

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de febrero de 2016
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo

BGP*lgg

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Los estudios del Biól. Mauricio Misael González Ballesteros fueron apoyados por una beca de maestría de CONACyT (No. de CVU: 589762 y No. de Apoyo: 378740); durante el período del 01/02/2014 al 31/01/2016.

Un agradecimiento al Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo otorgado para el XLVI Curso teórico-práctico de genética humana.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González.

Agradezco al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo proporcionado durante mi periodo de estudios dentro del programa.

Un agradecimiento especial a los miembros del comité tutor que asesoraron el desarrollo de esta tesis y estuvo conformado por:

Dr. Alfonso Dueñas González Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Alejandro Zentella Dehesa Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Greco Hernández Ramírez Instituto de Nacional de Cancerología

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

- Presidente: Dra. Marcela Lizano Soberón
- Secretario: Dra. Elizabeth Langley McCarron
- Vocal: Dra. Lucia Guadalupe Taja Chayeb
- Vocal: Dra. María Elena Ibarra Rubio
- Vocal: Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfonso Dueñas González, por todo el apoyo que me ha brindado, por haberme aceptado en su laboratorio y como tutor de este trabajo.

A la Dra. Catalina Trejo Becerril y al Dr. Enrique Pérez Cárdenas por haber tenido la paciencia necesaria para guiarme siendo accesibles en todo momento, por brindarme su confianza, sus consejos y su apoyo académico durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Lucy por el apoyo y orientación dentro del laboratorio, también por sus consejos y observaciones que complementaron mi trabajo.

Al Dr. José Chanona Vilchis, patólogo del Instituto Nacional de Cancerología, por su apoyo y orientación en el análisis histopatológico de las muestras.

A Leticia García Gutierrez por todo su apoyo y atención brindada durante el posgrado, gracias por todas esas dudas resueltas y apoyo en todos los trámites administrativos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que estuvieron desde el principio apoyando, soportando, acompañando y riendo: Blanca, Desi, Caty, Bety, Dominique, Itzel. Gracias a todos

DEDICATORIA

Porque a pesar de todo el trabajo y esfuerzo, los logros y éxitos no poseen el mismo valor, si no tienes a las personas importantes de tu vida a tu lado, muchas gracias por estar conmigo.

Con todo mi amor y cariño a mi mamá: **María de los Ángeles**

Muchas gracias por ser mi amiga, por escucharme, comprenderme, orientarme, por superar conmigo toda adversidad y creer en mí aun cuando yo dejaba de hacerlo. Por todo tu esfuerzo, trabajo, amor y dedicación, todos mis logros también son tuyos ya que a ti debo lo que soy y seré.

A mi familia, Hipólito, Armando, Maribel, Daniela, Edith, Paola, Ángel y mis primitas por el inmenso amor y apoyo que demostraron en todo momento, por su paciencia y su fortaleza a lo largo de nuestras vidas juntos.

A Viri, con todo mi amor, muchas gracias por siempre estar en cada paso a mi lado, dándome todo tu cariño y comprensión, por cada hermoso momento que hemos vivido en este tiempo y darme ánimos cuando más lo necesitaba.

A mis amigas: a Lore, Lupita y Marlene por todas esas risas, buenos y malos momentos, fiestas, bromas, consejos y su amistad de tantos años ya que a pesar del tiempo y las actividades que nos separan siempre nos apoyaremos.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
MARCO TEÓRICO	3
Cáncer	3
Ácidos nucleicos circulantes	5
Metástasis	7
• Genometástasis	9
Tratamientos contra el cáncer	10
Enzimas con actividad antitumoral	11
• Proteasas	11
• DNasa	12
Modelos para el estudio del cáncer	13
• Glioblastoma (Línea celular C6)	13
• Carcinoma de colon (Línea celular CT26.WT)	14
ANTECEDENTES	15
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
Cultivo celular de las líneas celulares C6 y CT26.WT	20
Curva de inoculación celular de C6 en ratas Wistar	20
Inmunosupresión de las ratas Wistar con Dexametasona	21
Tratamiento enzimático con papaína y DNasa I en ratas Wistar	21
Análisis del desarrollo tumoral y metástasis por micro PET-CT	22
Inoculación subdérmica de células CT26.WT en ratones BALB/c	22
Efecto Antitumoral del Tratamiento Enzimático	23

Colecta de muestras sanguíneas y cortes histológicos.....	24
Cuantificación los niveles de DNA circulante en suero	24
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS	26
Desarrollo tumoral en el modelo de C6	26
Desarrollo tumoral en las ratas Wistar con Dexametasona.....	28
Efecto antitumoral y antimetastásico del tratamiento enzimático en ratas Wistar	29
Análisis del desarrollo tumoral y metástasis por micro PET-CT.....	31
Concentración de DNA circulante en suero de ratas tratadas con papaína y DNasa I...	33
Efecto antitumoral del tratamiento enzimático en ratones BALB/c.....	34
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	45
PERSPECTIVAS	46
ANEXO	48
Análisis histológico de los cortes de las ratas inoculadas con C6	48
Seguimiento de las ratas tratadas con dexametasona	49
Inoculación de células provenientes de la metástasis de C6 en ratón BALB/c nu/nu	50
REFERENCIAS	51

ABREVIATURAS

- **CNAs:** Circulating Nucleic Acids - ácidos nucleicos circulantes
- **DMH:** 1,2-Dimetilhidrazina
- **DMSO:** Dimetil Sulfóxido
- **DNAc:** DNA circulante
- **FDG:** 18 F-Deoxiglucosa
- **NET's:** Trampas Extracelulares de Neutrófilos
- **PBS-EDTA:** Solución Amortiguadora de Fosfatos/Ácido Etilendiaminotetraacético
- **QT / RT:** Quimioterapia / Radioterapia
- **SUV:** Standardized Uptake Value - valor estándar de captación
- **TLG:** Valor de la a Glucólisis Total de la lesión

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que tiene un importante impacto social y económico en el sistema de salud además de ser una de las principales causas de muerte a nivel mundial, lo cual ha generado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

El DNA circulante (DNAc) se han sugerido como un novedoso blanco terapéutico, ya que ha mostrado tener una participación fundamental en la transferencia horizontal del cáncer, en la metástasis y en la inflamación. Se ha reportado que sus niveles séricos se incrementan en pacientes con cáncer, además se ha sugerido que se comporta como un mensajero endócrino o parácrino, capaz de "transfectar" pasivamente a células receptoras y por lo tanto, participar en la progresión del cáncer. Por otro lado existen estudios que sugieren que endonucleasas capaces de degradar el DNA como la DNasa I e incluso proteasas como la papaína, tripsina y quimiotripsina poseen actividad antitumoral y/ó antimetastásica. Sin embargo no se ha analizado el potencial antitumoral de estas enzimas de manera concomitante. Debido a esto, nuestro interés se centró en conocer el efecto del tratamiento sistémico con proteasas y DNasa I en dos modelos tumorales en rata y ratón.

El presente trabajo muestra evidencia de la actividad de las enzimas, ya que se encontró que el tratamiento con Papaína y DNasa I, genera una tendencia a disminuir la incidencia, tamaño y número de metástasis en contraste a las ratas sin tratamiento y se demuestra que el tratamiento con Papaína y DNasa I disminuye significativamente la cantidad de DNAc en suero de las ratas. Por otro lado en el modelo de ratón se encontró que los tratamientos con la mezcla de proteasas: Papaína, Quimiotripsina, Tripsina y DNasa I, el tratamiento con Quimiotripsina, Tripsina y DNasa I e incluso con únicamente la DNasa I, poseen actividad antitumoral significativa. Los datos anteriores sugieren que el tratamiento enzimático con Proteasas y DNasa I podrían tener un papel terapéutico contra el cáncer

MARCO TEÓRICO

Cáncer

Cáncer es el nombre que designa a un conjunto de enfermedades relacionadas, reconociéndose en la actualidad más de 200 tipos diferentes (National Cancer Institute 2015). Este padecimiento es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con la enfermedad (Fig. 1) (Stewart & Wild 2014). En 2012 los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia fueron mama, próstata, pulmón, colon y cervicouterino, mientras que los que mostraron un mayor número de decesos fueron a pulmón, mama, hígado, próstata y colon (World Health Organization 2015).

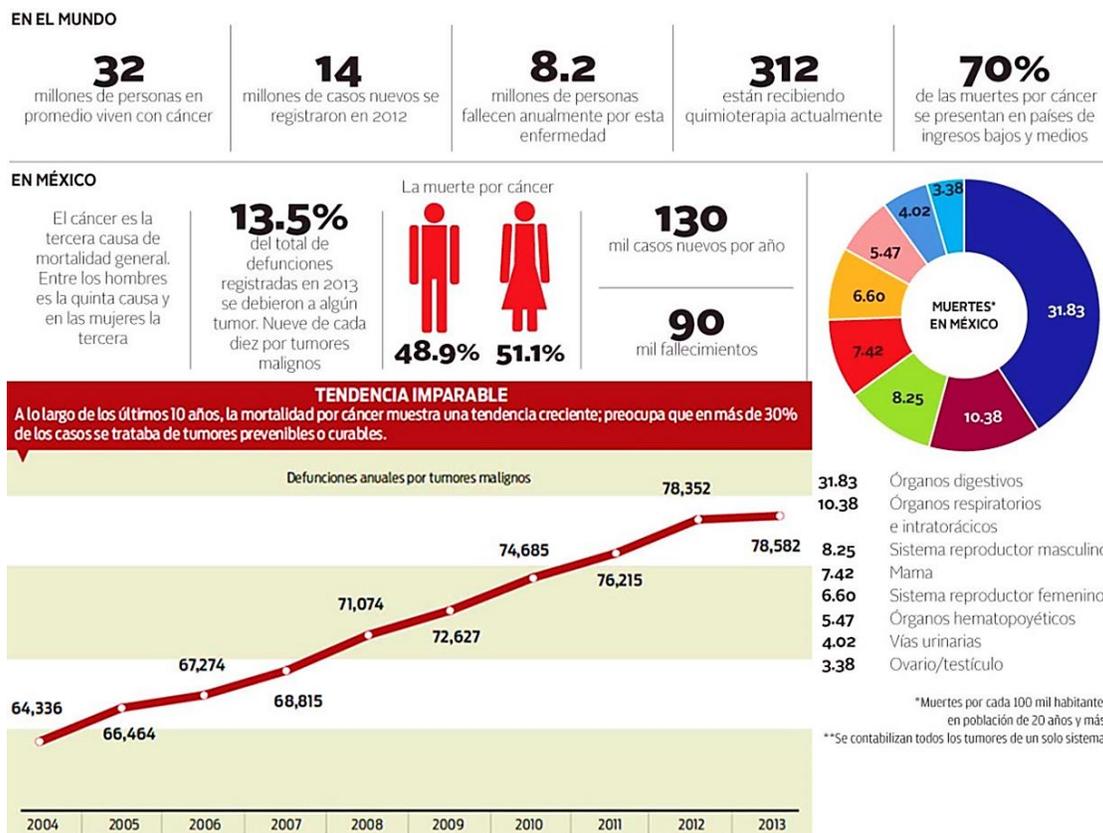


Fig. 1.- Estadísticas del cáncer en México y el resto del mundo. En el 2012 se estimaron alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con la enfermedad en el mundo, mientras que en México se registraron cerca de 130 mil casos nuevos 90 mil millones de muertes en el 2015. Basados en datos del INEGI y de la WHO (Tomado y modificado de Excélsior y Milenio en febrero 2015).

Cada tipo de cáncer ha mostrado ser una enfermedad compleja, heterogénea y multifactorial (Torrades 2003). Las células tumorales poseen una serie de cambios genéticos que interfieren

con el control de procesos fundamentales que llevan a cabo las células, como son la proliferación, la diferenciación o la muerte celular (Godoy 2008, Hanahan & Weinberg 2011). Esta serie de cambios, definidos en el 2011 como "the hallmarks of cancer" por Hanahan y Weinberg, son las características fundamentales que definen a la célula tumoral (Fig. 2), tales como:

1. Independencia de señales de crecimiento.
2. Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento.
3. Angiogénesis sostenida.
4. Evasión de apoptosis.
5. Potencial ilimitado de replicación.
6. Invasión y metástasis.

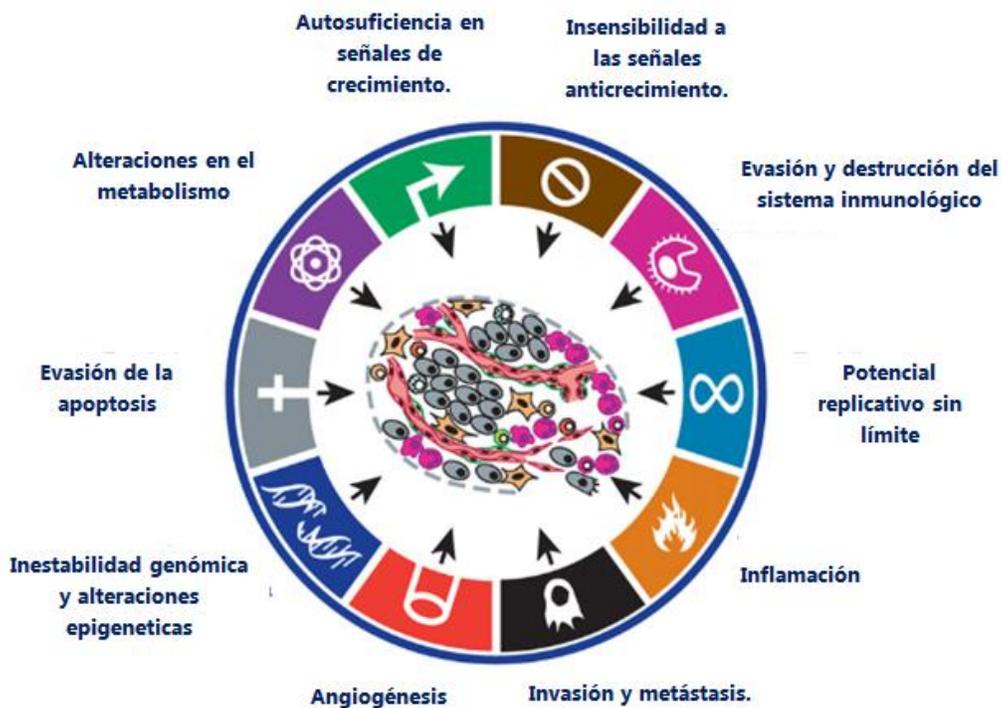
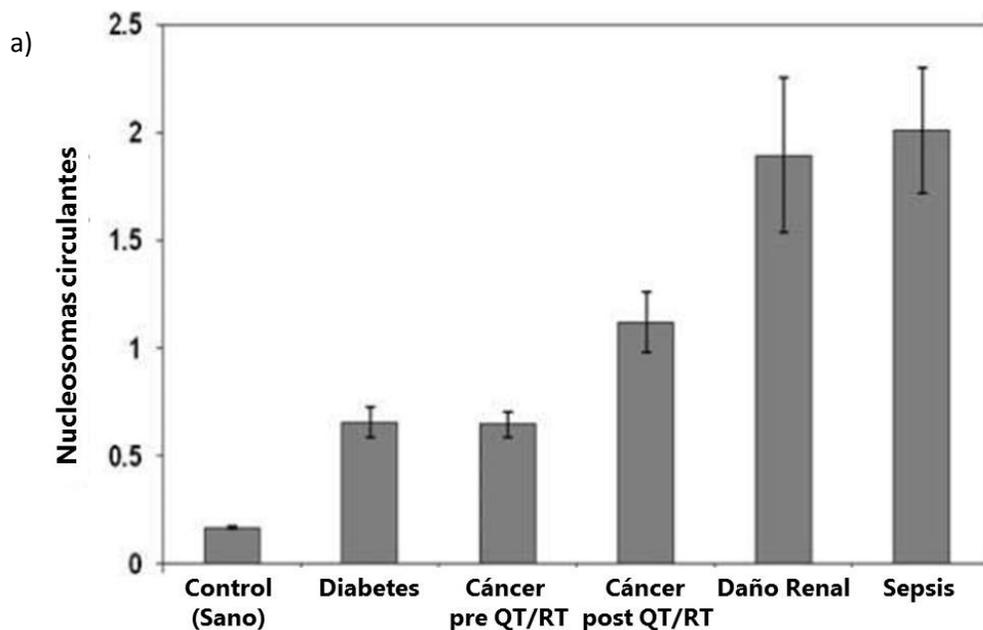


Fig. 2.- "The hallmarks of cancer": se han definido seis características distintivas generales las cuales le otorgan las capacidades necesarias para la progresión y el crecimiento tumoral, permitiendo a las células malignas producir una población que gradualmente, desplazarán a las células normales (Hanahan & Weinberg 2011).

En conjunto estas características les permiten a las células malignas producir una población que, gradualmente, desplazarán a las células normales. Actualmente otra característica muy importante pero poco reconocida en los organismos multicelulares, es la presencia de ácidos nucleicos circulantes (CNAs "circulating nucleic acids") dispersos en fluidos corporales o en circulación, pueden ser tanto DNA como RNA (Mitra *et al.* 2012).

Ácidos nucleicos circulantes

En 1948 Mandel y Métails reportaron por primera vez la presencia de ácidos nucleicos libres en sangre humana. Se ha demostrado su presencia en varios fluidos corporales; tales como sangre, 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 (Peters & Pretorius 2011) y también han sido encontrados *in vitro*, en el medio de cultivo de células normales así como en el de diversas líneas tumorales (Stroun *et al.* 1977). Por otro lado se ha demostrado la presencia de CNAs tanto en sujetos sanos, como en pacientes con diversas patologías (lupus eritematoso, artritis reumatoide, estados inflamatorios, trastornos autoinmunes, sepsis, alzheimer, cáncer, etc.) (Chen *et al.* 2005, Rykova *et al.* 2010, Mittra *et al.* 2012, Serrano-Heras *et al.* 2012). En particular, se ha encontrado que en pacientes con cáncer, la concentración de CNAs se incrementa en comparación con la de individuos sanos (Fig. 5).



b)

	DNA CIRCULANTE EN PLASMA		
Sanos	6 a 37 ng/mL	0 a 40 ng/ml	0 a 60 ng/ml
Cáncer	5 a 821 ng/mL	0 a 3306 ng/ml	0 a 1054 ng/ml

(Fleischhacker *et al.*, 2007) (Laktionov *et al.*, 2004) (Tamkovich *et al.*, 2006)

Fig. 3.- Concentración de ácidos nucleicos circulantes presentes en el suero humano en diversas patologías. a) Los niveles de nucleosomas en suero en sujetos sanos como en diferentes de patologías (media ± Error estándar; 30 sujetos en cada grupo, valores de QT / RT=quimioterapia / radioterapia). b) En pacientes con cáncer, se ha reportado que la concentración del DNAC se incrementa en comparación con individuos sanos. (Laktionov *et al.* 2004, Tamkovich *et al.* 2006, Fleischhacker & Schmidt 2007, Mittra *et al.* 2012)

El estudio de Leon y cols. mostró que pacientes con cáncer presentaban niveles más elevados de DNA en suero que individuos sin patología tumoral (Leon *et al.* 1977). Aunque no encontraron una correlación entre los niveles de DNA circulante (DNAC) y el tamaño o localización del tumor primario, sí detectaron niveles significativamente mayores de DNA en suero de pacientes con metástasis, comparados con aquellos que presentaron una enfermedad localizada. Además, los niveles de DNA descendían después del tratamiento con radioterapia. Por otro lado, la persistencia de niveles elevados de DNA o su incremento, se asoció con una ausencia de respuesta al tratamiento (Leon *et al.* 1977, Chen *et al.* 2005, Zhong *et al.* 2007). Con respecto a lo anterior, diferentes autores señalan el potencial de los CNAs como biomarcadores pronóstico en cáncer (Trejo-Becerril *et al.* 2005, Holdenrieder *et al.* 2008, Schwarzenbach *et al.* 2011, Crowley *et al.* 2013, Holdenrieder 2015).

Por otro lado no solo los niveles se encuentran alterados, también se ha reportado que el DNA circulante comparte características con el DNA de las células del tumor del que se origina, como la presencia de oncogenes, alteración en microsatélites, metilaciones en el DNA y mutaciones en genes supresores (Kopreski *et al.* 1997, Fleischhacker & Schmidt 2007, Suzuki *et al.* 2008, Schwarzenbach *et al.* 2011, Serrano-Heras *et al.* 2012).

Se han reportado diferentes formas en las que estos CNAs se asocian, particularmente el DNAC puede "viajar" en los fluidos corporales de las siguientes maneras: **a)** como DNA desnudo; **b)** unido a proteínas del plasma/suero; **c)** unido a la superficie celular; **d)** empaquetado en vesículas con membrana, como los exosomas, las micropartículas y los cuerpos apoptóticos; **e)** asociado a histonas en forma de nucleosomas, como mono u oligonucleosomas; ó **f)** en un complejo de lipoproteínas denominado "virtosoma" (Gahan & Stroun 2010, Rykova *et al.* 2012).

Los mecanismos mediante los cuales estos ácidos nucleicos son exportados al exterior de la célula, aún son desconocidos; pero se ha sugerido que es a través de procesos de muerte celular como apoptosis y necrosis. Además, se ha propuesto la secreción activa como otra fuente potencial de CNAs (Mendel *et al.* 1948, Stroun *et al.* 2000, Stroun *et al.* 2001, Schwarzenbach *et al.* 2011, Mitra *et al.* 2012). Asimismo, el mecanismo mediante el cual el DNA circulante se introduce en las células sigue siendo controversial, ya que algunos autores sugieren que el complejo DNA circulante/proteínas se trasloca a través de la membrana, mediante un proceso que no involucra endocitosis y no requiere de la utilización de energía. Otros señalan la activación de la vía de señalización del receptor Toll, o bien la presencia de una proteína asociada a membrana la cual se une el DNA, denominada proteína MNAB entre otras (Siess *et al.* 2000, Chelobanov *et al.* 2006, Dalpke *et al.* 2006).

Estos ácidos nucleicos circulantes han mostrado tener una participación fundamental en la progresión del cáncer, la inflamación y la metástasis (Kopreski *et al.* 1997, Tsang & Lo 2007, Garcia-Olmo *et al.* 2010, Jung *et al.* 2010, Trejo-Becerril *et al.* 2012). En particular, la metástasis representa el principal problema clínico del cáncer, ya que el 90-95% de los pacientes con esta enfermedad mueren por metástasis, y es un proceso extraordinariamente complejo que actualmente se sigue tratando de comprender (Hunter *et al.* 2008, Macías 2009); esto es debido, en parte, a la enorme complejidad de la cascada metastásica, que involucra no sólo a las características biológicas de la célula tumoral, sino también sus interacciones con el resto del organismo en el que reside.

Metástasis

Las células malignas son capaces de propagarse por el cuerpo debido a dos mecanismos: invasión y metástasis. La invasión se define como el desplazamiento de una célula a un sitio o tejido ocupado normalmente por otro tipo de célula, generalmente atravesando una membrana basal. Mientras que la metástasis es el establecimiento de una célula tumoral en un órgano diferente al de origen, el cual no está conectado físicamente. Estos dos eventos son las principales causas de muerte por cáncer ya que permite que las células malignas se dispersen, lo cual dificulta diversos aspectos del tratamiento de ésta enfermedad (Mareel & Leroy 2003, Chin *et al.* 2005, Yamaguchi *et al.* 2005). Cada tipo de cáncer se caracteriza por tener un potencial invasivo y metastásico propio, esto refleja la heterogeneidad de las enfermedades que constituyen al cáncer (Godoy 2008).

A pesar de los estudios originales que señalaban al cáncer como un fenómeno progresivo que culminaba con la metástasis, existen ahora innumerables evidencias de que la invasión y la metástasis son fenómenos que se pueden presentar en fases muy tempranas del desarrollo de la enfermedad, en muchas ocasiones aún antes de que se detecte el tumor primario (Pantel & Brakenhoff 2004). Se han propuesto diferentes hipótesis que intentan dar una explicación a la aparición de metástasis, tales como: 1) Compartimiento transitorio; 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 (Fig. 4) (Weigelt *et al.* 2005).

Actualmente, una de las teorías más aceptadas es: "el modelo de progresión"; 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 (Nowell 1976, Fidler 2003, Hunter *et al.* 2008). Sin embargo, se ha propuesto una aproximación alternativa,

mediante “la transferencia horizontal del cáncer” esta hipótesis se ha considerado un modelo de metástasis por transferencia génica (Stroun *et al.* 1971, Weigelt *et al.* 2005) y ha sido reconocida como un posible mecanismo de transformación tumoral de células a distancia (Hunter *et al.* 2008). El sustento de esta segunda hipótesis de diseminación metastásica son los ácidos nucleicos circulantes en suero y plasma, y en los últimos años su estudio ha despertado un gran interés.

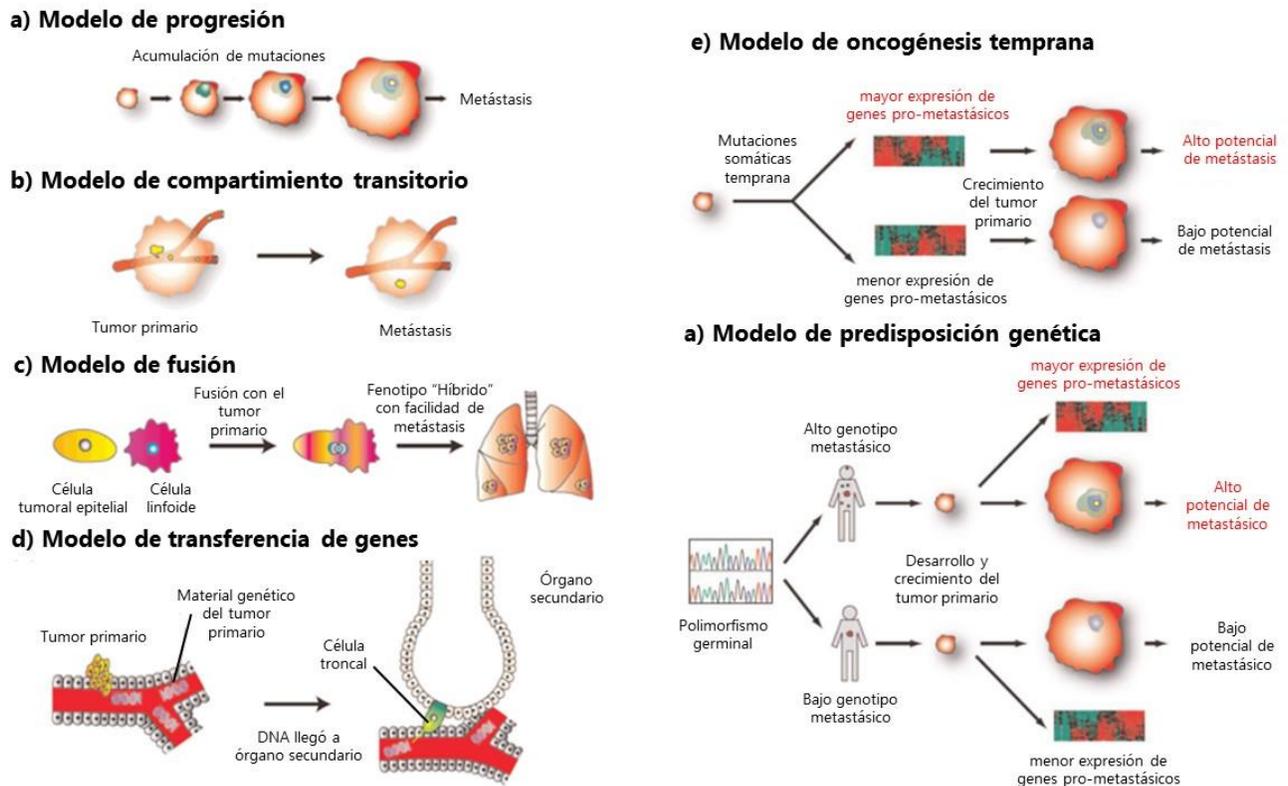


Fig. 4.- Modelos propuestos para la comprensión de la metástasis. (A) Modelo de Progresión. Una neoplasia primaria gana un fenotipo progresivamente más metastásico a través de una acumulación de mutaciones somáticas. **(B) modelo de compartimentos transitorios.** Todas las células viables en un tumor adquieren capacidad metastásica, pero debido a eventos epigenéticos de posición y/o al azar, sólo una pequeña fracción son capaces de completar el proceso en un momento dado. **(C) Modelo de fusión.** Para obtener un fenotipo metastásico, una célula tumoral debe adquirir ciertas características de las células linfoides (por ejemplo, la degradación proteolítica, la capacidad de intra y extravasado). Este fenotipo se consigue mediante transducción nuclear con células de origen mieloide. **(D) Modelo de transferencia de genes.** Una característica de malignidad es la presencia de DNA del tumor en el torrente sanguíneo, este DNA lleva las mutaciones asociados con la neoplasia, y posteriormente, el DNA tumoral es absorbido por las células madre en el órgano distante, dotando a la célula madre con propiedades malignas. **(E) Modelo oncogénesis temprana.** El potencial metastásico de cualquier tumor primario se encuentra al principio de su evolución, presumiblemente como consecuencia de una mutación somática. **(F) Modelo de predisposición genética.** El potencial metastásico de cualquier tumor primario se ve alterado por el fondo genético sobre el que se presenta. Es decir, un individuo será más o menos susceptible a la diseminación del tumor como consecuencia de polimorfismo constitucional.

- **Genometástasis**

La base de la hipótesis surge desde los años 60 con trabajos como los de Gartler, donde se demuestra que células eucariontes bajo condiciones experimentales, pueden tomar DNA y RNA exógeno (Gartler 1959). Por otro lado, Szybalski y colaboradores reportaron que el DNA circulante que es transferido a células de mamíferos puede ser replicado, transcrito y traducido en proteínas (Szybalska & Szybalski 1962). Consecutivamente Rogers y colaboradores reportaron que la activación de linfocitos humanos con fitohemaglutinina (PHA) origina que éstos dupliquen selectivamente una porción limitada de su genoma, la cual es secretada y detectada en el medio de cultivo (Rogers *et al.* 1972, Rogers & Kerstiens 1981).

Posteriormente, experimentos *in vitro* mostraron que células tumorales pueden liberar espontáneamente partículas que podían transformar células normales en cultivo (Anker *et al.* 1994). Años después, Holmgren y colaboradores mostraron que partículas apoptóticas podían transferir su contenido genético a otras células (transferencia horizontal), en las que además, podían expresarse (Holmgren *et al.* 1999), y que esta transfección era estable en el tiempo, dando lugar a aneuploidías y a la acumulación de cambios genéticos necesarios para la formación tumoral (Bergsmedh *et al.* 2001).

En 1999, García Olmo demostró, sobre un modelo de cáncer colorectal en rata, que el plasma de una rata con tumor era capaz de transfectar de forma estable células en cultivo. De hecho, es con este experimento, que se propone la teoría de la "Genometástasis" (García-Olmo *et al.* 1999, García-Olmo *et al.* 2000). Esta teoría planteó una posible nueva vía de metástasis, mediante la cual nuevas colonias tumorales se producirían por la transfección de células localizadas en órganos diana a distancia, mediante oncogenes dominantes derivados del tumor primario, y que circulan en el plasma. Esto ha sido reconocido como un posible mecanismo de transformación tumoral de células a distancia (Chen *et al.* 2005, Weigelt *et al.* 2005, Hunter *et al.* 2008, García-Olmo & García-Olmo 2013).

Otros autores han podido demostrar mecanismos biológicos de transferencia horizontal de genes desde células malignas (Bergsmedh *et al.* 2001) y en el trabajo de la Dra. Trejo y colaboradores confirmaron lo propuesto por García Olmo, al mostrar que células neoplásicas al ser expuestas al suero de pacientes con cáncer de colon (transfección pasiva) son capaces de transformarse, lo cual se corroboró en un modelo experimental *in vivo*, demostrándose el papel promotor del DNA circulante. Dicho modelo consistió en tratar ratas Wistar con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) cuyo blanco es el colon y posteriormente inocularlas subcutáneamente con células humanas de cáncer de colon SW480 como fuente de DNA circulante. Se observó claramente que en aquellos animales que fueron tratados con el carcinógeno e inoculados con las células SW480, generaron un mayor número de tumores en colon, con mayor crecimiento y con presencia tumoral en otros tejidos, a

diferencia del grupo de animales que sólo fueron tratados con el carcinógeno o el grupo que sólo fue inoculado con las células humanas SW480. Así mismo, también se encontraron secuencias humanas de K-ras mutado, RAB30 y secuencias repetitivas ALU, en los tumores de las ratas inyectadas con las células humanas SW480; a diferencia de los tumores de las ratas control previamente descritos (Trejo-Becerril *et al.* 2012).

Estos hallazgos han sentado las bases para el estudio tanto de los procesos de liberación de ácidos nucleicos, así como en el desarrollo de métodos para la detección temprana del cáncer y determinar su participación con la progresión de la enfermedad cancerosa, líneas de investigación que continuarán abiertas, ya que su estudio quizá podría permitir generar nuevas alternativas terapéuticas.

Tratamientos contra el cáncer

El tratamiento del cáncer tiene tres pilares fundamentales: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Para decidir el tipo o combinación de tratamientos que se emplearán, es necesario clasificar el tumor teniendo en cuenta las características de las células que lo componen, según su similitud con el tejido original, el número de mitosis, las características de las células (benigno, maligno o intermedio) y el compromiso de los tejidos vecinos o metástasis en los diferentes estadios clínicos que van del 0 al 4 (King & Robins 2006, Noriega & Limón 2008).

- **Cirugía:** es el tratamiento más antiguo para el cáncer. El tratamiento quirúrgico del cáncer ha cambiado dramáticamente en las últimas décadas debido a la mejoría en las técnicas quirúrgicas y al mejor conocimiento del comportamiento biológico, así como el entendimiento de los patrones de diseminación de las diferentes neoplasias (Macías 2009). La cirugía puede ser un método simple y seguro para la curación de pacientes con tumores sólidos cuando están confinados al sitio anatómico de origen (King & Robins 2006, Macías 2009).
- **Radioterapia:** la Radio-Oncología es una disciplina de la medicina clínica para el manejo de los pacientes con cáncer y otras enfermedades (benignas) con radiación ionizante (Macías 2009). Esta técnica se puede utilizar a varios niveles para destruir a las células transformadas o para prevenir que las células normales o malignas proliferen y formen tumores. En éste tratamiento se llegan a eliminar a todas las células que se encuentran ciclando, incluyendo a células no tumorales.

- **Quimioterapia:** el término "quimioterapia" es convencionalmente confinado al uso de medicamentos citotóxicos o citostáticos que destruyen las células tumorales, o evitan que proliferen respectivamente. La eficacia de tales medicamentos depende de la concentración de las drogas que llegan al tumor, la duración de la exposición, y la proporción de la población que está proliferando. Esta acción no se limita a las células malignas ya que afecta a las células que proliferan en todo el cuerpo, dando como resultado numerosos efectos adversos (King & Robins 2006, Macías 2009).

Actualmente el desarrollo de medicamentos contra el cáncer se basa en alteraciones moleculares en los tumores como blancos terapéuticos. En general, este enfoque ha dado modesta mejoras en la supervivencia (Vera-Badillo *et al.* 2013) sin embargo, está claro que se necesitan nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer.

Enzimas con actividad antitumoral

Estudios recientes muestran el valor pronóstico y diagnóstico de los ácidos nucleicos circulantes en pacientes con cáncer (Schwarzenbach *et al.* 2011, Mitra *et al.* 2012); lo que abre nuevas posibilidades para un novedoso desarrollo de fármacos. En los últimos años se ha incrementado el uso de enzimas, debido a la alta afinidad y especificidad de sustratos, lo que los hace buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades, entre ellos el cáncer (Becker 1977, Vellard 2003). De hecho, hay múltiples estudios que sugieren que algunas proteasas como la papaína y endonucleasas como la DNasa I poseen actividad antitumoral y/o antimetastásicas (Wald *et al.* 1998, Novak & Trnka 2005, Alcazar-Leyva *et al.* 2009, Patutina *et al.* 2011).

- ***Proteasas***

Son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. En suero, las proteasas exógenas preservan su actividad proteolítica y participan en la regulación y degradación de una serie de factores relacionados con la reacción inflamatoria; llevan a cabo la proteólisis específica de citosinas, inhiben la expresión de las moléculas de adhesión (que durante el curso de enfermedades neoplásicas se expresan en la superficie de células tumorales, entre otras), inhiben la formación de complejos inmunes circulantes etc. (Lopez-Otin & Bond 2008). Debido a que las proteasas participan en una amplia gama de procesos biológicos, el valor de las proteasas en la terapia antitumoral puede ser considerada desde muchas perspectivas (Wald *et al.* 2001, Lopez-Otin & Bond 2008). Algunos autores sugieren que las cisteín-proteasas como la tripsina, la quimotripsina, la bromelina y la papaína, o la combinación de éstas, sean empleadas como terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer (Novak & Trnka 2005), ya

que se han administrado oralmente para reducir los efectos secundarios de la quimioterapia en cáncer de mama y colorectal (Leipner & Saller 2000). Se ha reportado que la papaína en estudios *in vitro*, es capaz de disminuir la proliferación, migración celular y la angiogénesis (Mohr & Desser 2013), además de reducir la metástasis e incrementar la supervivencia del paciente con cáncer (Wald *et al.* 2001).

- ***DNasa I***

La DNasa I es una endonucleasa que genera rupturas no específicas en el DNA para liberar di-, tri- y oligonucleótidos fosforilados con extremos terminales 5'-fosforilados y 3'-hidroxilados. La DNasa I, se encuentra principalmente en órganos como el páncreas y/o las glándulas parótidas y se secreta en el tracto digestivo para hidrolizar DNA exógeno. Actúa sobre el DNA de una y doble cadena, participa en los procesos de reparación, replicación y degradación del DNA durante el ciclo celular y se ha sugerido como una de las endonucleasas responsables de la fragmentación del DNA durante la apoptosis (Taper *et al.* 2001, Valle *et al.* 2008).

En 1950, Wroblewski y Bodansky fueron los primeros en reportar una reducción de los niveles de DNasa I en la sangre de pacientes con cáncer, en comparación con individuos sanos y personas con otras condiciones (Wróblewski & Bodansky 1950). Posteriormente, diversos estudios mostraron que pacientes con diferentes tipos de cáncer presentan una disminución en la actividad de la DNasa I, por ejemplo, en pacientes con cáncer de mama la disminución de su actividad podría explicar los incrementos en los niveles de DNA circulante en pacientes con cáncer (Fig. 5) (Ramandanis *et al.* 1982, Tamkovich *et al.* 2006).

En cuanto a su actividad en modelos de cáncer, se ha reportado que la DNasa I disminuye significativamente tanto la invasión como la metástasis, tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo* respectivamente (Sugihara *et al.* 1993, Patutina *et al.* 2011, Wen *et al.* 2013). Además de tener actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer (Alcazar-Leyva *et al.* 2009), y reducir el RNAm de IL-8 y los niveles de proteína IL-8 secretada, la cual es una proteína importante en procesos de inflamación y angiogénesis (Wen *et al.* 2013).

Individuos sanos			Pacientes con cáncer		
n	DNAc (ng/mL)	Actividad de DNasa (U/mL)	n	DNAc (ng/mL)	Actividad de DNasa (U/mL)
Mujeres			Cáncer de colon		
1	24	0.276	1	96	0
2	10	0.49	2	594	0
3	38	0.498	3	408	0
4	10	0.098	4	256	0
5	0	0.902	5	280	0
6	24	0.59	6	476	0
7	0	0.336	7	204	0
8	0	0.15	8	100	0
9	0	0.1	9	0	0
10	0	0.614	Cáncer de estómago		
Hombres			1	556	0
1	41	0.256	2	0	0
2	50	0.216	3	388	0
3	41	0.249	4	852	0
4	39	0.104	5	64	0
5	43	0.425	6	90	0
6	66	0.425	7	60	0
7	39	0.366	8	356	0
8	0	0.472	9	1,054	0
9	0	0.384			
10	11	0.168			

Fig. 5.- Concentración en circulación actividad DNasa y DNA en plasma de sujetos sanos y pacientes con cáncer. Una posible causa de estos niveles elevados de DNAc son los bajos niveles de actividad de la DNasa en circulación tal como lo reporta Tamkovich en 2006 donde muestra que la actividad de la DNasa en pacientes con cáncer se encuentra disminuida en comparación con los donadores sanos.

Modelos para el estudio del cáncer

En paralelo con la adquisición del conocimiento de las diferentes fisiologías y patologías en el área humana y animal, se desarrollaron modelos animales, que resultaron ser una herramienta fundamental para el conocimiento y comprensión de la fisiología y patogénesis de diferentes enfermedades y las posibles terapias (Lomónaco 2012).

Un modelo ideal para el estudio del cáncer debe de ser clínicamente relevante, reproducible y representativo para la población humana. Dentro de los modelos que son utilizados para el estudio del cáncer, están los tumores espontáneos, los inducidos genéticamente o con químicos, los singénicos y xenoinjertos; todos estos modelos tienen la finalidad de observar interacción en los sistemas biológicos, entender la metástasis de los tumores primarios y observar los mecanismos de acción de los tratamientos que pudieran detener la progresión del cáncer, el crecimiento y la diseminación del tumor, o bien el poder prolongar la sobrevivencia del paciente (Stokes 2002, Hibberd *et al.* 2013).

- **Glioblastoma (Línea celular C6)**

Las líneas de células tumorales, sirven como sistemas modelo para el estudio "in vitro" del cáncer. El clon C6 ha sido aislado de un glioma de rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, el cual fue inducido por la inyección del carcinógeno N-metil-N-nitrosourea, y posteriormente

sometido a una serie de cultivos alternados; teniendo como característica una tasa de crecimiento muy elevada, con muy pocas uniones comunicantes (Benda *et al.* 1968). El estudio histológico de los tumores generados con la línea celular C6 ha mostrado varias características morfológicas malignas, entre las que destacan el pleiomorfismo nuclear, índice mitótico alto, infiltración a través de parénquima, neovascularización y necrosis (San-Galli *et al.* 1989). Este modelo ha sido utilizado para evaluar la eficacia de tratamientos como la quimioterapia, terapia angiogénica, inhibidores de proteosomas, tratamientos con toxinas, radiación, terapia fotodinámica, terapia oncogénica viral y terapia génica (Wolfe *et al.* 1980, Barth & Kaur 2009). Sin embargo, éste modelo se debe de tomar con ciertas limitantes, ya que está reportado que ésta línea celular genera tumores, pero con regresión tumoral en un 70% de la población a las 3 semanas de su inoculación (Watanabe *et al.* 2002, Vince *et al.* 2004).

- ***Carcinoma de colon (Línea celular CT26.WT)***

La línea celular CT26 se desarrolló en 1975 mediante la exposición de ratones BALB/c con N-nitroso-N-metiluretano, resultando en un carcinoma de rápido crecimiento de grado IV que se implanta con facilidad y genera metástasis (Griswold & Corbett 1975). Se ha utilizado en más de 500 estudios publicados, y la línea celular de carcinoma de colon CT26 es una de las líneas celulares más utilizadas para el desarrollo de fármacos. Tiene una alta tasa de replicación celular. Numerosos agentes citotóxicos, así como agentes terapéuticos dirigidos a vías de señalización específicas, se han estudiado con estas células (Houdt *et al.* 2010, Deng *et al.* 2013). En esta línea celular se encuentra mutado homocigotamente Kras en p.G12D (Castle *et al.* 2014).

ANTECEDENTES

Los CNAs se han detectado tanto en sujetos sanos, como en pacientes con diversas patologías (diferentes estados inflamatorios, trastornos autoinmunes, sepsis, alzheimer, cáncer, etc.) (Rykova *et al.* 2010, Mittra *et al.* 2012). En particular, se ha encontrado que en pacientes con cáncer, la concentración de CNAs se incrementa en comparación con la de individuos sanos.

Diversas investigaciones en el área oncológica, han demostrado que en modelos murinos de cáncer, parte del DNAC proviene de tumores primarios y se ha sugerido que éste podría estar involucrado en la tumorigénesis y desarrollo de metástasis, mediante su transfección a células susceptibles (Garcia-Olmo *et al.* 2010, Trejo-Becerril *et al.* 2012). De tal forma, este DNA circulante es un agente transformante que incrementa el intercambio de información genética entre células eucariotas, favoreciendo la metástasis (Trejo-Becerril *et al.* 2012). Así mismo, se conoce que la administración de las proteasas Papaína, Tripsina y Quimiotripsina en ratones con carcinomas, tanto murinos como humanos, aumentan la sobrevivencia y detienen los procesos cancerígenos (Wald *et al.* 2001); mientras que el tratamiento con bajas concentraciones de DNasas y RNasas inhibe el progreso y diseminación del tumor primario (Shklyaeva *et al.* 2008, Patutina *et al.* 2011).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la degradación del DNA circulante presente en el sobrenadante de líneas celulares tumorales, mediante el uso de una mezcla de proteasas (tripsina, quimotripsina y papaína) y DNasa I elimina su potencial transformante (Fig. 7), y se requiere del uso concomitante de esta mezcla de proteasas y DNasa I debido a que el DNA circulante está protegido por un complejo lipoprotéico. También se demostró que el tratamiento sistémico con proteasas más DNasa I, tiene efecto antitumoral en un modelo de ratones inmunodeficientes injertados con una línea celular maligna humana (Fig. 7). Además se demostró *in vitro* que la proteasa con mayor actividad de degradación era la papaína (Fig. 8). Debido a ello y con el fin de simplificar la administración de las enzimas, en los experimentos subsecuentes se decidió utilizar únicamente a la Papaína y DNasa I. Sin embargo, no observamos ningún efecto en el tamaño del tumor primario en un modelo tumoral de rata (Fig. 9), por lo que se replanteó la pregunta y se decidió determinar qué proteasa o mezcla de proteasas posee la mayor actividad antitumoral.

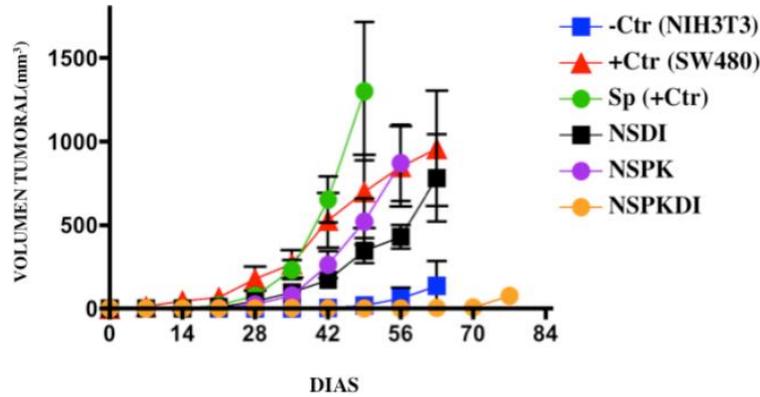


Fig. 6.- Degradación del DNAc elimina su potencial de tumorigénesis. Se observa el desarrollo tumoral en ratones BALB/c inoculados con diferentes grupos de células tales como control positivo (+Ctr) se inoculó la línea celular parental humana SW480 (cáncer de colon), como control negativo (-Ctr) se usó la línea celular parental murina NIH3T3 (células inmortalizadas no tumorales) y como demostración de trasformación, se inocularon células NIH3T3 expuestas al sobrenadante de SW480 (Sp); y los grupos de estudio, que fueron células NIH3T3 expuestas al sobrenadante de SW480 previamente tratado con distintas enzimas: NSPK (NIH3T3 + sobrenadante y tratado con proteasas), NSDI (NIH3T3 + sobrenadante y tratado con DNasa I) y NSPKDI (NIH3T3 + sobrenadante y tratado con Proteasas + DNasa I).

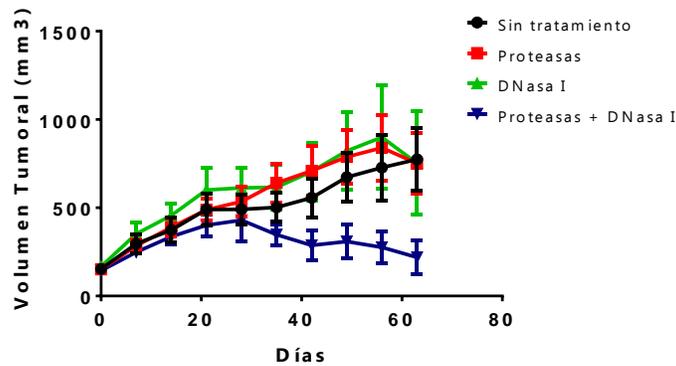


Fig. 7.- Efecto sobre el volumen de tratamientos enzimáticos aplicados en ratones atímicos. En ésta gráfica se muestra el efecto que tiene el tratamiento con una mezcla de enzimas: Proteasas (papaína, quimiotripsina, tripsina) + DNasa I sobre el crecimiento tumoral en ratones atímicos.



Fig. 8.- Degradación de proteínas séricas mediante el uso de proteasas. (P: papaína, Q: quimiotripsina T: tripsina) se muestra que la papaína es quien tiene una mayor actividad de degradación.

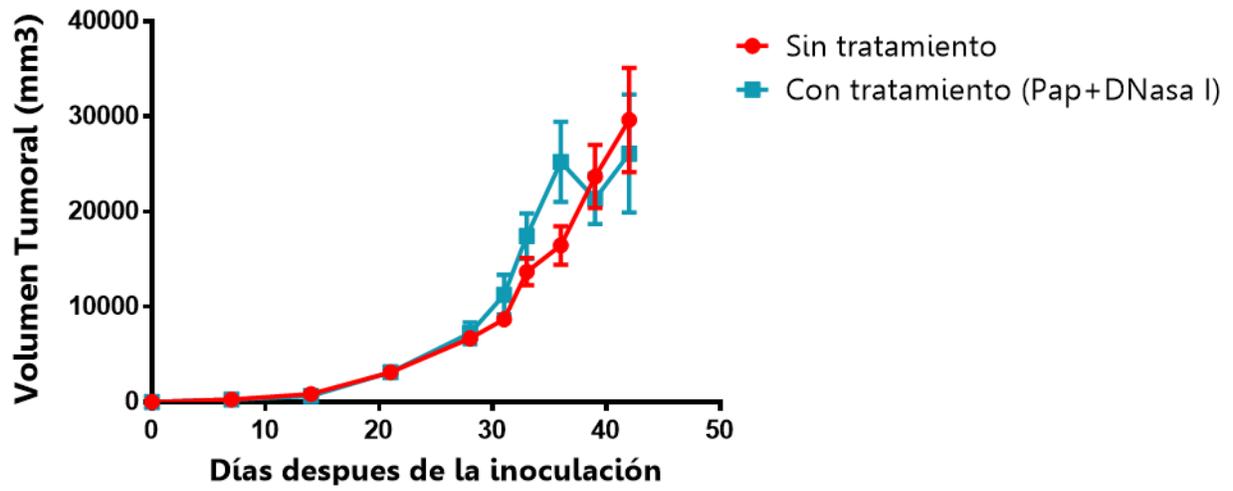


Fig. 9.- Seguimiento del volumen tumoral de las ratas tratadas con dexametasona e inoculadas con C6, y posteriormente divididas en dos grupos: con tratamiento (azul) y sin tratamiento (rojo) no se observa respuesta en el tamaño tumoral con el tratamiento (papaina +DNasa I).

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento del cáncer continúa siendo insuficiente y el DNA circulante podría ser un novedoso blanco terapéutico. Por lo anterior, es necesario investigar si la degradación de este material genético, mediante el uso sistémico de proteasas y la DNasa I, es de valor terapéutico.

HIPÓTESIS

Se ha establecido que el DNA circulante, participa en la progresión del cáncer. Con base en lo anterior, se espera que la administración sistémica de una mezcla de proteasas y DNasa I degraden el DNA circulante y por lo tanto no haya progresión tumoral en modelos "in vivo".

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento sistémico con proteasas y DNasa I en un modelo tumoral de rata Wistar (línea celular C6) y otro en ratón BALB/c (línea celular CT26.WT).

Objetivos particulares

1. Establecer un modelo tumoral sin regresión espontánea y capaz de generar metástasis a partir de la línea celular C6 en ratas Wistar.
2. Determinar el efecto de la mezcla de papaína y DNasa I en las metástasis y sobre el tumor primario en un modelo de rata con células C6.
3. Cuantificar los niveles de DNA circulante en plasma sanguíneo de las ratas tratadas con las enzimas.
4. Evaluar el efecto antitumoral de la mezcla de proteasas y DNasa I en un modelo de carcinoma de colon en ratones BALB/c.
5. Determinar qué componentes de la combinación poseen mayor actividad antitumoral.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Debido a que el modelo de C6 es inestable y genera regresión tumoral espontánea en 70% de los animales inoculados, se decidió mejorar el modelo mediante la inmunosupresión de las ratas Wistar con una administración diaria de dexametasona. Por otra parte, encontramos que la proteasa con mayor actividad de degradación era la papaína, por lo cual se decidió evaluar el efecto de las enzimas (papaína y DNasa I) sobre el tumor primario y en las metástasis, mediante el monitoreo del volumen tumoral utilizando técnicas de imagen molecular con un equipo de microPET-CT. Además con el fin de determinar qué proteasa o mezcla de proteasas posee la mayor actividad antitumoral, se evaluó el efecto de cada combinación de proteasas y DNasa I en un modelo de carcinoma de colon con la línea celular CT26.WT en ratones BALB/c. Al final de los tratamientos se colectaron muestras sanguíneas y se evaluó la concentración de DNAc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular de las líneas celulares C6 y CT26.WT

La línea celular C6 se aisló de un glioma de rata Wistar inducido por la inyección del carcinógeno N-nitrosometilurea (Benda *et al.* 1968) fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, E.U.A.) # de catálogo CCL-107. Las células C6 se cultivaron en botellas de 175 cm² (Corning, E.U.A.), con 25 mL de medio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, E.U.A.) y con un 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, E.U.A.). Mientras que la línea celular CT26.WT fue obtenida de la ATCC # de catálogo CRL-2638, esta fue desarrollada en 1975 mediante la exposición de ratones BALB/c con N-nitroso-N-metiluretano, resultando en un carcinoma de rápido crecimiento grado IV que se implanta con facilidad y con capacidad de generar metástasis (Griswold & Corbett 1975). Fueron cultivadas en botellas de 175 cm³ (Corning, E.U.A.), con 25 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; Gibco, E.U.A.) y con un 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, E.U.A.). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, con humedad relativa del 98% y una atmósfera con un 5% de CO₂ en una incubadora (Thermo Forma Series II), cambiando el medio de cultivo cada 48 horas.

Curva de inoculación celular de C6 en ratas Wistar

Se usaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho de aproximadamente 350 a 500 g de peso de entre 5 a 6 meses de edad, obtenidas de Harlan (UNAM-Harlan México). Antes y durante los experimentos, los animales se mantuvieron con alimento para rata y agua *ad libitum*, a una temperatura de 22°C, un fotoperíodo de 12 horas. Se realizaron inoculaciones subdérmicas de las células de C6 con el objetivo de determinar el número ideal para evitar la regresión espontánea, dividiéndose en diferentes grupos: A) 6 ratas inoculadas con 1x10⁶ de células en cada flanco con la línea celular C6. B) 6 ratas inoculadas 2x10⁶ de células en cada flanco, el grupo C) con 3 ratas con 6x10⁶. Posteriormente, se realizó otro grupo: D) con 5 ratas se les inocularon 6x10⁶ de células de C6 con una mezcla de matrigel 1:1 (BD Bioscience) debido a que se ha reportado que favorece el establecimiento y desarrollo tumoral al inyectarse de esa manera (Bao *et al.* 1994, Fridman *et al.* 2012). Todas las células fueron colectadas de cultivos al 75% de confluencia y lavadas con una solución buffer de fosfatos-ácido etilendiaminotetraacético (PBS-EDTA) y Tripsina (Sigma-Aldrich, E.U.A.) y centrifugadas en (Biofuge primo R, Heraeus # de rotor 7591) a 1000 RPM por 5 min. Se lavaron 3 veces con PBS posteriormente las células fueron contadas con un hemocitómetro (TC10 BioRad); una vez contadas se resuspendieron en un volumen de 200µL y fueron inoculadas por vía subdérmica en ambos flancos del lomo de la rata.

Después de la inoculación los tumores fueron medidos cada semana y se determinó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula (Kjønniksen *et al.* 1989):

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

Donde

VT: Volumen del tumor (mm³)

D: Diámetro mayor (mm)

d: Diámetro menor (mm)

Inmunosupresión de las ratas Wistar con Dexametasona

Con el objetivo de disminuir la tasa de regresión de desarrollo tumoral, ratas Wistar de 250 a 450 g de peso de 6 meses de edad, fueron inmunosuprimidas mediante la administración de dexametasona (Laboratorios PiSA, México) siguiendo la metodología descrita por Jin y colaboradores con modificaciones (Jin *et al.* 2014). Para ello, se inyectó diario por vía intramuscular la dosis 2.5 mg/día, durante una semana antes de la inoculación celular de C6 (6x10⁶ de células) y una semana después de la inoculación de manera alternante, ya que la dexametasona genera una pérdida de peso en los animales aproximadamente el 30% de su peso.

Tratamiento enzimático con papaína y DNasa I en ratas Wistar

Ya establecido el modelo tumoral en las ratas Wistar, se analizó el efecto del tratamiento enzimático en el desarrollo tumoral. Para ello, 24 ratas Wistar con tumor se dividieron en 2 grupos de manera aleatoria, cada grupo con una n=12.

Los grupos consistieron en lo siguiente:

A) Control: Sin tratamiento, administración únicamente con solución salina (NaCl 0.9%)

B) Con tratamiento: inyectadas con Papaína (25 mg/Kg) + DNasa I (2.3mg/Kg). Dosis previamente reportadas (Trejo-Becerril *et al.* 2012).

La administración de DNasa I fue vía intramuscular en las extremidades posteriores; mientras que la papaína se administró por vía intraperitoneal. Las enzimas fueron diluidas en solución salina. La DNasa I se administró diariamente por 4 semanas mientras que la Papaína se administró solo 2 veces a la semana durante 4 semanas. El crecimiento de los tumores fue monitoreado en todos los animales y registrados semanalmente. El tamaño del tumor se midió con un vernier electrónico y se estimó el tamaño-volumen utilizando la fórmula anteriormente descrita. Simultáneamente, se realizó un análisis de desarrollo tumoral y metástasis por micro

PET-CT. Todas las ratas se sacrificaron cuando el tamaño tumoral alcanzó un volumen no mayor a 30 cm³. Al finalizar el tratamiento se realizó el análisis anatomopatológico de cada animal, recolectando muestras de tejidos, particularmente del tumor y pulmones, así como de muestras sanguíneas.

Análisis del desarrollo tumoral y metástasis por micro PET-CT

Se monitoreó el desarrollo tumoral y formación de focos metastásicos en los animales mediante el empleo de técnicas de imagen molecular con un equipo de microPET-CT (Albira, España) y como marcaje, el radiofármaco que se utilizó fue la 18 F-Deoxiglucosa (FDG), y se administraron 200 µCi por vía intravenosa. El estudio se inició 30 minutos después del suministro del radiofármaco para permitir una biodistribución adecuada. Durante el estudio, los animales fueron anestesiados con el sistema de isoflurano/oxígeno utilizando una unidad de inhalación para roedores. El monitoreo tumoral se realizó a la cuarta semana después de haber iniciado el tratamiento con las enzimas (papaína y DNasa I). A partir de estos estudios se cuantificó la captación de glucosa en el tumor para determinar su actividad metabólica.

Para cuantificar la actividad tumoral, el valor estándar de captación (SUV - "standardized uptake value") se calculó utilizando el software del sistema (Carestream Molecular Imaging, CT, E.U.A.). 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 .

Inoculación subdérmica de células CT26.WT en ratones BALB/c

Las células CT26.WT obtenidas de la de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, E.U.A) fueron cultivadas en botellas de 75 cm³ (Corning, E.U.A.), con 25 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; Gibco, E.U.A.) y con un 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, E.U.A.) en las mismas condiciones antes descritas. Se tomaron células CT26.WT de cultivos al 70% confluencia, se despegaron con solución amortiguadora de fosfatos/ácido etilendiaminotetraacético (PBS-EDTA) y tripsina, desactivando la tripsina con medio de cultivo con suero al 5%. Posteriormente, se centrifugaron y se lavaron 3 veces en RPMI-1640 sin suero. Se llevó a cabo el conteo de células con el hemocitómetro. Siguiendo de metodología de Deng con modificaciones (Deng *et al.* 2013). 5×10^5 células se resuspendieron en un volumen de 100 µl de medio de cultivo y se inocularon por vía subdérmica en la región dorso-caudal de ratones BALB/c hembras con un peso de entre 20 y 22 gramos obtenidos de Harlan (UNAM-Harlan México). Antes y durante los experimentos, los animales se

mantuvieron con alimento para ratón y agua *ad libitum*, a una temperatura de 22 °C, un fotoperíodo de 12 horas y una humedad relativa de 50%. Después de la inoculación, el tumor de los ratones se midió tres veces a la semana y se determinó el volumen tumoral con la formula previamente descrita.

Efecto Antitumoral del Tratamiento Enzimático

Para determinar el efecto que las enzimas ejercen sobre el tumor, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en ratones Balb/c inoculados con la línea celular CT26.WT.

Las dosis empleadas de cada enzima, ya previamente reportadas (Trejo-Becerril *et al.* 2012), son las descritas a continuación:

- Tripsina (T) (Sigma-Aldrich, # de cat. T1426): 10 mg/kg,
- Quimiotripsina (Q) (Sigma-Aldrich, # de cat. C4129): 10 mg/kg
- Papaína (P) (Sigma-Aldrich, # de cat. P4762): 12.5 mg/kg
- DNasa I (Sigma-Aldrich, # de cat. D4263): 2.3mg/kg

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) Control: Sin tratamiento (**n=12**)
- 2) Con tratamiento: Proteasas (PQT) + DNasa I (**n=10**)
- 3) Con tratamiento: Proteasas (QT) + DNasa I (**n=11**)
- 4) Con tratamiento: Papaína (P) + DNasa I (**n=7**)
- 5) Con tratamiento: DNasa I (**n=9**)
- 6) Con tratamiento: Proteasas (PQT) (**n=7**)
- 7) Con tratamiento: Quimiotripsina (Q) + DNasa I (**n=7**)
- 8) Con tratamiento: Tripsina (T) + DNasa I (**n=7**)
- 9) Con tratamiento: Proteasas (QT) (**n=5**)

La vía de administración de la DNasa I es intramuscular; mientras que la mezcla de proteasas fue intraperitoneal. El vehículo de todas las enzimas fue solución salina isotónica (NaCl 0.9%). Los tratamientos se aplicaron diariamente por 4 semanas. Se midieron los tumores 3 veces a la semana y todos los ratones se sacrificaron cuando el tamaño tumoral alcanzó un diámetro no mayor a 4.5 cm³.

Colecta de muestras sanguíneas y cortes histológicos

La extracción de sangre en las ratas fue mediante punción cardíaca. Para ello las ratas fueron anestesiadas con el sistema de isoflurano/oxígeno anteriormente descrito. La sangre se recolectó en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, México) que contiene un activador de coagulación y un gel de polímeros que ayuda a la separación del suero, obteniéndose aproximadamente de 5 a 8 mL de sangre por animal. La sangre se mantuvo a 4 °C hasta su procesamiento, el cual ocurrió dentro de las siguientes 24 horas. Los sueros obtenidos fueron centrifugados a 2500 RPM por 20 min (Biofuge primo R, Heraeus # de rotor 7591) a 4°C. Una vez separada la fracción celular, el suero fue retirado manualmente y filtrado con una membrana de 0.45 µm (Sartorius, 16555) para remover células y detritus restantes, y posteriormente las muestras fueron almacenadas a -70 °C para los análisis subsecuentes.

En el caso de los ratones se extrajo sangre mediante desorbitación ocular, previamente fueron anestesiados con el sistema de isoflurano/oxígeno. Se colectó la sangre en tubos Microvette® (Sarstedt, Alemania) se obtuvo aproximadamente 1mL por ratón. De igual forma, las muestras de sangre siguieron el mismo procesamiento para la separación del suero descrito previamente.

Tanto de las ratas y ratones se obtuvieron muestras de algunos órganos (pulmón, corazón e hígado), así como de los tumores o sitios de implantación fueron removidos y se fijaron en una solución de formaldehído amortiguado (PBS con 10% formol). A continuación los tejidos se procesaron para su análisis histopatológico con hematoxilina y eosina en el laboratorio de patología del instituto nacional de cancerología. El Dr José Chanona Vilchis, patólogo del Instituto Nacional de Cancerología, realizó la evaluación histopatológica de cada laminilla en ciego y se definió como respuesta patológica completa a la ausencia de células tumorales viables.

Cuantificación los niveles de DNA circulante en suero

Se cuantificó la concentración de ácidos nucleicos en el suero de las ratas y ratones por el método propuesto por Goldshtein (Goldshtein et al. 2009) utilizando el fluorocromo SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, E.U.A.). Para lo anterior se preparó un stock del reactivo fluorescente, tomando una alícuota de 1 µL del reactivo en 999 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) y se almacenará a -20°C. Para el ensayo se realizó una dilución 1:8 de SYBR-DMSO en PBS. Se preparó una curva patrón donde se utilizó un stock de DNA de esperma de salmón y se realizaron las diluciones necesarias para tener concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 ng/µL en agua inyectable. Posteriormente, en una placa de cultivo de 96 pozos se añadieron por pozo: 10 µL de solución de DNA (Curva patrón o muestra)

+ 40 μ L de solución SYBR Gold en PBS. La placa se protegió con papel aluminio para evitar el contacto con la luz y se evaluó la fluorescencia en un fluorómetro (Tecan Infinite® 200 PRO series) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron procesados en el programa de computadora Microsoft Office Excel 2013, para calcular su media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó aplicando el análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido por la prueba de comparación múltiple de dunnet o t-student mediante el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows, GraphPad Software.

RESULTADOS

Desarrollo tumoral en el modelo de C6

Uno de los modelos *in vivo* que se utilizó para llevar a cabo el presente estudio, fue el modelo de carcinogénesis con la línea celular de rata Wistar C6; sin embargo, éste modelo se debe de tomar con ciertas limitantes, ya que está reportado que ésta línea celular genera tumores a las 3 semanas de inoculación, pero hay evidencia de regresión tumoral en un 70% de la población (Watanabe *et al.* 2002). Por ello, como primer objetivo se realizaron curvas inoculación de las células C6 en ratas Wistar para poder determinar el número adecuado de células para generar tumores subcutáneos que no generaran regresión espontánea. De esta forma se inyectaron subdérmicamente 1, 2, y 6 millones de células en la región dorso-caudal de cada animal. A lo largo del experimento se evaluó la progresión del tumor con mediciones semanales durante 5 semanas (Fig. 10).

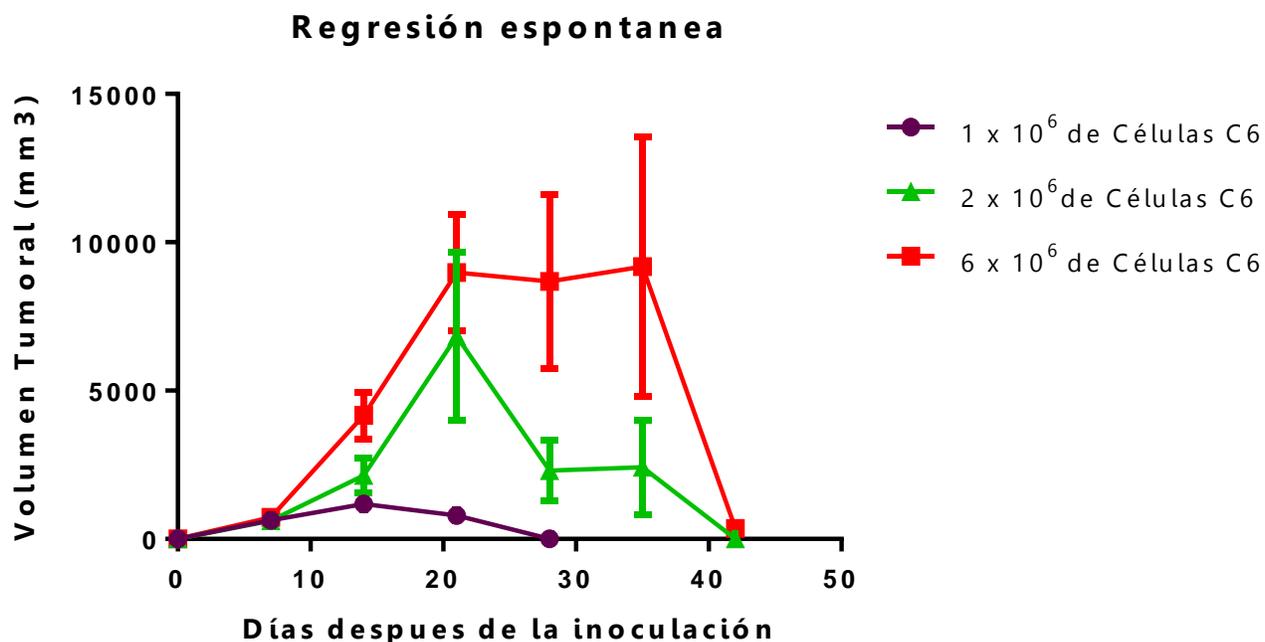


Fig. 10.- Promedio de los volúmenes tumorales de ratas inoculadas con diferente número de células C6. Se observó que los tumores generados presentaron regresión, sin importar el número celular de inoculación. Con 1 y 2 millones muestran una involución antes de los 20 días, sin embargo cuando se inoculó 6 millones se observó regresión hasta después de los 30 días. Las barras I representan el error estándar

En la figura 10 se muestra que el fenómeno de regresión tumoral permanece independientemente del número de células que se inoculen. Sin embargo, el tiempo de permanencia es dependiente de la dosis celular, ya que cuando se inocularon 1 ó 2 millones de células, la involución se observa antes de los primeros 20 días, y el tumor desaparece

totalmente, mientras que cuando se inoculan 6×10^6 de células el 33% de los animales presentan regresión a partir de los 35 días en involucionar totalmente.

Por lo tanto, con la intención de generar una mejor estabilidad al modelo, se procedió a inocular un grupo con 5 ratas con 6×10^6 de células de C6 con una mezcla de matrigel 1:1 debido a que se ha reportado que el matrigel favorece el establecimiento y desarrollo tumoral al inyectarse en combinación (Bao *et al.* 1994, Fridman *et al.* 2012). A pesar de ello, se observó el proceso de regresión espontanea (Fig. 11).

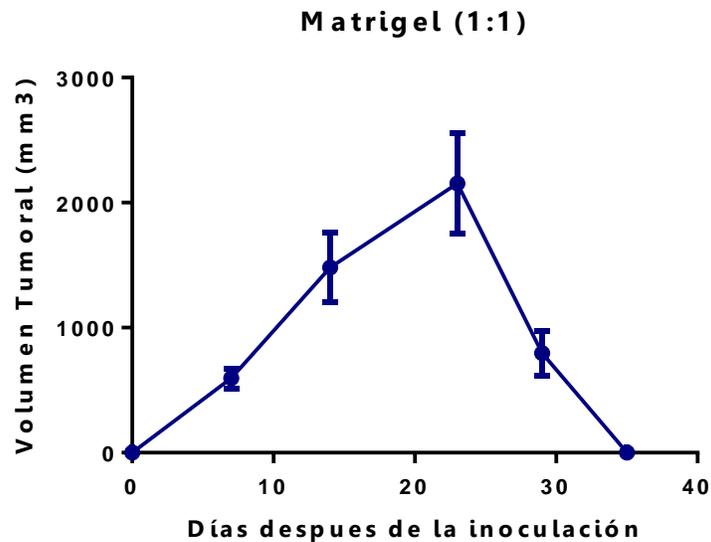


Fig. 11.- Desarrollo tumoral en ratas inyectadas con C6 y una mezcla de matrigel. Promedio del volumen tumoral de ratas inoculadas con 6×10^6 de células C6 en una mezcla (1:1) con matrigel. Se observó la regresión tumoral después de los 23 días. Promedio de los volúmenes tumorales las barras \ representan el error estándar, con una n=5.

Simultáneamente se tomaron muestras de los tumores para realizar el estudio histopatológico de las neoplasias generadas, con la finalidad de confirmar la presencia de células tumorales y observar a nivel histológico el proceso de regresión. Algunas de esas muestras fueron tomadas antes de observar el proceso de regresión o cuando no hubo regresión y otras cuando ya estaba disminuyendo su tamaño tumoral o en involución total, en tal caso tomamos muestra de la región donde se realizó la inoculación celular. Se encontró que en los cortes histológicos de los tumores que estaban en el proceso de regresión había más linfocitos infiltrados, en contraste, en los ratones que aún no presentaban regresión, se observaron menos linfocitos infiltrados (Ver anexo Fig. A1).

Desarrollo tumoral en las ratas Wistar con Dexametasona

Debido a los resultados, de regresión tumoral se optó por generar una inmunosupresión mediante la administración de dexametasona. Basados en la metodología de Jin y colaboradores, en la cual implantaban un hepatocarcinoma en rata sin rechazo por medio de la administración de 2.5 mg de dexametasona diariamente durante 7 días antes de la implantación del tumor y durante otras 2 semanas después de la implantación (Jin *et al.* 2014), siguiendo el mismo procedimiento inmunosuprimimos a las ratas que se inocularon con las células C6. Sin embargo encontramos que la administración de la dexametasona después de una semana generaba una pérdida de peso hasta del 25%, por lo que se decidió modificar la metodología y administrar dexametasona solo una semana más después de la inoculación celular, y administrarla cada 3er día para evitar comprometer la vida de los animales (Ver anexo Fig. A2). Los resultados obtenidos muestran que al tratar a las ratas con dexametasona se favorece el establecimiento de los tumores y evita la regresión espontánea hasta 42 días después de la inoculación, mostrando un mejor desarrollo tumoral (Fig. 12); en contraste a las ratas que no fueron tratadas con dexametasona, en las que se observa regresión espontánea después de los 15 o 20 días. Posteriormente, al realizar estudios anatomopatológicos se encontraron focos de metástasis en los pulmones, en el 45% de los animales. Una vez establecido el modelo tumoral, realizamos un experimento con el objetivo de evaluar la administración de la combinación de papaína y DNasa I. Para esto, inyectamos Papaína (25 mg/Kg) y DNasa I (2.3mg/Kg) se administraron por vía intraperitoneal y vía intramuscular respectivamente. La DNasa I se administró diariamente por 4 semanas mientras que la Papaína se administró solo 2 veces a la semana durante 4 semanas.

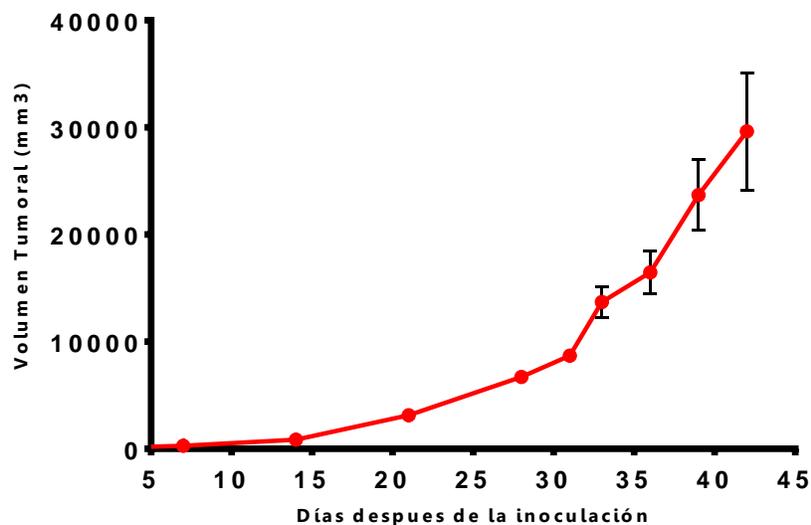


Fig. 12.- Curva de crecimiento del volumen tumoral en las ratas tratadas con Dexametasona e inoculadas con 6×10^6 de células C6. Se logró evitar la regresión espontánea hasta los 45 días después de su inoculación. Se muestra el promedio de los volúmenes tumorales las barras representan error estándar, con una $n=12$.

Efecto antitumoral y antimetastásico del tratamiento enzimático en ratas Wistar

Se evaluó el efecto de la administración de la mezcla enzimática (Papáina y DNasa I) con el objetivo de determinar si tiene un efecto sobre el tumor primario, y/o las metástasis. El crecimiento de los tumores fue monitoreado en todos los animales y registrados semanalmente. El tamaño del tumor se midió con un vernier electrónico y se estimó el tamaño-volumen utilizando la fórmula anteriormente descrita. El tratamiento se empezó a administrar después de 21 días de haber inoculado las células, sin embargo, como se observa en la Fig. 13 no hubo diferencia significativa en el volumen tumoral.

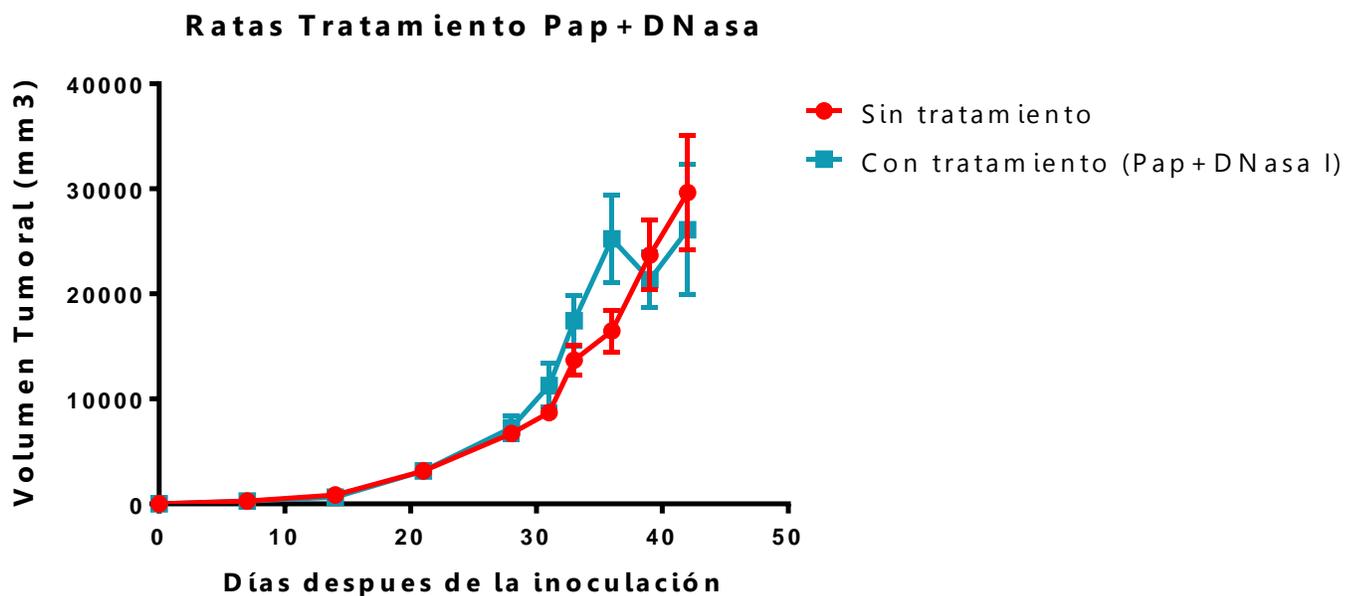


Fig. 13.- Seguimiento del volumen tumoral de las ratas con tratamiento (azul) y sin tratamiento (rojo). No se observa respuesta en el tamaño tumor primario con el tratamiento (papaina +DNasa I). Se muestra el promedio de los volúmenes tumorales las barras I representan error estándar, con una n=12 en cada grupo.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en este modelo que generamos mediante la administración de la Dexametasona, se observaron metástasis pulmonares en 45% de los animales. Por lo que al finalizar el tratamiento se extirparon los pulmones entre otros órganos y se evaluó si el tratamiento tiene efecto sobre el número y tamaño de las metástasis (Fig. 14).

A)

	Sin Tratamiento	Con Tratamiento (P+D)
Número de animales	12	12
Promedio volumen tumoral	29633 mm ± 4989 (EE)	26102 mm ± 5067 (EE)
Promedio # de metástasis	16.08 ± 2.98 (EE)	5.67 ± 11.14 (EE)
Tamaño de las metástasis	≥ 6 mm	≤ 6 mm
Animales con macro metástasis	5/12 (41.7%)	4/12 (33.33%)
Animales con micrometástasis pulmón	7/12 (58.33%)	6/12 (50%)
Animales con micrometástasis en corazón	2/12 (16.66%)	0/12 (0%)

B)

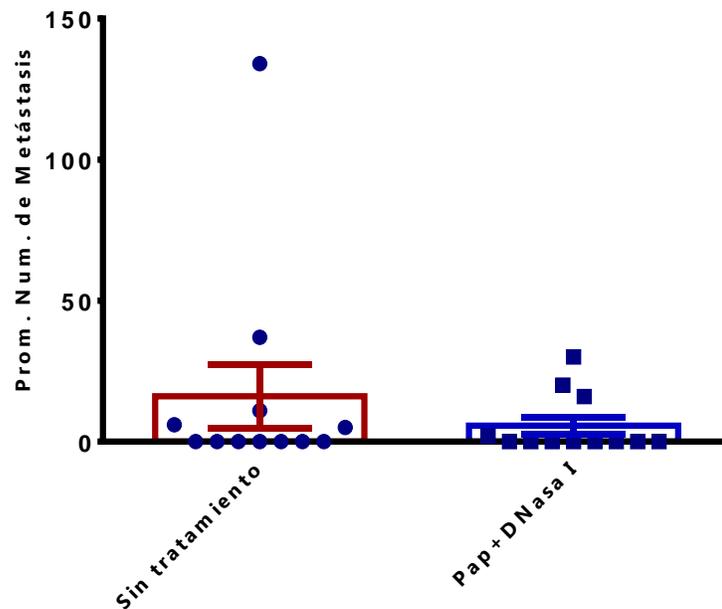


Fig. 14.- Análisis de las metástasis en el modelo de C6 con Dexametasona. A) En la tabla se enlistan las diferencias encontradas entre las ratas con y sin tratamiento. B) En la gráfica se muestra el promedio del número de metástasis encontradas en las ratas con y sin tratamiento las barras I representan error estándar, con una n=12 en cada grupo. Se observa una menor incidencia en la formación de focos metastásicos. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas

A pesar que los resultados no muestran diferencia significativa entre las ratas con y sin tratamiento, al final del experimento se colectaron muestras de diferentes tejidos en búsqueda de micro y macrometástasis, mediante un análisis patológico de rutina con tinción de H & E, y se encontró que las ratas con tratamiento tenían una menor tendencia a generar macrometástasis (Sin tratamiento =41.7% mientras que con tratamiento = 33.33%), también el rango de tamaño era considerablemente menor (Sin tratamiento ≥6mm mientras que con tratamiento ≤6mm), asimismo en las ratas sin tratamiento se encontraron micrometástasis en

corazón, (en 2 ratas de 12) en cambio no se encontró micrometástasis en corazón en ninguna de las ratas con tratamiento (Fig. 14). También se tomó una muestra de un foco metastásico y realizaron cultivos primarios con el fin de obtener una clona de estas células que lograron realizar metástasis (Ver anexo Fig. A3).

Análisis del desarrollo tumoral y metástasis por micro PET-CT

Además de la medición semanal durante el tratamiento, también se realizó una evaluación de los animales mediante técnicas de imagen molecular usando un equipo de microPET-CT marcando con FDG-F18 (Fig. 15 y 16).

Después de 4 semanas de haber iniciado el tratamiento con las enzimas, se evaluó la formación de tumores en 2 ratas de cada grupo de estudio con el microPET-CT. Los resultados mostraron que una de las ratas del grupo sin tratamiento existían varios puntos focales de captación anormal en el pulmón, en los que el valor de la a glucólisis total de la lesión (TLG) es mucho mayor al que se observa en tejido normal de referencia, en este caso el hígado. Esto indicó la presencia de focos metastásicos lo cual posteriormente se confirmó en un análisis histopatológico en el Instituto Nacional de Cancerología, encontrando múltiples metástasis en pulmón e incluso micro metástasis en corazón, algo que no se observó en la rata con tratamiento que tenía el mismo tiempo desde la inoculación y un tamaño tumoral semejante en el tumor primario.

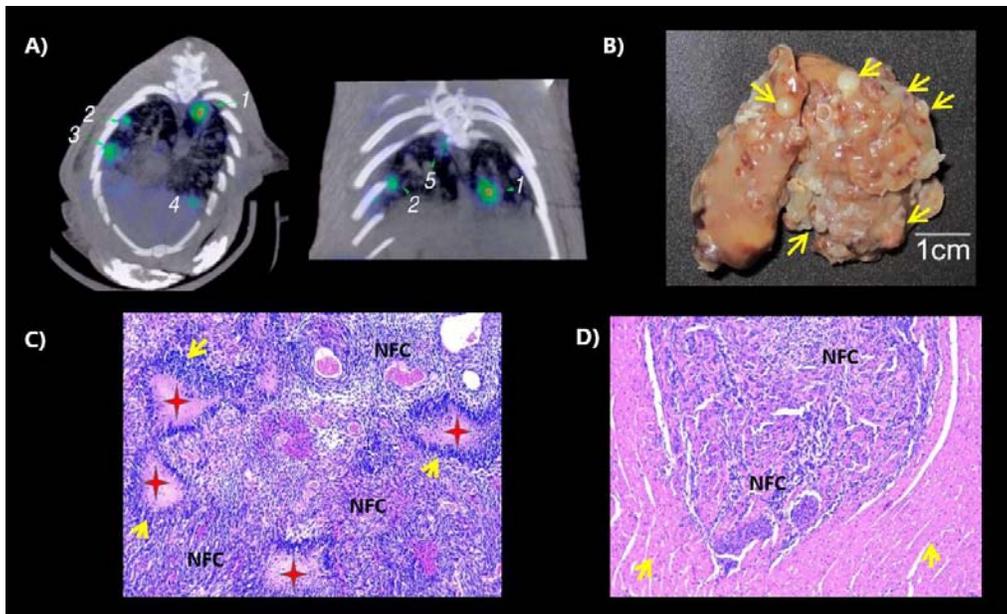


Fig. 15.- Imágenes representativas de una rata sin tratamiento a los 37 días. A) Evaluación del desarrollo tumoral y metástasis en una rata sin tratamiento mediante un análisis de imagen por microPET-CT, se observan varios puntos focales de captación anormal en el pulmón, en los que el valor TLG es mucho mayor al que se observa en tejido normal de referencia, (hígado) sugiriendo un proceso de metástasis. B) Se observan los pulmones y se confirmó la presencia de metástasis (flechas amarillas) C) Cortes de tejido pulmonares y se observa una neoplasia maligna con patrón fusocelular (NFC) y formación de empalizadas (flechas) alrededor de las zonas de necrosis (estrella roja) (100x). D) Corte histológico de corzaron donde se observa: musculo estriado (flecha amarilla) y micrometástasis de neoplasia fusocelular (NFC) dispuesta en un patrón nodular (100x).

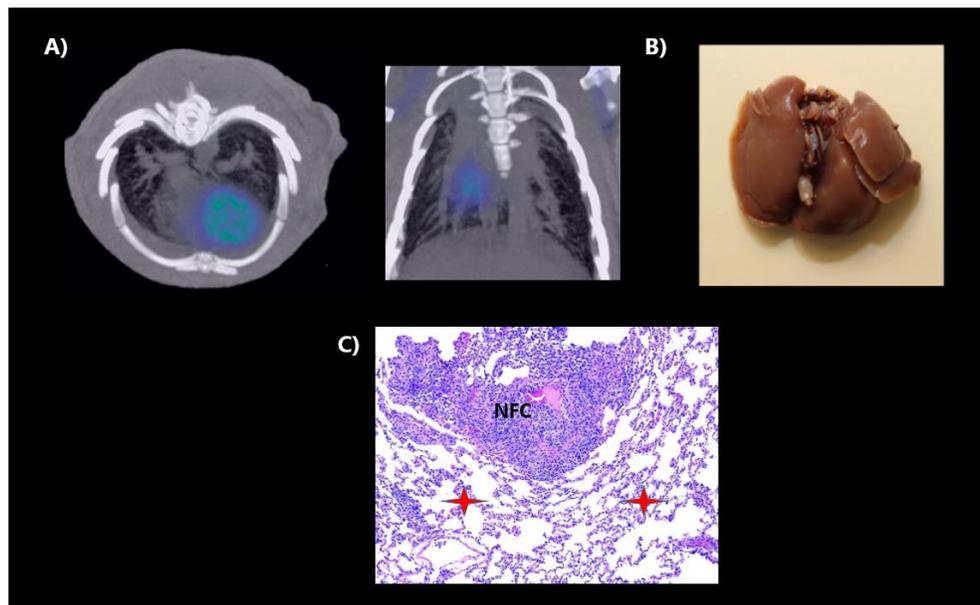


Fig. 16.- Imágenes representativas de una rata con tratamiento a los 37 días. A) Evaluación del desarrollo tumoral y metástasis en una rata con tratamiento mediante microPET-CT en la cual no se observa puntos de captación anormal B) Se observan los pulmones y no se encontro presencia de metástasis "macro" C) Corte histológico de pulmón (estrella roja) con micrometástasis de neoplasia fusocelular (NFC) dispuesta en un patrón nodular se encontraron dos micrometastasis en pulmon (1 y 1.3 mm)(40X).

Los resultados obtenidos sugieren que con el tratamiento enzimático (papaína y DNasa I) se genera una menor tendencia a presentar metástasis, con respecto al grupo sin tratamiento. Al final de estos tratamientos se tomaron muestras sanguíneas con el objetivo de cuantificar el DNAc y determinar si el tratamiento disminuye su concentración en el suero.

Concentración de DNA circulante en suero de ratas tratadas con papaína y DNasa I

Con el fin de determinar si el tratamiento enzimático ejerce un efecto en los niveles de DNAc, se tomaron muestras sanguíneas de las ratas se purificó el DNAc del plasma y se cuantificó y de acuerdo a lo esperado, encontramos valores más elevados de DNAc en las ratas sin tratamiento en contraste a las ratas con el tratamiento de papaína y DNasa I, mostrando diferencias significativas en cuanto a la cantidad de DNAc ya que mientras que en las ratas sin tratamiento se muestra un promedio de 802 ng/mL de DNAc, en las ratas con tratamiento muestran 325 ng/mL de DNAc, en promedio, de tal manera que el tratamiento enzimático es capaz de reducir los niveles del DNAc (Fig. 17).

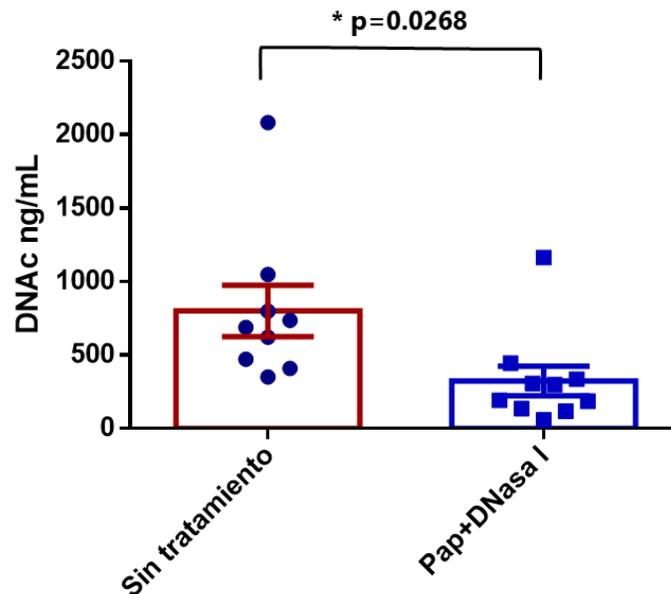


Fig. 17.- Concentración de DNAc en el suero de las ratas Wistar con tumor sin tratamiento y tratadas con la mezcla de enzimas. Las muestras de sangre fueron tomadas 1hr después del último tratamiento. Se observa que en el grupo con la mezcla de enzimas (Papaína: 25 mg/kg + DNasa I: 2.3 mg/kg), la concentración de DNAc disminuye significativamente ($p=.0268$), en contraste a lo que sucede en las ratas sin tratamiento. (Anova seguida de un t de student $p<0.05$). Se muestra el promedio de la concentración de DNAc, barras \ representan error estándar

Efecto antitumoral del tratamiento enzimático en ratones BALB/c

Dado que no encontramos diferencias significativas en este modelo se diseñó otro ensayo experimental *in vivo* en esta ocasión los grupos contemplan cada combinación de las 3 proteasas con el fin de determinar que proteasa posee mayor actividad antitumoral, los grupos fueron:

1. Sin tratamiento
2. Con Proteasas (PQT) + DNasa I
3. Con Proteasas (QT) + DNasa I
4. Con Papaína (P) + DNasa I
5. Con DNasa I
6. Con Proteasas (PQT)
7. Con Quimiotripsina (Q) + DNasa I
8. Con Tripsina (T) + DNasa I
9. Con Proteasas (QT)

El efecto antitumoral del tratamiento enzimático, se evaluó durante 25 días y se realizó un seguimiento del tamaño tumoral, mediante mediciones cada 3er día. Como se observa en la Fig. 20, en los grupos de animales que no tuvieron respuesta favorable fueron: sin tratamiento y aquellos tratados con solamente Quimiotripsina + DNasa o Tripsina + DNasa. De la misma manera los grupos tratados únicamente con Proteasas (PQT) o (QT) tampoco muestran respuesta favorable al tratamiento, de hecho los tumores de estos grupos muestran una tendencia a crecer más en contraste al grupo sin tratamiento. Por el contrario, los grupos de animales que si mostraron una reducción en los tamaños tumorales fueron: el grupo de Papaína + DNasa I en el cual se observa un menor crecimiento tumoral en comparación al grupo sin tratamiento, sin embargo, no presenta diferencia significativa. Los grupos de: proteasas (QT) + DNasa I, proteasas (PQT) + DNasa I y el del grupo de únicamente con DNasa I, muestran que los tamaños de los tumores fueron significativamente menores al final de los 25 días del tratamiento en comparación al grupo sin tratamiento (Fig. 18). Estos grupos presentaron una disminución del tamaño tumoral de hasta poco más del 50% en contraste al grupo sin tratamiento. Al finalizar el tratamiento obtuvimos muestras de sangre para cuantificar el DNAc y analizamos los tumores de todos los ratones.

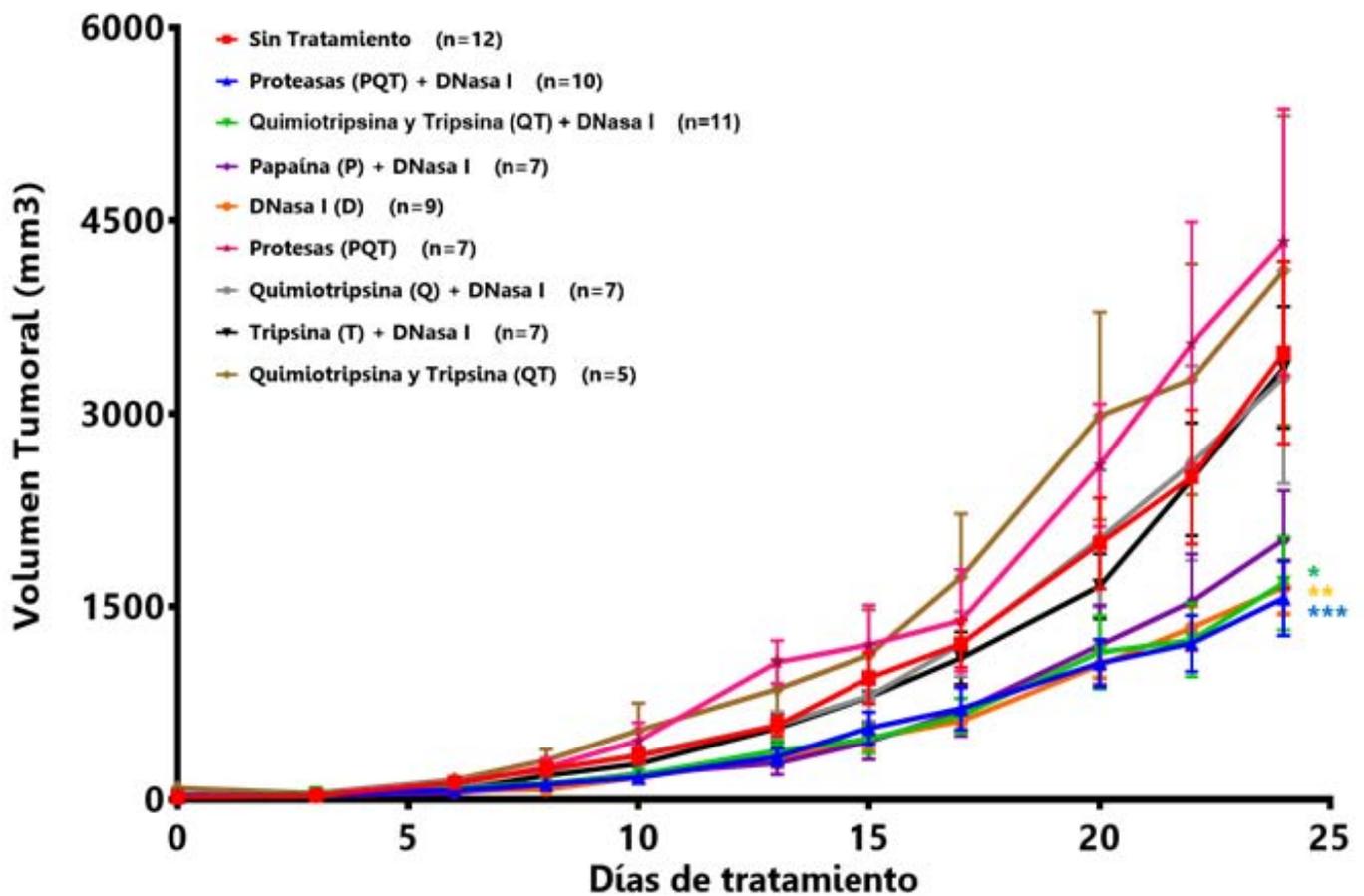


Fig. 18.- Efecto antitumoral de las mezclas de proteasas y DNasa I en ratones BALB/c inoculados con CT26.WT. En ésta gráfica se muestra el efecto que tiene el tratamiento de las mezclas de enzimas (DNasa I tripsina, papaína y quimiotripsina) sobre el crecimiento tumoral. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con QT+DNasa I (* $p=0.0358$), con únicamente la DNasa I (** $p=0.0366$) y PQT+DNasa I (** $p=0.0264$) en comparación al grupo sin tratamiento. Los otros grupos no tuvieron diferencia significativa (Anova seguida de un t de student $p<0.05$). Se muestra el promedio de los volúmenes tumorales las barras representan error estándar.

Con el objetivo de determinar el volumen de los tumores con otro método, se evaluó el peso y volumen desplazado de un líquido por los tumores. Al analizar los volúmenes con los tratamientos, encontramos que únicamente los tratamientos QT + DNasa I, PQT + DNasa I y DNasa I inducen una diferencia significativa sobre el volumen tumoral, sin embargo, a pesar que se observa un efecto en los ratones tratados con papaína + DNasa I su efecto no es estadísticamente diferente (Fig. 19).

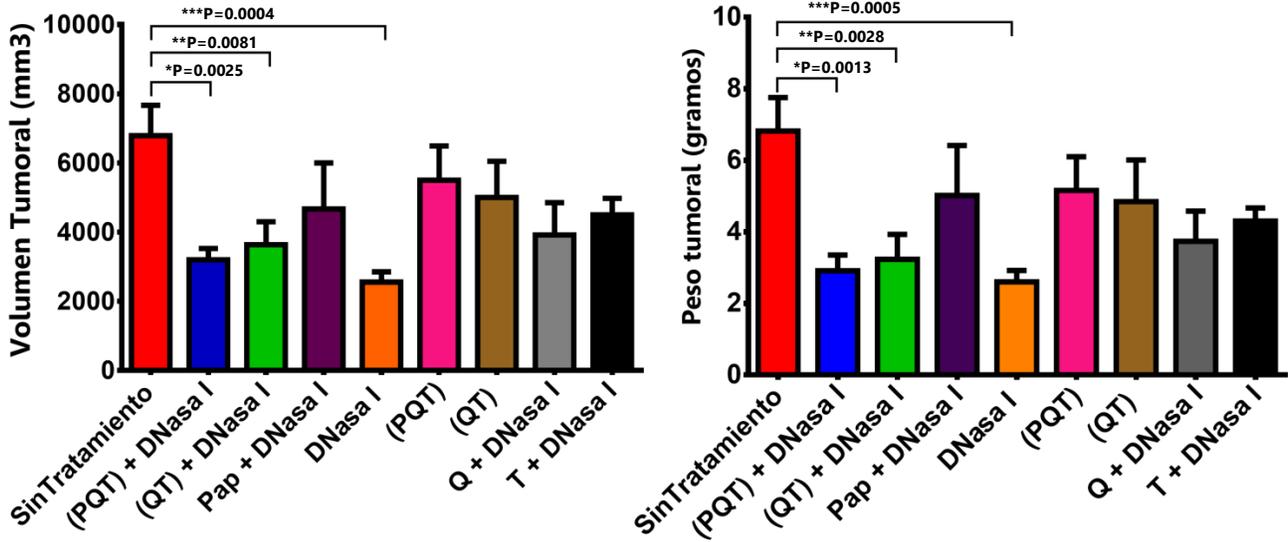


Fig. 19.- Se evaluó el volumen y el peso de los tumores tratados con las enzimas. Se observa una reducción de aproximadamente del 50% tanto en el peso como en el volumen en los grupos tratados con únicamente DNasa I, PQT+DNasa I, y QT+DNasa I en contraste al grupo sin tratamiento. Se realizó una anova seguida de un prueba de dunnett con $p < 0.05$ y se encontraron diferencias significativas únicamente en estos grupos. Se muestra el promedio de los volúmenes tumorales y las barras representan error estándar.

DISCUSIÓN

Un modelo ideal para el estudio del cáncer, debe de ser clínicamente relevante, reproducible y representativo para la población humana; tiene la finalidad de observar las interacciones en los sistemas biológicos, determinar los mecanismos de acción de los tratamientos que pudieran evitar la progresión del cáncer, así como el crecimiento y la diseminación del tumor o bien de prolongar la vida del paciente (Stokes 2002, Hibberd *et al.* 2013). Sin embargo, los modelos animales pueden tener diversas limitantes tales como: la ausencia de metástasis, el cual es un proceso fundamental en el desarrollo de varios tipos de cáncer; o presentar regresión espontánea después de un tiempo. Tal es el caso del modelo de glioblastoma con la línea celular C6 proveniente de rata Wistar, ya que si las células son implantadas de manera subdérmica el 70% de los animales presentan regresión espontánea después de los 15 días (Watanabe *et al.* 2002).

A pesar de ello hay muchos grupos que apoyan este modelo. Por ejemplo Kaplan en 2005 describe que el modelo de tumor glial de rata C6 muestra un comportamiento similar para el glioblastoma multiforme. Además, muestran que cuando las células son inoculadas de manera intracraneal generan invasión y migración (Kaplan 2005). En diferentes estudios utilizan este modelo para evaluar la eficacia de tratamientos como la quimioterapia, terapia angiogénica, inhibidores de proteosomas, tratamientos con toxinas, radiación, terapia fotodinámica, terapia oncogénica viral y terapia génica (Wolfe *et al.* 1980, Grobбен *et al.* 2002, Barth & Kaur 2009). No obstante, los datos actuales muestran que la implantación de células C6 tendrá un progreso tumoral dentro de un lapso aproximado de 3 semanas y luego de forma espontánea sucede una regresión hasta el punto de una completa remisión. Aunque los mecanismos exactos involucrados permanecen sin aclararse, este hallazgo debe ser tomado en cuenta a la hora decidir sobre un protocolo de estudio específico y la elección adecuada de un modelo animal (Watanabe *et al.* 2002, Vince *et al.* 2004, Sughrue *et al.* 2009).

Por lo anterior, parte de este trabajo fue buscar una forma de mejorar el establecimiento tumoral y evitar la regresión espontánea, por ello realizamos inoculaciones con diferente número de células 1, 2, 4 y 6 millones e incluso se inyectaron con una mezcla de matrigel, el cual ha tenido un gran impacto la investigación de la biología del tumor de tanto *in vitro* como *in vivo* (Benton *et al.* 2014) y se utiliza para ensayos de angiogénesis, invasión, facilita el establecimiento del tumor, la progresión tumoral y la metástasis (Bao *et al.* 1994, Kleinman & Martin 2005, Fridman *et al.* 2012). Sin embargo, nuestros resultados muestran que es ineficiente el incrementar el número celular o que se inoculen con matrigel, debido a que aún se observa el fenómeno de regresión espontánea. Se realizaron cortes histológicos de la región donde se realizó la inoculación celular y en los cortes histológicos de los tumores, y encontramos que los tumores que estaban en el proceso de regresión tenían infiltrado un extenso componente linfocitario, en contraste con las ratas que aún no presentaban regresión, donde no se observó infiltrado

leucocitario. Y se ha mostrado que el sistema inmune tiene un papel importante en el proceso de regresión espontánea (Hicks *et al.* 2006, Sengupta *et al.* 2010), y se han identificado en un modelo con ratones que la regresión espontánea de tumores está mediada por la rápida infiltración de células de sistema inmune, mediante la formación de rosetas con la infiltración de células asesinas naturales, neutrófilos o macrófagos y genera una destrucción de las células malignas a través de citólisis rápida (Hicks *et al.* 2006). Debido a ello se exploró el efecto de inmunosuprimir a las ratas mediante el uso de un glucocorticoide los cuales tienen distintos mecanismos moleculares de acción y muestran diferentes efectos inmunoreguladores (Matsue *et al.* 2002).

Se utilizó a la dexametasona, siguiendo la metodología de Jin y colaboradores con modificaciones (Jin *et al.* 2014), a las ratas Wistar se les administró dexametasona antes y después de la inoculación celular, lo cual generó una mejor progresión tumoral dejándose de observar el fenómeno de regresión espontánea, hasta 45 días después de la inoculación celular generando así un modelo más estable y confiable. Esto puede deberse, al menos en parte, al mecanismo de acción de la dexametasona ya que se basa principalmente en la inhibición de la migración de los leucocitos al área inflamada y sobre las células dendríticas, e inhibe la síntesis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, y de IL-18. También afecta la activación de los linfocitos cruciales en el control de la respuesta citotóxica, inhibe la actividad fagocítica y la proliferación de los fibroblastos. Por lo tanto, tiene acción antiinflamatoria e inmunosupresora muy elevada (Kunicka *et al.* 1993, Siachoque *et al.* 2005, Vademecum 2015). Sorprendentemente, en este modelo encontramos metástasis en pulmón en el 45% de los animales y micrometástasis en corazón en 16% de los animales, lo cual no se ha descrito anteriormente en la literatura.

Una vez establecido el modelo tumoral, se evaluó el efecto del tratamiento con papaína y DNasa I ya que se ha reportado que la administración de endonucleasas (DNasas y RNasas) o proteasas (quimiotripsina, tripsina y papaína) en modelos animales tienen efectos antitumorales y antimetástasicos (Wald *et al.* 1998, Wald *et al.* 2001, Novak & Trnka 2005, Shklyayeva *et al.* 2008, Alcazar-Leyva *et al.* 2009); sin embargo, no se ha descrito el efecto de su administración de manera concomitante. De forma inesperada, en nuestros resultados no encontramos diferencia significativa en el grupo de las ratas tratadas con papaína y DNasa en contraste con el grupo sin tratamiento en cuanto al tamaño del tumor primario, aunque se observa una tendencia a que los animales tratados con las enzimas generan una tendencia a disminuir la incidencia, tamaño y número de metástasis. En la literatura podríamos destacar algunos trabajos, los cuales han descrito la actividad antimetástasica de la DNasa I. Tal es el caso de Sugihara y col. que muestran en un modelo de linfoma murino el efecto del tratamiento con DNasa I da como resultado, una prolongación estadísticamente significativa en el período de supervivencia; sin embargo, un tratamiento más eficaz se logró mediante la combinación de la extirpación quirúrgica de la masa

tumoral primaria y la administración del tratamiento con DNasa I, dando como resultado una mayor prolongación de la supervivencia y un efecto antimetastásico (Sugihara *et al.* 1993).

Del mismo modo estudios de Patutina y col., demuestran que la administración intramuscular de una mezcla de RNasa A y DNasa I tiene un efecto sistémico e inmunomodulador en general, retarda el crecimiento del tumor primario en un 20-40%, y conduce a una supresión drástica de desarrollo de metástasis en dos modelos murinos, uno de pulmón y otro de hígado. Estos resultados son causados por la destrucción de oncocitos, un aumento de la necrosis y apoptosis en los focos de metástasis, y la infiltración por células mononucleares, como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Patutina *et al.* 2010, Patutina *et al.* 2011). Recientemente, se ha demostrado que las células tumorales circulantes quedan atrapadas dentro de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET's) en condiciones estáticas y dinámicas y en un modelo murino de infección; se demostró que las NET's atrapan a las células circulantes de carcinoma de pulmón dentro de redes de DNA, lo cual se asoció con aumento de la formación de micrometástasis hepáticas. Sin embargo, estos efectos fueron eliminados por la administración de DNasa I (Cools-Lartigue *et al.* 2013). Estas observaciones apoyan nuestros resultados encontrados en las ratas con el tratamiento con papaína y DNasa I donde observamos que el tratamiento es capaz de disminuir la incidencia, tamaño y número de metástasis en contraste a las ratas sin tratamiento.

Los resultados que observamos sobre el tumor primario, sugieren que al menos en las condiciones de este modelo, el tratamiento de papaína y DNasa I no tiene actividad antitumoral lo anterior puede deberse a diferentes razones: un tumor en expansión, tarde o temprano llega a un "punto de no retorno" en el cual independientemente de los tratamientos clínicos, la respuesta es nula o ineficiente (Moss & Blaser 2005). En nuestro experimento, durante el desarrollo tumoral en la ratas, iniciamos el tratamiento 15 días después de la implantación de las células lo cual podría significar que en este modelo sobrepasamos ese punto de respuesta. Por otra parte es importante destacar que la dexametasona genera un efecto protector de muerte celular en diferentes líneas celulares de cáncer. Tal como Qian y col., demuestran que la dexametasona induce resistencia a la apoptosis en la mayoría de los tumores malignos sólidos y muestran el mecanismo por el cual la dexametasona reduce eficiencia de agentes quimioterapéuticos en la línea celular C6 a través del incremento de proteínas antiapoptóticas mediante la vía de señalización Stat5/Bcl-xL (Qian *et al.* 2009). Algo semejante ocurre con la línea celular MCF-7 donde la dexametasona causa protección contra la muerte celular mediada por el TNF- α , otros sugieren que la aplicación de dexametasona inhibe significativamente la actividad terapéutica del paclitaxel en las células de cáncer de ovario debido a la sobreexpresión de Bcl-xL y la baja actividad de la caspasa-3 (Machuca *et al.* 2006, Hou *et al.* 2014). En nuestro modelo se utilizó a la dexametasona con la finalidad de inmunosuprimir a los animales y favorecer el establecimiento tumoral, administrándose diariamente 7 días previos a la inoculación celular y 7 días después, de tal manera que el tumor

establecido posiblemente tenga esa resistencia a la muerte celular. Por último, es conveniente mencionar que nuestros antecedentes mostramos que el tratamiento sistémico con una mezcla de proteasas (papaína+quimiotripsina+tripsina) más DNasa I, tiene efecto antitumoral en un modelo de ratones inmunodeficientes injertados con una línea celular maligna humana (Fig. 8), mientras que en el presente estudio solo se administró papaína y DNasa I, en este sentido se comprende la posibilidad de que el efecto antitumoral se deba al uso concomitante de la mezcla de proteasas, debido a ello y se optó por determinar cuáles componentes de la combinación de proteasas poseen mayor actividad antitumoral en un modelo murino.

Por otro lado, en lo que respecta al DNAc se ha encontrado en diferentes fluidos corporales tanto de individuos sanos como en pacientes con diversas patologías, entre ellas el cáncer (Mitra *et al.* 2012, Holdenrieder 2015). Pueden encontrarse en diversas formas, tales como fragmentos de DNA libres, asociados a nucleosomas, empaquetado en vesículas extracelulares (que pueden ser cuerpos apoptóticos, microvesículas y/o exosomas), asociadas a proteínas del suero o a la superficie de células o en un complejo lipoproteico denominado: "virtosoma" (Gahan 2012, Aarthy *et al.* 2015). Actualmente las vesículas extracelulares han ganado considerable atención, tanto como mediadores de la señalización intercelular y como fuentes potenciales para el descubrimiento de nuevos biomarcadores de cáncer (Nawaz *et al.* 2014). Asimismo se ha reportado que cuerpos apoptóticos de células tumorales pueden transformar células inmortalizadas (Taper *et al.* 2001, Valle *et al.* 2008) y que exosomas y microvesículas participan en la progresión del cáncer y metástasis (Chen *et al.* 2005, Katsuda *et al.* 2014). Por otra parte, el virtosoma el cual es un complejo de DNA, RNA, proteínas y lípidos liberado por células viables, que puede entrar y cambiar la biología de las células receptoras, transformando a las células normales (Gahan & Stroun 2010). En conjunto estas apoyan a la teoría de la "genometástasis" la cual plantea una vía de metástasis, mediante la cual se producirían por la transfección de células localizadas en órganos diana a distancia, mediante oncogenes derivados del tumor primario, y que circulan en el plasma (Garcia-Olmo & Garcia-Olmo 2013).

Otras funciones que pueden desempeñar estos ácidos nucleicos circulantes son: la participación en vías de señalización promoviendo la progresión del tumor, la supervivencia, la invasión y la angiogénesis, así como influir en la respuesta inmune, la comunicación célula a célula, y la degradación de la matriz extracelular (Chen *et al.* 2005, Katsuda *et al.* 2014, Redzic *et al.* 2014).

Es evidente que su análisis representa una oportunidad única para integrarse en el ámbito clínico y actualmente el estudio del DNAc en pacientes con cáncer se ha enfocado más hacia la parte diagnóstica, es decir, a la investigación de la presencia de las anormalidades cualitativas y/o cuantitativas del DNA con el objetivo de determinar su utilidad en varios aspectos del cáncer como son el diagnóstico temprano de la enfermedad y su valor como factor predictivo de

respuesta o pronóstico en los pacientes (Crowley *et al.* 2013, Dawson *et al.* 2013, Holdenrieder 2015). Esto se debe principalmente a que existe mucha evidencia sobre el aumento de los niveles de DNAc en la sangre humana, lo que en varias ocasiones ha mostrado ser un sello distintivo del cáncer metastásico (Zhong *et al.* 2007, Dawson *et al.* 2013, Singh *et al.* 2015). También se ha reportado una correlación del desarrollo y progresión del cáncer con una reducción en los niveles de DNasa en la sangre humana (Wróblewski & Bodansky 1950, Tamkovich *et al.* 2006, Hawes *et al.* 2015). De este modo, una comprensión más profunda del DNAc ayudará en la identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, y potencialmente puede conducir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

Nuestro grupo de investigación propone al DNAc como un posible blanco terapéutico. Sin embargo, Gahan y Stroun mencionan que: los ácidos nucleicos no pueden ser digeridos con facilidad con nucleasas, a menos que el complejo sea tratado primero con proteinasas o lipasas. Previamente demostramos que la degradación del DNA circulante presente en el sobrenadante de líneas celulares tumorales mediante el uso de una mezcla de proteasas (tripsina, quimotripsina y papaína) y DNasa I elimina su potencial transformante en ratones Balb/c nu/nu. También se demostró que esta combinación tiene efecto antitumoral en un modelo de ratones inmunodeficientes injertados con SW480 una línea celular maligna humana (Trejo-Becerril *et al.* 2012, Trejo-Becerril *et al.* 2016).

En el presente estudio solo se administró papaína y DNasa I, con el objetivo de simplificar la investigación ya que estratégicamente sería más conveniente trabajar únicamente con dos enzimas en vez de cuatro. Sin embargo a pesar que no hubo diferencia en cuanto al tamaño del tumor primario, el tratamiento genera una tendencia a disminuir la incidencia, tamaño y número de metástasis. Es importante mencionar que la propagación de las células malignas de un tumor primario a sitios distantes del cuerpo, representa el principal problema clínico del cáncer ya es la responsable de la morbilidad y mortalidad de la mayoría de los pacientes con cáncer (Hunter *et al.* 2008). Asimismo encontramos que el tratamiento enzimático disminuye significativamente los niveles de DNAc en las ratas tratadas con la combinación enzimática, en contraste a las ratas sin tratamiento, lo cual concuerda con lo reportado por Wen en 2103 donde la administración de la DNasa I disminuye el DNA extracelular asociado a membrana en las células del tumor, disminuyendo la metástasis y la progresión tumoral (Wen *et al.* 2013).

Por otra parte se ha descrito que los niveles de DNA descienden tras el tratamiento con radioterapia, y la persistencia de niveles elevados de DNA o su incremento, se asocia con una falta de respuesta al tratamiento (Zhong *et al.* 2007). De igual forma diferentes grupos de investigación han realizado el seguimiento de los niveles de nucleosomas en pacientes antes y después de administrar tratamientos, para estimar la eficacia de la terapia y/o su posible factor predictivo,

encontrando que los pacientes que mantenían niveles altos de nucleosomas en circulación después de la terapia y tenían un mal pronóstico (Trejo-Becerril *et al.* 2003, Trejo-Becerril *et al.* 2005, Holdenrieder *et al.* 2008, Holdenrieder & Stieber 2009). Otros estudios han mostrado una correlación entre los niveles de DNasa en la sangre y la respuesta al tratamiento: Asimismo, los niveles de DNasa I aumentan en pacientes de cáncer durante la remisión y después de las intervenciones exitosas, y disminuyen durante la metástasis y la progresión; por lo que bajos niveles de DNasa después del tratamiento se encontró que correlación con mal pronóstico (Hawes *et al.* 2015).

Resultados previos del laboratorio muestran que la administración sistémica de la combinación enzimática de proteasas y DNasa I posee actividad antitumoral en un modelo de ratones inmunocomprometidos, y con el fin de simplificar la investigación se optó por utilizar solo la proteasa con mayor actividad proteolítica, que fue la papaína. Sin embargo, en este modelo con este esquema de tratamiento no hubo diferencia significativa sobre el tumor primario. Por lo que se decidió explorar más a detalle y determinar que componente (s) son los de mayor actividad antitumoral y se diseñó el modelo murino con la línea celular CT26.WT. De tal forma en que cada grupo consistía en alguna de las diferentes combinaciones de enzimas. Al final del tratamiento los podemos agrupar en tres grandes grupos: el grupo sin tratamiento, los grupos que respondieron al tratamiento y en los cuales se observó una reducción significativa del tamaño tumoral en contraste al grupo sin tratamiento (PQT + DNasa I, QT + DNasa I, y solo DNasa I); es importante mencionar que los animales del grupo con P + DNasa I generan una tendencia a tener un menor volumen tumoral, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo. Por último los grupos que no respondieron al tratamiento (Q + DNasa I, T + DNasa I y los grupos con únicamente proteasas PQT y QT). En nuestro conocimiento, somos los únicos evaluando la administración sistémica de esta combinación enzimática, con la premisa de que la degradación del DNAc podría tener efectos antitumorales. Por lo que no hay reportes donde se utilice la mezcla de las 4 enzimas como tratamiento antitumoral. Sin embargo, existen informes donde reportan el uso de la DNasa I o a las Proteasas como agentes antitumorales, pero se han utilizado de forma separada.

Para el caso de las proteasas no existen estudios que evalúen las posibles actividades terapéuticas por administración intravenosa, Sakalová y col. reportan la administración oral de una mezcla enzimática (papaína, quimiotripsina y tripsina) administrada en combinación con quimioterapia tradicional en pacientes con mieloma múltiple generaba tasas más altas de respuesta global y una mayor duración de las remisiones en el grupo con quimioterapia y enzimas, en contraste al grupo únicamente con quimioterapia (Sakalova *et al.* 2001). También se ha demostrado que la administración subcutánea de una mezcla de enzimas que contiene tripsinógeno, amilasa, quimotripsinógeno y quimiotripsina activa conducen a un notable incremento en la tasa de

supervivencia de los ratones hembra C57B16 inyectados por vía subcutánea con células B16F10 (Wald *et al.* 1998). La mezcla de las proteasas utilizada en nuestro trabajo, tripsina, quimiotripsina y papaína, se ha utilizado previamente con administración intrarrectal lo que demuestra la inhibición del crecimiento en el tumor primario, el efecto antimetastásico y un aumento de la supervivencia en ratones C57B16 con la implantación subcutánea de células B16F10, en estos mismos estudios se demostró que las proteasas dosificadas sistemáticamente confieren ciertos cambios moleculares y biológicos en la superficie de las células malignas. Entre dichos cambios están la reducción en la expresión de moléculas de adhesión CD44 y CD54 (Wald *et al.* 1998, Wald *et al.* 2001).

Con respecto a la DNasa I se ha reportado que disminuye significativamente la metástasis tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo* (Sugihara *et al.* 1993, Patutina *et al.* 2010, Patutina *et al.* 2011), además de tener actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer (Alcazar-Leyva *et al.* 2009). Recientemente, se ha demostrado que la DNasa I es capaz de disminuir la invasión y migración en modelos *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer, también es capaz de inhibir la progresión y la metástasis en un modelo murino (Wen *et al.* 2013). Mientras que Fischer y col. reportaron que ciertas endonucleasas como la RNasa I y la DNasa I poseen actividad antitumoral (Fischer *et al.* 2013).

En una revisión, Hawes y col. en 2015, mostraron una síntesis de más de 50 años de estudios independientes apoyando fuertemente la sugerencia por varios autores sobre la aplicación de DNasa I en el tratamiento del cáncer ya sea sola o en combinación con otros métodos como un enfoque lógico. Esto es especialmente cierto ya que actualmente hay un contexto para comprender al DNAc y su papel en el desarrollo del cáncer, la inflamación y cómo puede facilitar la metástasis a menos que sea controlado por una adecuada actividad de la DNasa I, describen que la inyección de DNasa I. estos estudios demuestran que la inyección de DNasa I en ratones, utilizando diversos modelos de cáncer, es capaz de inhibir la metástasis y aumentar la supervivencia, sin causar efectos negativos (Hawes *et al.* 2015).

En conjunto, toda esta información respalda y concuerda con nuestras observaciones, principalmente en los grupos que tuvieron respuesta al tratamiento, con la combinación de proteasas y DNasa I e incluso con el grupo con únicamente DNasa I ya que encontramos que estos tratamientos disminuyen el desarrollo tumoral hasta un 52% en comparación con los animales sin tratamiento.

Sin embargo no explica por qué la DNasa en este modelo de ratones inmunocompetentes si tuvo efecto antitumoral en contraste al modelo anterior en ratones inmunocomprometidos.

El primer modelo con ratones BALB/c nu/nu, también llamados "nude", presenta en estado homocigoto una mutación espontánea, lo que le produjo su fenotipo desnudo o sin pelo,

característica que le dio el nombre a la mutación, lo cuales carecen de un timo funcional producen un número reducido de células T maduras por lo que no rechazan tejidos alo y xenotransplantados (Maschi *et al.* 2011). En este modelo se inocularon células SW480 provenientes de un carcinoma de colon y se evaluó la actividad antitumoral de las enzimas donde solo la mezcla con proteasas (PQT) + DNasa I tiene un efecto sobre el tumor, en contraste con el grupo con solo DNasa I no tiene respuesta. En el presente trabajo usamos ratones BALB/c inmunocompetentes inoculados con la línea celular CT26.WT, proveniente de un carcinoma de colon de la misma cepa de ratón (Castle *et al.* 2014) y se evaluó la actividad antitumoral de las enzimas donde tanto las mezclas con proteasas (PQT) o (QT) + DNasa I como el grupo con únicamente DNasa I posee un efecto significativo en el tumor.

En base a esto, nosotros consideramos la posibilidad de que la DNasa I este trabajando junto con el sistema inmune o estimulándolo de tal forma que solo tenga efecto antitumoral en el modelo de ratones inmunocompetentes de hecho, se ha reportado que endonucleasas como la DNasa I y RNasa A poseen actividades inmunomoduladoras, capaces de incrementar o disminuir los niveles de algunas citosinas tales como $INF-\alpha$, $INF-\gamma$ IL6 y $TNF-\alpha$ (Patutina *et al.* 2011), también se demostró que la DNasa es capaz de disminuir los niveles de la IL-8 (Wen *et al.* 2013).

En resumen, nuestros resultados apoyan que la combinación enzimática posee propiedades antitumorales y antimetástasicas, además de disminuir significativamente los niveles de DNAc, además se demostró que es necesaria la mezcla de proteasas PQT o QT junto con DNasa I para conservar su actividad, y al menos en el modelo de ratones inmunocompetentes la administración con únicamente DNasa I también posee actividad antitumoral. Sin embargo, es necesario determinar el mecanismo de acción por el cual actúan sobre el tumor. Para finalizar es importante mencionar que mediante este tratamiento, únicamente se está atacando tanto proteínas como al DNAc sin embargo, otro participante importante es el RNAc incluso existen antecedentes sobre RNasas con actividad antitumoral (Lee *et al.* 2007, Ardelt *et al.* 2009, Nasu *et al.* 2011).

A pesar de observaciones independientes de tales fenómenos en diversos tipos de cáncer durante más de 50 años, el uso de la DNasa I como herramienta clínica para prevenir o tratar el cáncer permanece inexplorado. No obstante durante décadas, una DNasa recombinante humana se ha utilizado para tratar la fibrosis quística, sin informes de efectos negativos significativos sobre la salud, y las inyecciones de DNasa I en pacientes con nefritis lúpica tampoco revelaron eventos adversos significativos (Dayan 1994, Davis *et al.* 1999, Wagener & Kupfer 2012).

Por consiguiente y tomando en cuenta toda esta información, la terapia enzimática contra el cáncer resulta muy prometedora por lo que es de suma importancia seguir con estudios que permitan su uso clínico.

CONCLUSIONES

En el modelo de ratas Wistar con células C6

- La administración de Dexametasona permite un mejor desarrollo tumoral además de generar metástasis en un 42% de los animales.
- El tratamiento con Papaína y DNasa I en las condiciones de este modelo no tiene actividad antitumoral; sin embargo las ratas con el tratamiento generan una tendencia a disminuir la incidencia, tamaño y número de metástasis en contraste a las ratas sin tratamiento.
- El tratamiento con Papaína y DNasa I disminuye significativamente la cantidad de DNAc en suero.

En modelo de ratones BALB/c con células CT26

- Los tratamientos con la mezcla de PQT y DNasa I, QT y DNasa I e incluso con únicamente DNasa I, poseen actividad antitumoral significativa, mientras que el tratamiento con papaína y DNasa I tiene un efecto menor sobre el tumor pero no de manera significativa.

PERSPECTIVAS

A pesar de demostrar que las mezclas de las enzimas (PQT+D, QT+D y D) presentan una actividad antitumoral, es conveniente ampliar el presente estudio, para tener una mayor perspectiva del comportamiento biológico de estas enzimas. Entre algunos aspectos a estudiar serían:

- Evaluar si estos tratamientos con las enzimas son capaces de disminuir la incidencia de metástasis, ya sea en el modelo de ratas Wistar tratadas con dexametasona y con células C6 o en un modelo de melanoma murino con ratones C57BI/J6 y la línea celular B16F10
- Además resulta de gran importancia estudiar el mecanismo de acción de estas enzimas, mediante el estudio de los tumores de ratones tratados con las mezclas de enzimas, buscando marcadores de apoptosis necrosis o ciclo celular y morfología celular de tal forma que se pueda determinar cómo el tratamiento enzimático ejerce su efecto y aportar más información sobre posibles efectos secundarios.
- Otro aspecto interesante es por qué la DNAsa tiene efecto antitumoral solo en los ratones inmunocompetentes y no en el ratones desnudos por lo que resulta conveniente evaluar los niveles de algunas citocinas y buscar células infiltradas en los tumores de los ratones tratados para determinar si el sistema inmune juega un papel importante en la respuesta al tratamiento.
- Por último debido a los antecedentes sobre endonucleasas con actividad antitumoral y especialmente la RNAsa A podría ser un digno candidato para ser estudiado en modelos *in vivo* con la intención de evaluar su potencial terapéutico.

ANEXO

Análisis histológico de los cortes de las ratas inoculadas con C6

En todas las ratas, se removió el sitio donde se aplicó la inyección celular, y se procesó para el análisis histológico de rutina con H & E, el cual fue realizado en el laboratorio de patología del Instituto Nacional de Cancerología. Algunas de esas muestras fueron tomadas antes de observar el proceso de regresión o cuando no hubo regresión o en involución total, en tal caso tomamos muestra de la región donde se realizó la inoculación celular. Los resultados mostraron que en los cortes histológicos de los tumores, que estaban en el proceso de regresión espontánea había infiltración leucocitaria, en contraste a las ratas que no presentaron regresión. Además, es de destacar que los sitios de inoculación celular de las ratas que tuvieron una regresión total del tumor no hubo presencia de tejido tumoral (Fig. A1).

Caso	Tejido	Tumor	Fusocelular	Necrosis	Infiltración Leucocitaria	Aspecto Histológico
I	Tejido Fibroadiposo	Si	Si	30%	No	
II	Tejido Fibromuscular	No	Escaso	0%	Si	
III	Tejido Fibroadiposo	Si	Si	50%	No	

Fig. A1.- Análisis histológico de las ratas inyectadas con C6. Caso I: muestra de rata antes de presentar regresión tumoral, se observa una neoplasia maligna con patrón fusocelular (NFC) y formación de empalizadas (FLECHA AMARILLA) alrededor de las zonas de necrosis (ESTRELLA ROJA). Caso II muestra de rata después de una regresión total del tumor, se observan focos de neoplasia maligna con patrón fusocelular (NFC) mezclados con extenso componente linfohistiocitario (ROMBO VERDE) y septos de estroma fibroconectivo (FLECHA AMARILLA). Caso III muestra de una rata que no presenta regresión tumoral, se observa una neoplasia maligna con patrón fusocelular (NFC) y formación de empalizadas (FLECHA AMARILLA) alrededor de las zonas de necrosis (ESTRELLA ROJA).

Seguimiento de las ratas tratadas con dexametasona

Se realizó un monitoreo antes durante y después del tratamiento con dexametasona, se observó su conducta, alimentación, presencia de dolor y su peso. Durante este periodo no hubo cambios de conducta, falta de apetito, ni dolor, sin embargo, encontramos que todos los animales después de 1 semana del tratamiento con dexametasona bajaron de peso hasta un 20% (Fig. A2) y presentaban diarrea, por consiguiente se decidió modificar su administración, para no comprometer la vida de los animales, por lo que en vez de inyectarlas diariamente se inyectaron una vez cada 3 días con dexametasona, hasta la inoculación celular.

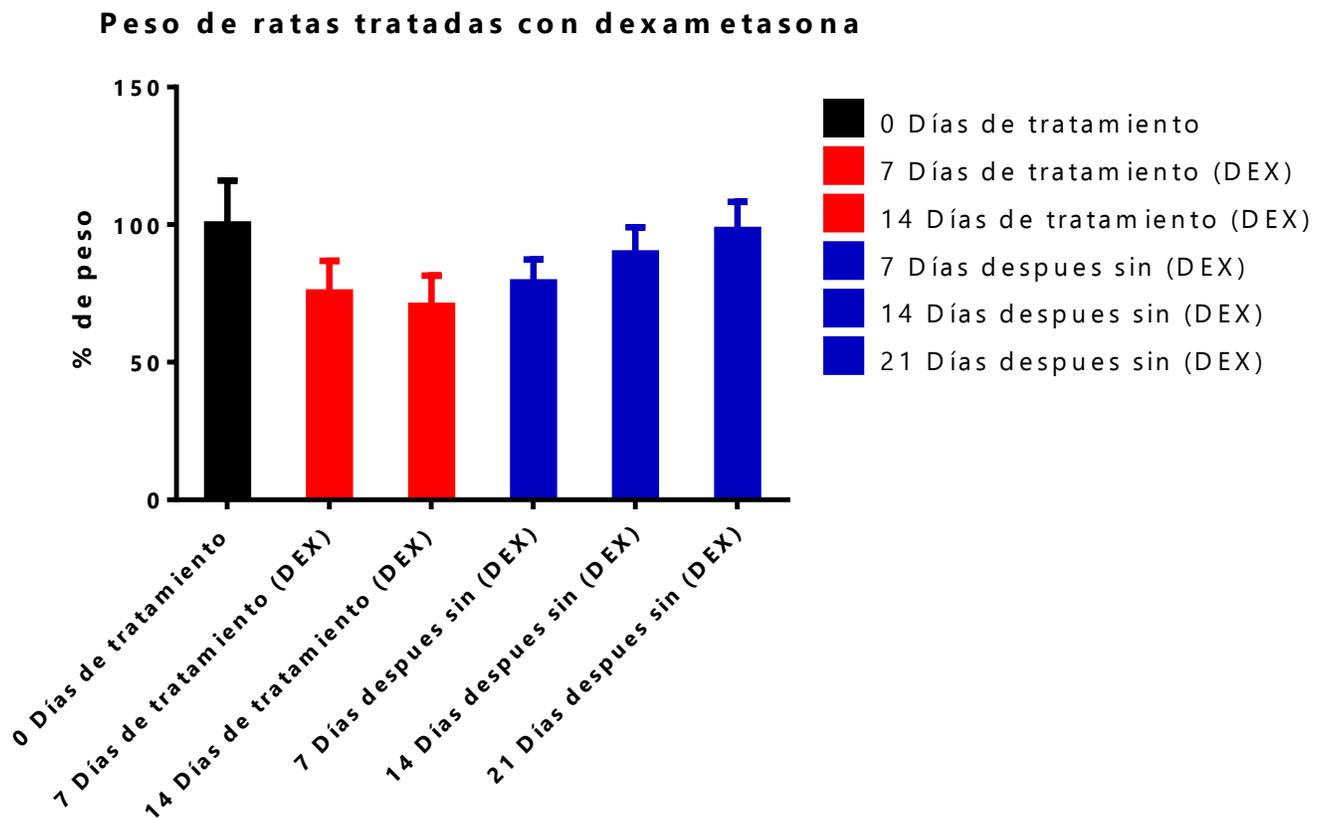


Fig. A2.- Gráfica del seguimiento del peso corporal de las ratas durante y despues del tratamiento con dexametasona. Cada barra representa el porcentaje del peso en promedio (n=12) Tomando como 100% el peso de los animales al inicio del tratamiento las barras\ representan error estándar.

Inoculación de células provenientes de la metástasis de C6 en ratón BALB/c nu/nu

Durante la toma de muestras y tejidos de las ratas con metástasis se tomó una muestra de una región del pulmón la cual presentaba metástasis se colocó en un tubo medio DMEM-F12 sin suero y posteriormente se disgregó para generar primocultivos para corroborar de que se trataban de células tumorales se inocularon 5×10^5 en un ratón BALB/c nu/nu en el flanco derecho mientras que en el flanco izquierdo se inocularon 5×10^5 células de la línea celular C6 para observar su crecimiento y poder compararlo encontramos que ambas generaban tumor sin embargo las células C6 provenientes de la metástasis tenían un crecimiento más agresivo que las células C6 normales (Fig. A3).

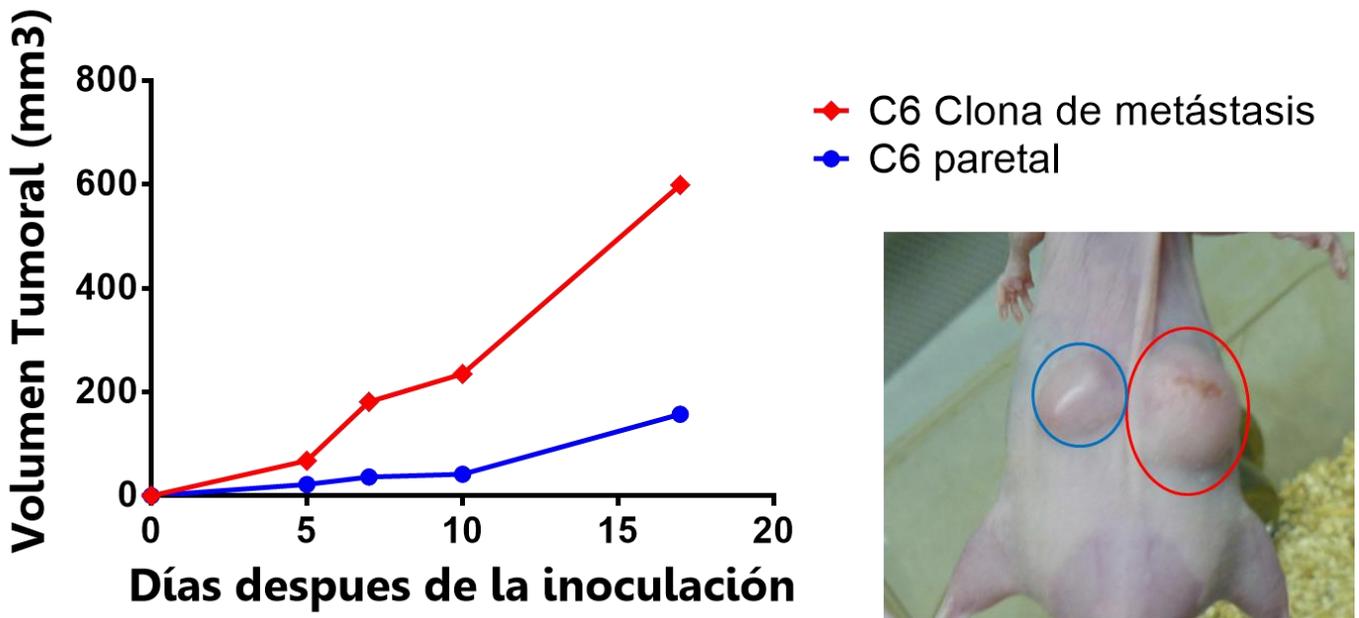


Fig. A3.- Histograma del crecimiento tumoral de las células C6 provenientes de la metástasis (rojo) en un ratón BALB/c nu/nu, y de la línea celular C6 (azul).

REFERENCIAS

- Aarthy, R., S. Mani, S. Velusami, S. Sundarsingh and T. Rajkumar (2015). "Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers." Mol Diagn Ther 19(6): 339-350.
- Alcazar-Leyva, S., E. Ceron, F. Masso, L. F. Montano, P. Gorocica and N. Alvarado-Vasquez (2009). "Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation." Med Sci Monit 15(2): CR51-55.
- Anker, P., J. Lyautey, F. Lefort, C. Lederrey and M. Stroun (1994). "[Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation]." C R Acad Sci III 317(10): 869-874.
- Ardelt, W., B. Ardelt and Z. Darzynkiewicz (2009). "Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy." European journal of pharmacology 625(1): 181-189.
- Bao, L., Y. Matsumura, D. Baban, Y. Sun and D. Tarin (1994). "Effects of inoculation site and Matrigel on growth and metastasis of human breast cancer cells." Br J Cancer 70(2): 228-232.
- Barth, R. F. and B. Kaur (2009). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas." J Neurooncol 94(3): 299-312.
- Becker, F. F. (1977). Chemotherapy, Plenum Press.
- Benda, P., J. Lightbody, G. Sato, L. Levine and W. Sweet (1968). "Differentiated rat glial cell strain in tissue culture." Science 161(3839): 370-371.
- Benton, G., I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman and J. Koblinski (2014). "Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research." Adv Drug Deliv Rev 79-80: 3-18.
- Bergsmedh, A., A. Szeles, M. Henriksson, A. Bratt, M. J. Folkman, A. L. Spetz and L. Holmgren (2001). "Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies." Proc Natl Acad Sci U S A 98(11): 6407-6411.
- Castle, J. C., M. Loewer, S. Boegel, J. de Graaf, C. Bender, A. D. Tadmor, V. Boisguerin, T. Bukur, P. Sorn, C. Paret, M. Diken, S. Kreiter, O. Tureci and U. Sahin (2014). "Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma." BMC Genomics 15: 190.
- Cools-Lartigue, J., J. Spicer, B. McDonald, S. Gowing, S. Chow, B. Giannias, F. Bourdeau, P. Kubes and L. Ferri (2013). "Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis." J Clin Invest.
- Crowley, E., F. Di Nicolantonio, F. Loupakis and A. Bardelli (2013). "Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood." Nat Rev Clin Oncol 10(8): 472-484.
- Chelobanov, B. P., P. P. Laktionov and V. V. Vlasov (2006). "Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids." Biochemistry (Mosc) 71(6): 583-596.

- Chen, Z., A. Fadiel, F. Naftolin, K. D. Eichenbaum and Y. Xia (2005). "Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology." Med Hypotheses 65(5): 956-961.
- Chin, D., G. M. Boyle, A. J. Kane, D. R. Theile, N. K. Hayward, P. G. Parson and W. B. Coman (2005). "Invasion and metastasis markers in cancers." Br J Plast Surg 58(4): 466-474.
- Dalpke, A., J. Frank, M. Peter and K. Heeg (2006). "Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species." Infect Immun 74(2): 940-946.
- Davis, J., S. Manzi, C. Yarboro, J. Rairie, I. McInnes, D. Averbelyi, D. Sinicropi, V. Hale, J. Balow and H. Austin (1999). "Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis." Lupus 8(1): 68-76.
- Dawson, S. J., D. W. Tsui, M. Murtaza, H. Biggs, O. M. Rueda, S. F. Chin, M. J. Dunning, D. Gale, T. Forsheo, B. Mahler-Araujo, S. Rajan, S. Humphray, J. Becq, D. Halsall, M. Wallis, D. Bentley, C. Caldas and N. Rosenfeld (2013). "Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer." N Engl J Med 368(13): 1199-1209.
- Dayan, A. (1994). "Pharmacological-Toxicological (Expert Report on Recombinant Human Deoxyribonuclease I (rhDNase; Pulmozyme™)." Human & Experimental Toxicology 13(1 suppl): S2-S42.
- Deng, S., B. Hu, H. M. An, Q. Du, L. Xu, K. P. Shen, X. F. Shi, M. M. Wei and Y. Wu (2013). "Teng-Long-Bu-Zhong-Tang, a Chinese herbal formula, enhances anticancer effects of 5-Fluorouracil in CT26 colon carcinoma." BMC Complement Altern Med 13: 128.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer 3(6): 453-458.
- Fischer, S., S. Gesierich, B. Griemert, A. Schänzer, T. Acker, H. G. Augustin, A.-K. Olsson and K. T. Preissner (2013). "Extracellular RNA liberates tumor necrosis factor- α to promote tumor cell trafficking and progression." Cancer research 73(16): 5080-5089.
- Fleischhacker, M. and B. Schmidt (2007). "Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey." Biochim Biophys Acta 1775(1): 181-232.
- Fridman, R., G. Benton, I. Aranoutova, H. K. Kleinman and R. D. Bonfil (2012). "Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection." Nat. Protocols 7(6): 1138-1144.
- Gahan, P. B. (2012). "Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer." Infect Disord Drug Targets 12(5): 360-370.
- Gahan, P. B. and M. Stroun (2010). "The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger." Cell Biochem Funct 28(7): 529-538.

- Garcia-Olmo, D., D. C. Garcia-Olmo, J. Ontanon and E. Martinez (2000). "Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis"." Blood 95(2): 724-725.
- Garcia-Olmo, D., D. C. Garcia-Olmo, J. Ontanon, E. Martinez and M. Vallejo (1999). "Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis." Histol Histopathol 14(4): 1159-1164.
- Garcia-Olmo, D. C., C. Dominguez, M. Garcia-Arranz, P. Anker, M. Stroun, J. M. Garcia-Verdugo and D. Garcia-Olmo (2010). "Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells." Cancer Res 70(2): 560-567.
- Garcia-Olmo, D. C. and D. Garcia-Olmo (2013). "Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genometastasis." Crit Rev Oncog 18(1-2): 153-161.
- Gartler, S. M. (1959). "Cellular uptake of deoxyribonucleic acid by human tissue culture cells." Nature 184(Suppl 19): 1505-1506.
- Godoy, R. L. M. (2008). Biología Molecular en cáncer.
- Griswold, D. P. and T. H. Corbett (1975). "A colon tumor model for anticancer agent evaluation." Cancer 36(6 Suppl): 2441-2444.
- Grobber, B., P. De Deyn and H. Slegers (2002). "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion." Cell and tissue research 310(3): 257-270.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-674.
- Hawes, M. C., F. Wen and E. Elquza (2015). "Extracellular DNA: A Bridge to Cancer." Cancer research 75(20): 4260-4264.
- Hibberd, C., D. A. Cossigny and G. M. Quan (2013). "Animal cancer models of skeletal metastasis." Cancer Growth Metastasis 6: 23-34.
- Hicks, A. M., G. Riedlinger, M. C. Willingham, M. A. Alexander-Miller, C. Von Kap-Herr, M. J. Pettenati, A. M. Sanders, H. M. Weir, W. Du, J. Kim, A. J. Simpson, L. J. Old and Z. Cui (2006). "Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice." Proc Natl Acad Sci U S A 103(20): 7753-7758.
- Holdenrieder, S. (2015). CNAPS in Therapy Monitoring. Circulating Nucleic Acids in Early Diagnosis, Prognosis and Treatment Monitoring, Springer: 325-367.
- Holdenrieder, S., D. Nagel, A. Schalhorn, V. Heinemann, R. Wilkowski, J. von Pawel, H. Raith, K. Feldmann, A. E. Kremer, S. Muller, S. Geiger, G. F. Hamann, D. Seidel and P. Stieber (2008). "Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer." Ann N Y Acad Sci 1137: 180-189.
- Holmgren, L., A. Szeles, E. Rajnavolgyi, J. Folkman, G. Klein, I. Ernberg and K. I. Falk (1999). "Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies." Blood 93(11): 3956-3963.

- Hou, W., J. Guan, H. Lu, Q. Dong, Y. Han and R. Zhang (2014). "The effects of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells induced by paclitaxel." J Ovarian Res 7: 89.
- Houdt, W. J., F. J. Hoogwater, M. T. de Bruijn, B. L. Emmink, M. W. Nijkamp, D. A. Raats, P. van der Groep, P. van Diest, I. H. B. Rinkes and O. Kranenburg (2010). "Oncogenic KRAS desensitizes colorectal tumor cells to epidermal growth factor receptor inhibition and activation." Neoplasia 12(6): 443-IN442.
- Hunter, K. W., N. P. Crawford and J. Alsarraj (2008). "Mechanisms of metastasis." Breast Cancer Res 10 Suppl 1: S2.
- Jin, Y., D. Tong, J. Shen, J. Yang and J. Li (2014). "Establishment of experimental implantation tumor models of hepatocellular carcinoma in Wistar rats." Tumour Biol 35(9): 9079-9083.
- Jung, K., M. Fleischhacker and A. Rabien (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.
- Kaplan, N. (2005). "Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model." Turkish Neurosurgery 15(3): 109-115.
- Katsuda, T., N. Kosaka and T. Ochiya (2014). "The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers." Proteomics 14(4-5): 412-425.
- King, R. J. B. and M. W. Robins (2006). Cancer biology. Harlow, England; New York, Pearson/Prentice Hall.
- Kjønniksen, I., R. Storeng, A. Pihl, T. L. McLemore and Ø. Fodstad (1989). "A human tumor lung metastasis model in athymic nude rats." Cancer research 49(18): 5148-5152.
- Kleinman, H. K. and G. R. Martin (2005). "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity." Semin Cancer Biol 15(5): 378-386.
- Kopreski, M. S., F. A. Benko, C. Kwee, K. E. Leitzel, E. Eskander, A. Lipton and C. D. Gocke (1997). "Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer." Br J Cancer 76(10): 1293-1299.
- Kunicka, J. E., M. A. Talle, G. H. Denhardt, M. Brown, L. A. Prince and G. Goldstein (1993). "Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone." Cellular immunology 149(1): 39-49.
- Laktionov, P. P., S. N. Tamkovich, E. Y. Rykova, O. E. Bryzgunova, A. V. Starikov, N. P. Kuznetsova, S. V. Sumarokov, S. A. Kolomiets, N. V. Sevostianova and V. V. Vlassov (2004). "Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 23(6-7): 879-883.

- Lee, I., A. Kalota, A. M. Gewirtz and K. Shogen (2007). "Antitumor efficacy of the cytotoxic RNase, ranpirnase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice." Anticancer research 27(1A): 299-307.
- Leipner, J. and R. Saller (2000). "Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action." Drugs 59(4): 769-780.
- Leon, S. A., B. Shapiro, D. M. Sklaroff and M. J. Yaros (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." Cancer Res 37(3): 646-650.
- Lomónaco, M. F. (2012). "Utilización de Modelos animales en investigación del Cáncer." Salud Militar Vol. 31(1): 55 - 58.
- Lopez-Otin, C. and J. S. Bond (2008). "Proteases: multifunctional enzymes in life and disease." J Biol Chem 283(45): 30433-30437.
- Macías, R. M. (2009). Fundamentos de Oncología: Fundamentos de Oncología, Dr. Efraín A. Medina Villaseñor.
- Machuca, C., C. Mendoza-Milla, E. Córdova, S. Mejía, L. Covarrubias, J. Ventura and A. Zentella (2006). "Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappaB and is independent from AKT." BMC cell biology 7(1): 9.
- Mareel, M. and A. Leroy (2003). "Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion." Physiol Rev 83(2): 337-376.
- Maschi, F., G. Principi, E. Rogers, M. Ayala, P. Cagliada and C. Carbone (2011). "Modelo de inmunodeficiencia: el ratón BALB/c. Cg-Fox1nu." Química Viva 10(3): 214-220.
- Matsue, H., C. Yang, K. Matsue, D. Edelbaum, M. Mummert and A. Takashima (2002). "Contrasting Impacts of Immunosuppressive Agents (Rapamycin, FK506, Cyclosporin A, and Dexamethasone) on Bidirectional Dendritic Cell-T Cell Interaction During Antigen Presentation." The Journal of Immunology 169(7): 3555-3564.
- Mendel, P., L. Mandel and et al. (1948). "Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme." C R Hebd Seances Acad Sci 226(24): 2019-2021.
- Mitra, I., N. K. Nair and P. K. Mishra (2012). "Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host?" J Biosci 37(2): 301-312.
- Mohr, T. and L. Desser (2013). "Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro." BMC Complement Altern Med 13: 231.
- Moss, S. F. and M. J. Blaser (2005). "Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer." Nat Clin Pract Oncol 2(2): 90-97; quiz 91 p following 113.
- Nasu, M., M. Carbone, G. Gaudino, B. H. Ly, P. Bertino, D. Shimizu, P. Morris, H. I. Pass and H. Yang (2011). "Ranpirnase interferes with NF- κ B pathway and MMP9 activity, inhibiting

malignant mesothelioma cell invasiveness and xenograft growth." Genes & cancer 2(5): 576-584.

- National Cancer Institute. (2015). "What Is Cancer?. ." Retrieved 28 octubre, 2015, from <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>.
- Nawaz, M., G. Camussi, H. Valadi, I. Nazarenko, K. Ekström, X. Wang, S. Principe, N. Shah, N. M. Ashraf and F. Fatima (2014). "The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers." Nature Reviews Urology.
- Noriega, J. G. and J. N. Limón (2008). "El tratamiento actual del cáncer cervicouterino." Ginecol Obstet Mex 76(2): 131-139.
- Novak, J. F. and F. Trnka (2005). "Proenzyme therapy of cancer." Anticancer research 25(2A): 1157-1177.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science 194(4260): 23-28.
- Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer 4(6): 448-456.
- Patutina, O., N. Mironova, E. Ryabchikova, N. Popova, V. Nikolin, V. Kaledin, V. Vlassov and M. Zenkova (2011). "Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I." Biochimie 93(4): 689-696.
- Patutina, O. A., N. L. Mironova, E. I. Ryabchikova, N. A. Popova, V. P. Nikolin, V. I. Kaledin, V. V. Vlassov and M. A. Zenkova (2010). "Tumoricidal Activity of RNase A and DNase I." Acta Naturae 2(1): 88-94.
- Peters, D. L. and P. J. Pretorius (2011). "Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour." Clinica Chimica Acta 412(11-12): 806-811.
- Qian, Y.-H., Q. Xiao, H. Chen and J. Xu (2009). "Dexamethasone inhibits camptothecin-induced apoptosis in C6-glioma via activation of Stat5/Bcl-xL pathway." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1793(5): 764-771.
- Ramandanis, G., N. Agnantis, J. Garas and D. A. Spandidos (1982). "Correlation between serum and tissue deoxyribonuclease levels in breast cancer patients." Anticancer Res 2(4): 213-218.
- Redzic, J. S., L. Balaj, K. E. van der Vos and X. O. Breakefield (2014). "Extracellular RNA mediates and marks cancer progression." Semin Cancer Biol 28: 14-23.
- Rogers, J. C., D. Boldt, S. Kornfeld, A. Skinner and C. R. Valeri (1972). "Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen." Proc Natl Acad Sci U S A 69(7): 1685-1689.

- Rogers, J. C. and J. W. Kerstiens (1981). "Capping of DNA on phytohemagglutinin-stimulated human lymphoblasts." J Immunol 126(2): 703-705.
- Rykova, E. Y., P. P. Laktionov and V. V. Vlassov (2010). Circulating Nucleic Acids in Health and Disease, Springer Berlin Heidelberg.
- Rykova, E. Y., E. S. Morozkin, A. A. Ponomaryova, E. M. Loseva, I. A. Zaporozhchenko, N. V. Cherdyntseva, V. V. Vlassov and P. P. Laktionov (2012). "Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content." Expert Opin Biol Ther 12 Suppl 1: S141-153.
- Sakalova, A., P. R. Bock, L. Dedik, J. Hanisch, W. Schiess, S. Gazova, I. Chabronova, D. Holomanova, M. Mistrik and M. Hrubisko (2001). "Retrospective cohort study of an additive therapy with an oral enzyme preparation in patients with multiple myeloma." Cancer Chemother Pharmacol 47 Suppl: S38-44.
- San-Galli, F., P. Vignaud, J. Robert, J. M. Coindre and F. Cohadon (1989). "Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats." J Neurooncol 7(3): 299-304.
- Schwarzenbach, H., D. S. Hoon and K. Pantel (2011). "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients." Nat Rev Cancer 11(6): 426-437.
- Sengupta, N., T. S. MacFie, T. T. MacDonald, D. Pennington and A. R. Silver (2010). "Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression." Pathology-Research and Practice 206(1): 1-8.
- Serrano-Heras, G., C. Dominguez-Berzosa, E. Collantes, H. Guadalajara, D. Garcia-Olmo and D. C. Garcia-Olmo (2012). "NIH-3T3 fibroblasts cultured with plasma from colorectal cancer patients generate poorly differentiated carcinomas in mice." Cancer Lett 316(1): 85-90.
- Shklyayeva, O. A., N. L. Mironova, E. M. Malkova, O. S. Taranov, E. I. Ryabchikova, M. A. Zenkova and V. V. Vlasov (2008). "Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I." Doklady Biochemistry and Biophysics 420(1): 108-111.
- Siachoque, H., M. Ibáñez, L. Chuaire, O. García, A. Guzmán and L. Flórez (2005). "Determinación de interleucina-10 (IL-10) en pacientes con cáncer en estadios III y IV tratados con dexametasona." Revista Ciencias de la Salud 3: 148-155.
- Siess, D. C., C. T. Vedder, L. S. Merkens, T. Tanaka, A. C. Freed, S. L. McCoy, M. C. Heinrich, M. E. Deffebach, R. M. Bennett and S. H. Hefeneider (2000). "A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein." J Biol Chem 275(43): 33655-33662.
- Singh, N., S. Gupta, R. Pandey, S. S. Chauhan and A. Saraya (2015). "High Levels of Cell-Free Circulating Nucleic Acids in Pancreatic Cancer are Associated With Vascular Encasement, Metastasis and Poor Survival." Cancer investigation 33(3): 78-85.

- Stewart, B. and C. Wild (2014). "World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer." World Health Organization.
- Stokes, W. S. (2002). "Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing." ILAR Journal 43(Suppl 1): S31-S38.
- Stroun, M., P. Anker, P. Gahan, A. Rossier and H. Greppin (1971). "Agrobacterium tumefaciens ribonucleic acid synthesis in tomato cells and crown gall induction." Journal of bacteriology 106(2): 634-639.
- Stroun, M., P. Anker, P. Maurice and P. B. Gahan (1977). "Circulating nucleic acids in higher organisms." Int Rev Cytol 51: 1-48.
- Stroun, M., J. Lyautey, C. Lederrey, A. Olson-Sand and P. Anker (2001). "About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release." Clinica chimica acta 313(1): 139-142.
- Stroun, M., P. Maurice, V. Vasioukhin, J. Lyautey, C. Lederrey, F. Lefort, A. Rossier, X. Q. Chen and P. Anker (2000). "The origin and mechanism of circulating DNA." Ann N Y Acad Sci 906: 161-168.
- Sughrue, M. E., I. Yang, A. J. Kane, M. J. Rutkowski, S. Fang, C. D. James and A. T. Parsa (2009). "Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors." J Transl Med 7(1): 84.
- Sugihara, S., T. Yamamoto, H. Tanaka, T. Kambara, T. Hiraoka and Y. Miyauchi (1993). "Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice." Br J Cancer 67(1): 66-70.
- Suzuki, N., A. Kamataki, J. Yamaki and Y. Homma (2008). "Characterization of circulating DNA in healthy human plasma." Clin Chim Acta 387(1-2): 55-58.
- Szybalska, E. H. and W. Szybalski (1962). "Genetics of human cress line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait." Proc Natl Acad Sci U S A 48: 2026-2034.
- Tamkovich, S. N., A. V. Cherepanova, E. V. Kolesnikova, E. Y. Rykova, D. V. Pyshnyi, V. V. Vlassov and P. P. Laktionov (2006). "Circulating DNA and DNase activity in human blood." Ann N Y Acad Sci 1075: 191-196.
- Taper, H. S., J. M. Jamison, J. Gilloteaux, C. A. Gwin, T. Gordon and J. L. Summers (2001). "In vivo reactivation of DNases in implanted human prostate tumors after administration of a vitamin C/K(3) combination." J Histochem Cytochem 49(1): 109-120.
- Torrades, S. (2003). "El origen genético del cáncer de mama." Offarm 22(06): 108-112.
- Trejo-Becerril, C., L. F. Onate-Ocana, L. Taja-Chayeb, A. Vanoye-Carlo, L. Cetina and A. Duenas-Gonzalez (2005). "Serum nucleosomes during neoadjuvant chemotherapy in patients with cervical cancer. Predictive and prognostic significance." BMC Cancer 5: 65.

- Trejo-Becerril, C., E. Pérez-Cardenas, B. Gutiérrez-Díaz, D. De La Cruz-Sigüenza, L. Taja-Chayeb, M. González-Ballesteros, P. García-López, J. Chanona, and and A. Dueñas-González (2016). "Antitumor Effects of Systemic Dnase I and Proteases in an In Vivo Model." Integrative Cancer Therapies (En Prensa).
- Trejo-Becerril, C., E. Perez-Cardenas, L. Taja-Chayeb, P. Anker, R. Herrera-Goepfert, L. A. Medina-Velazquez, A. Hidalgo-Miranda, D. Perez-Montiel, A. Chavez-Blanco, J. Cruz-Velazquez, J. Diaz-Chavez, M. Gaxiola and A. Duenas-Gonzalez (2012). "Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model." PLoS One 7(12): e52754.
- Tsang, J. C. and Y. M. Lo (2007). "Circulating nucleic acids in plasma/serum." Pathology 39(2): 197-207.
- Vademecum. (2015). "Dexametasona." Retrieved 27 octubre, 2015, from <http://www.vademecum.es/principios-activos-dexametasona-h02ab02>.
- Valle, F. M., E. Balada, J. Ordi-Ros and M. Vilardell-Tarres (2008). "DNase 1 and systemic lupus erythematosus." Autoimmunity reviews 7(5): 359-363.
- Vellard, M. (2003). "The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals." Curr Opin Biotechnol 14(4): 444-450.
- Vera-Badillo, F., M. Al-Mubarak, A. Templeton and E. Amir (2013). "Benefit and Harms of New Anti-Cancer Drugs." Current Oncology Reports 15(3): 270-275.
- Vince, G. H., M. Bendszus, T. Schweitzer, R. H. Goldbrunner, S. Hildebrandt, J. Tilgner, R. Klein, L. Solymosi, J. C. Tonn and K. Roosen (2004). "Spontaneous regression of experimental gliomas—an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model." Experimental neurology 190(2): 478-485.
- Wagener, J. S. and O. Kupfer (2012). "Dornase alfa (Pulmozyme)." Current opinion in pulmonary medicine 18(6): 609-614.
- Wald, M., T. Olejar, P. Pouckova and M. Zadinova (1998). "Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma." Life Sci 63(17): PL237-243.
- Wald, M., T. Olejar, V. Sebkova, M. Zadinova, M. Boubelik and P. Pouckova (2001). "Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16." Cancer Chemother Pharmacol 47 Suppl: S16-22.
- Wald, M., E. Zavadova, P. Pouckova, M. Zadinova and M. Boubelik (1998). "Polyenzyme preparation Wobe-Mugos inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice." Life Sci 62(3): PL43-48.

- Watanabe, K., M. Sakamoto, M. Somiya, M. R. Amin, H. Kamitani and T. Watanabe (2002). "Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region." Neurological research 24(5): 485-490.
- Weigelt, B., J. L. Peterse and L. J. van 't Veer (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer 5(8): 591-602.
- Wen, F., A. Shen, A. Choi, E. W. Gerner and J. Shi (2013). "Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis." Cancer Res 73(14): 4256-4266.
- Wolfe, R. A., G. H. Sato and D. B. McClure (1980). "Continuous culture of rat C6 glioma in serum-free medium." J Cell Biol 87(2 Pt 1): 434-441.
- World Health Organization. (2015). "Cancer." Retrieved 25 octubre, 2015, from <http://www.who.int/topics/cancer/en/>.
- Wróblewski, F. and O. Bodansky (1950). "Presence of desoxyribonuclease activity in human serum." Experimental Biology and Medicine 74(2): 443-445.
- Yamaguchi, H., J. Wyckoff and J. Condeelis (2005). "Cell migration in tumors." Curr Opin Cell Biol 17(5): 559-564.
- Zhong, X. Y., A. Ladewig, S. Schmid, E. Wight, S. Hahn and W. Holzgreve (2007). "Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer." Archives of gynecology and obstetrics 276(4): 327-331.