

Disminución de la viabilidad y capacidad de proliferación en líneas celulares de origen tumoral, por efecto de una desoxirribonucleasa

Biol. Noé Alvarado Vásquez *

Dra. Susana Alcázar Leyva ‡

M en C. Ma. Teresa Benítez Rodríguez ‡

Dr. Pedro Zamudio Cortés *

Q.F.B. Patricia Rosas Medina §

Palabras clave: Endonucleasa, desoxirribonucleasa I, línea celular, supervivencia de tejidos.

Key words: Endonucleases, deoxyribonuclease I, cell line, tissue survival.

RESUMEN

La desoxirribonucleasa (DNasa I) es una nucleasa, capaz de intervenir en la degradación y reparación de los ácidos nucleicos. También participa en la eliminación de células dañadas, envejecidas o neoplásicas activando los sistemas relacionados con la muerte celular programada (MCP).

El fracaso para eliminar a las células neoplásicas por medio de la MCP, es debido entre otras cosas, a la disminución en la concentración o actividad de las nucleasas en este tipo de células, favoreciendo el desarrollo de la masa tumoral.

En este estudio, se valoró la viabilidad y capacidad de proliferación de las siguientes líneas tumorales: CaLu-1, SK-MES-1, HeLa, HEp-2, L-929; y en las siguientes células normales: mononucleares totales de sangre periférica (MNTSP) de pacientes sin cáncer y en los fibroblastos fetales MRC-5. La DNasa I se dosificó

sobre el cultivo celular a las siguientes concentraciones: 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, y 9.0 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados mostraron una correlación de dosis respuesta en la viabilidad y proliferación, con una pérdida en la viabilidad cercana al 100% para HeLa y HEp-2, y del 50% aproximadamente en CaLu-1, SK-MES-1 y L-929, comparadas con MNTSP y fibroblastos MRC-5, que redujeron de un 10 a 14% sus valores a la concentración más alta de DNasa I; en los resultados obtenidos al medir la proliferación celular, la tendencia fue similar en las líneas celulares a las concentraciones más altas de la nucleasa. Al valorar viabilidad y proliferación celular, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); al comparar los resultados obtenidos de células normales y líneas celulares de origen tumoral. La importancia de la DNasa I, como parte de un control fisiológico natural de la proliferación celular, como lo es la MCP, y los resultados obtenidos en este trabajo, nos permiten sugerir su posible utilización complementaria a la terapéutica tradicional en el tratamiento del cáncer.

ABSTRACT

Deoxyribonuclease (DNase I) is a nuclease involved in degradation and repair of nucleic acids. It also participates in elimination of damaged, aged or

* Departamento de Farmacología, INER.

‡ Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.

§ Departamento de Bioquímica, INER.

Correspondencia:

Biol. Noé Alvarado Vásquez, Departamento de Farmacología, INER. Calzada de Tlalpan 4502, Col. Secc. XVI, México, D.F. 14080. Tel. 666-45-89 ext. 256.

neoplastic cells by activating systems related to programmed cell death (PCD).

Failure to eliminate neoplastic cells through PCD is partially due to a decreased concentration or low activity of nucleases in this cell type, favoring the development of the tumoral mass.

In this study the viability and proliferation ability were evaluated for the following tumor cell lines: CaLu-1, SK-MES-1, HeLa, HEp-2, L-929, and for the following normal cells: peripheral blood mononuclear total cells (PBMNTC) from patients without cancer, and for MRC-5 fetal fibroblasts. DNase I was administered to the cell cultures at 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, and 9.0 $\mu\text{g/mL}$ concentrations. Our results showed a dose-response correlation with the viability and proliferation responses, with a loss of viability close to 100% for HeLa and HEp-2, and close to 50% in CaLu-1, SK-MES-1 and L-929, compared with PBMNTC and MRC-5 fibroblasts, values which were reduced in 10 and 14% at highest DNase I concentration. With respect to cell proliferation results, tendency was similar in the cell lines at highest nuclease concentrations. Statistical differences ($p < 0.05$) appeared when viability and cell proliferation between normal and tumoral cells were compared. The importance of DNase I as part of the natural physiological control of cell proliferation, as it is the PCD, and the results obtained in this work, lead us to suggest the possibility of the complementary use of DNase I added to the traditional cancer treatment.

INTRODUCCION

En todas las células existen, normalmente, enzimas capaces de degradar a los ácidos nucleicos, conocidos como nucleasas. A esta familia pertenece la DNasa I. Endonucleasa que tiene una amplia distribución en la economía orgánica, y que además de su función enzimática, puede intervenir en la reparación¹, replicación y degradación de los ácidos nucleicos². Cumple además, una función importante en la eliminación de células envejecidas, dañadas o tumorales³.

En el cáncer, uno de los mecanismos para el control del crecimiento tumoral es la muerte celular programada (MCP), cuyo patrón morfológico se conoce como apoptosis⁴, la cual está caracterizada por colapso nuclear, formación de vesículas autofágicas, degradación de la cromatina y formación de protuberancias en la membrana celular⁵. En el proceso de la MCP se sintetizan y funcionan en forma importante las nucleasas, de las cuales se han descrito al menos cuatro tipos (NUC-18, DNasa II, DNasa independiente de Ca^{++} , nuc-1)⁶, destacando principalmente la DNasa I⁷. Esta enzima se aisló inicialmente de páncreas bovino, pero actualmente se sabe que tiene una amplia distribución en el organismo⁸. Su actividad es dependiente de los iones Ca^{++} , Mg^{++} , y Mn^{++} .

En varios trabajos de investigación, se ha mostrado que las nucleasas se encuentran alteradas en su actividad o concentración en células cancerosas⁹, lo que bloquea un mecanismo de control natural de la proliferación de células tumorales, como es la MCP. Uno de los posibles

mecanismos de inhibición, que se proponen, se deriva de la acción de los oncogenes que se encuentran más activados en las células tumorales, ya que se conoce que productos derivados de ellos pueden interferir con la MCP, en forma directa o indirecta^{10, 11}.

Entre las diversas opciones terapéuticas con las que se trabaja para el tratamiento del cáncer, se tiene la utilización de fosfodiesterasas, entre las que se incluye a la DNasa I¹², dadas sus características e importancia en uno de los mecanismos naturales de la proliferación celular, como lo es la MCP. Su utilidad como un agente adicional en el tratamiento del cáncer, se ha corroborado en experimentos realizados en células cancerosas procedentes de diversos organismos, tanto *in vivo* como *in vitro*^{13, 14}, además se ha observado que tiene la capacidad de disgregar a la masa tumoral, lo que facilitaría la entrada de los agentes quimioterapéuticos; así como su actividad en la degradación de los ácidos nucleicos. En el estudio que se presenta, el objetivo es valorar el efecto de una nucleasa (DNasa I), en la viabilidad y capacidad proliferativa de células epidermoides de origen tumoral y células normales (de origen no tumoral) *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

Líneas celulares

Células tumorales, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC): 1) HEp-2 de un carcinoma epidermoide de laringe humano; 2) HeLa, carcinoma epidermoide de cervix uterino humano; 3) Calu-1, carcinoma epidermoide de pulmón humano; 4) SK-MES-1, carcinoma epidermoide de pulmón; 5) L-929, procedente de tejido conectivo de ratón.

Controles normales (origen no tumoral): 1) MRC-5, fibroblastos de pulmón fetal humano y 2) Mononucleares totales de sangre periférica (MNTSP) de dos pacientes sanos (MNTSP-1 y MNTSP-2), sin procesos tumorales, obtenidas por punción venosa en jeringa heparinizada.

Cultivos celulares

Las células crecen en botellas de cultivo de 50 mL (NUNC, Co.), con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal de ternera (SFT) (SIGMA, Co.), 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin (GIBCO, Co.). En atmósfera de CO_2 al 5% y con una temperatura de 37°C. Cuando las células llegaron a confluencia en las botellas de cultivo, se desprendieron incubándolas con tripsina al 0.5% y EDTA (ácido etilén diamino tetrazoico) 0.2% (SIGMA, Co.). Posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo suplementado con SFT y antibióticos. La viabilidad se valoró con azul de tripán. En placas de cultivo de 24 pozos, se sembraron 200,000 células por pozo en un volumen de 1 mL de medio de cultivo.

Incubación con la DNasa I

Se incubaron los tipos celulares ya mencionados, con una de las siguientes concentraciones de DNasa I (Hypatia) en

pH 9.5: 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, y 9.0 $\mu\text{g/mL}$ que se adicionaron a las células en cultivo, se dejó actuar durante 24 horas al término de las cuales se realizó el conteo de células viables en los diferentes cultivos, y se observó al microscopio de luz. Se hicieron cinco experimentos por duplicado para cada concentración de DNasa I utilizada.

Valoración de la viabilidad celular

Se usaron dos colorantes vitales: el azul de tripán y el cristal violeta (SIGMA, Co.). Se extrajo el sobrenadante y las células suspendidas de cada uno de los pozos, después se transfirieron a un tubo de ensayo lavándolas por centrifugación y resuspendiéndolas en un volumen de 1 mL de medio de cultivo, de donde se tomó 30 μL y se mezcló volumen a volumen con una solución al 20% de azul de tripán, se realizó el conteo de células vivas en una cámara de Neubauer. Las células que permanecen adheridas al pozo de cultivo se tripsinizan y se repite el procedimiento mencionado.

En placas distintas se utiliza cristal violeta al 0.5% (peso/volumen) en metanol al 70%; sobre las células adheridas a la placa de cultivo, este colorante tiñe y fija a las células viables y se comparan los resultados obtenidos con el azul tripán.

Proliferación celular

Para evaluar la proliferación, se marcaron los cultivos celulares con ^3H -timidina, y se incubó con la desoxirribonucleasa, utilizando las mismas concentraciones utilizadas en los experimentos para viabilidad. En placas de cultivo de 96 pozos (NUNC, Co.), se sembraron 50,000 células/pozo con las concentraciones de DNasa I, durante 24 horas, al término de este tiempo, se marcó con 1 μCi /pozo y se incubó por 18 horas, después de las cuales se cosechó y se leyó en un contador de centelleo (BECKMAN, modelo LS6000SE). Los resultados se muestran como unidades de estimulación y porcentajes de cuentas por minuto (cpm). Se realizaron cinco experimentos por duplicado para cada una de las concentraciones de nucleasa utilizadas.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Viabilidad

En la figura 1 podemos observar el efecto que tiene la DNasa I sobre la viabilidad de las líneas celulares utilizadas. Para el valor del 100%, se consideraron los resultados obtenidos de los conteos celulares en los pozos control, en donde no se tenía la presencia de la DNasa I.

La concentración más baja que se utilizó fue de 0.75 $\mu\text{g/mL}$, tuvo un mínimo efecto citolítico en las líneas tumorales del 15 al 7%, mientras que en las MRC-5 y en las MNTSP de los dos controles no hubo ningún efecto. En relación con la segunda concentración utilizada (1.5 $\mu\text{g/mL}$), se observó un incremento en su acción hacién-

dose más patente en las HEP-2, en donde el 31% de las células se lisaron, mientras que las SK-MES-1 sólo mostraron una citólisis del 5%, en los mononucleares obtenidos de un sujeto control; también se observó una pérdida del 5% en la viabilidad (MNTSP-2), mientras que en las MNTSP-1 y en las células MRC-5 no se observó ningún cambio. Con la concentración de 3.0 $\mu\text{g/mL}$ se tuvo una caída de la viabilidad cercana al 50% tanto en células HEP-2, como en las HeLa; en comparación las células Calu-1, SK-MES-1 y L-929 mostraron una disminución en su viabilidad del 12 al 6%; en los controles el efecto osciló entre el 5-3%.

Al utilizar 6.0 $\mu\text{g/mL}$ de la nucleasa, se tuvo una caída en la viabilidad de 65-90% para las células HEP-2 y HeLa, mientras que las líneas Calu-1 y L-929 tuvieron una pérdida del 40% aproximadamente. El grupo que mostró la menor sensibilidad al efecto de la DNasa I fue el de las SK-MES-1 con un 18%. Los valores para los controles fueron del 10-5%. Con 9.0 $\mu\text{g/mL}$ las células que mostraron una mayor pérdida en la viabilidad fueron las HEP-2 y HeLa (88-96%), mientras que para las Calu-1, SK-MES-1 y L-929 los valores se encontraron entre 46-55%, los controles en esta concentración variaron de 10 al 14%.

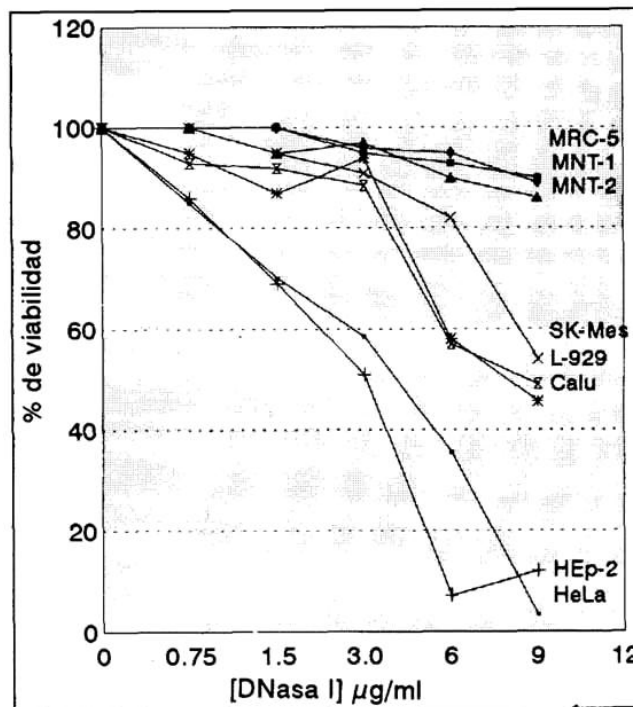


Figura 1. Se observa que las células que mostraron una mayor pérdida de su viabilidad fueron células HEP-2 y HeLa, mientras que SK-Mes, L-929 y Calu sufrieron una disminución aproximada al 50%, los valores para los controles se encuentran entre 10 a 15%.

La tinción con cristal violeta, la podemos observar en la figura 2, el color uniforme nos habla de la viabilidad de la monocapa de células que se encuentran en el pozo de

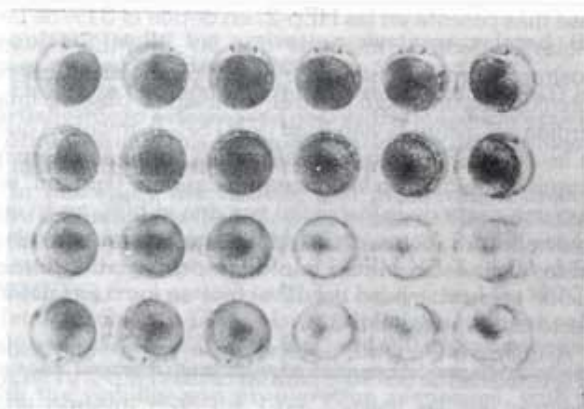


Figura 2. Ejemplo de tinción con cristal violeta, las concentraciones de DNasa I se incrementan de izquierda a derecha, en las dos líneas horizontales superiores se tiene a células MRC-5, en las dos líneas inferiores se encuentran células HEp-2. El color constante en los pozos nos indica que las células de la monocapa son viables, mientras que la pérdida de color implica desprendimiento y muerte celular.

cultivo, mientras que la falta de color nos indica desprendimiento así como muerte celular. En esta figura, tenemos un ejemplo de tinción con cristal violeta, en la primera y segunda hilera superiores (horizontalmente) tenemos células MRC-5, y podemos observar que la tinción es uniforme con excepción de los últimos pozos, en donde se tiene una ligera pérdida de color, las concentraciones de DNasa I se incrementan de izquierda a derecha, en las dos líneas inferiores, tenemos células HEp-2 y observamos que la pérdida en la tinción se observa a partir del pozo número 4 (concentración de 3.0 $\mu\text{g/mL}$).

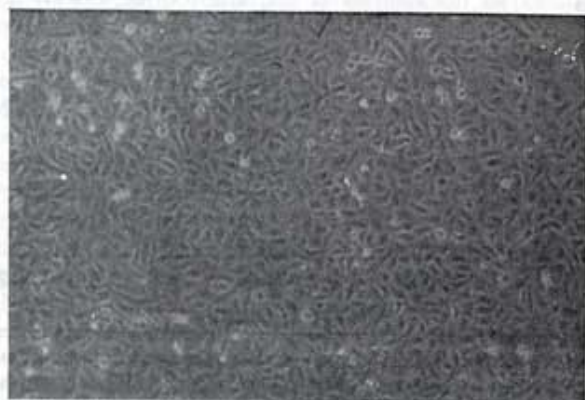


Figura 3. Células HEp-2 en cultivo de 24 horas sin DNasa I.

En la figura 3 observamos el aspecto de un cultivo de células HEp-2 sin DNasa I a las 24 horas, estas células son adherentes y como se observa en la figura su morfología,

contorno y constitución es la que se presenta normalmente en cultivo. En la figura 4 las células han sido expuestas a la concentración de 9.0 $\mu\text{g/mL}$, en esta condición las células se redondean, se despegan de la placa de cultivo, el núcleo celular se contrae, se forman pequeñas vesículas en el interior celular y en general pierden su morfología característica.

Al comparar las figuras 3 y 4, cuando la incubación de los cultivos celulares se realiza en presencia de la nucleasa, o bien, cuando ésta no se encuentra presente en el cultivo, el cambio es drástico, las células que están cultivadas con 9.0 μg de DNasa I muestran características semejantes a las que se observan en células apoptóticas.

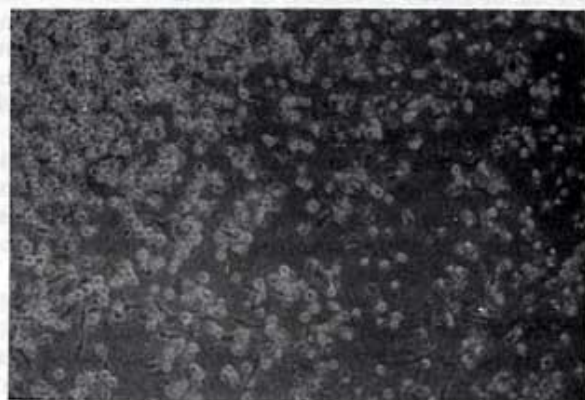


Figura 4. Células HEp-2 incubadas por 24 horas con 9.0 $\mu\text{g/mL}$, a este tiempo las células se desprenden de la placa de cultivo, se redondean y el núcleo celular se contrae.

Proliferación

Los valores obtenidos con la incorporación de timidina tritiada se tienen en la figura 5 y se reportan como unidades de estimulación (U.E.) en la tabla I. Se observa que con la DNasa I a la concentración de 0.75 $\mu\text{g/mL}$ células HeLa y Calu-1 muestran un 107% en sus cpm, en los otros tipos celulares de origen tumoral, los porcentajes se encuentran en un intervalo que va del 91-100%. Los valores encontrados en los controles van del 95 (MNT-2) hasta un 120% (MNT-1). Al utilizar 1.5 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un incremento en las cpm para las células HeLa (112%); mientras que HEp-2, Calu-1 y SK-MES-1 están en un intervalo que va de 94-99%, las L-929 muestran una caída hasta del 50%. Los controles MRC-5 no muestran ningún cambio, pero las MNT-1 y 2 tienen un incremento en sus valores que van del 105 al 118%.

La concentración de 3.0 $\mu\text{g/mL}$ afecta de manera mínima a las células Calu-1 y SK-MES-1 (94 y 97% respectivamente), mientras que las células HEp-2 y HeLa (82 y 86%) muestran una disminución mayor en sus porcentajes, las L-929 presentan el descenso más pronunciado (68.8%); por su parte las MNT-1 y 2 tienen un incremento que va del 110 al 114%, y las MRC-5 ven disminuidos ligeramente sus valores (95%). Con 6.0 $\mu\text{g/}$

Tabla I. Unidades de estimulación (U.E.) en líneas celulares transformadas y normales en presencia de DNasa a diferentes concentraciones.

SK-Mes	1	1	0.99	0.97	0.9	0.71
HEp-2	1	0.96	0.94	0.82	0.56	0.47
HeLa	1	1.07	1.12	0.86	0.64	0.51
CaLu	1	1.07	0.96	0.94	0.75	0.73
MRC-5	1	0.98	1	0.95	0.93	0.89
MNT-1	1	1.2	1.05	1.1	1.07	0.9
MNT-2	1	0.95	1.18	1.14	0.97	0.86
L-929	1	0.91	0.75	0.688	0.65	0.517

DNasa	0.0 µg/mL	0.75	1.5	3.0	6.0	9.0
-------	-----------	------	-----	-----	-----	-----

Con las concentraciones más bajas de DNasa se tiene un ligero aumento en las U.E., los cambios que podemos considerar como importantes se tienen con 6 y 9 µg/mL en las células L-929, HeLa y HEp-2.

mL las células SK-MES-1 tienen un descenso ligeramente mayor en su porcentaje de incorporación de timidina tritiada (90%), en los demás tipos celulares de origen tumoral la disminución es más grande y va del 56% (HEp-2) hasta el 75% (Calu-1). Los controles MRC-5 y las MNT-2 ven afectados ligeramente sus valores (93 y 97% respectivamente), en las MNT-1 se tiene un aumento hasta el 107%.

Al incubar las diferentes líneas celulares tanto de origen tumoral como normal con 9.0 µg/mL, se encontró que SK-MES-1 y Calu-1 tienen un descenso en sus cpm hasta del 71 y 73%, para las células HEp-2, HeLa y L-929 sus valores caen desde el 47 hasta el 52% aproximadamente. Es interesante hacer notar que los controles, si bien muestran también una disminución en sus registros, a esta concentración el efecto es menor manteniéndose entre el 86 y el 90%.

DISCUSION

Como se observa en la figura 1, las líneas celulares utilizadas muestran un comportamiento de dosis-respuesta en presencia de la DNasa I, las células HeLa y HEp-2 son quienes muestran una pérdida mayor de viabilidad casi del 100%, mientras que las SK-MES-1, L-929 y Calu-1 aproximadamente del 50%, los controles ven disminuida su viabilidad en un 15%. La drástica caída en los valores de las células HeLa y HEp-2, es bastante significativo (con 9.0 µg/mL), la explicación a esto puede estar relacionada con su capacidad proliferativa, se ha visto que células con una gran actividad mitótica, son más sensibles a la acción de las DNasas y sólo se necesita la entrada de una mínima cantidad de la enzima para mostrar efecto citolítico¹². Como se comentó con anterioridad, la acción de las nucleasas en general se encuentra alterada en las células cancerosas⁹, lo cual influye para que la célula transformada no pueda ser eliminada por medio de la MCP, al administrar endonucleasa exógena, se intenta corregir la deficiencia que existe en las células tumorales, lo que daría como resultado una disminución en la viabilidad de las células, al influir probablemente, para su entrada en la MCP, tal y como se muestra en la figura 1¹⁵.

Los datos encontrados al marcar con timidina tritiada se muestran en la figura 5, a bajas concentraciones de DNasa I (0.75-3.0 µg/mL), tenemos que las MNT-1 y 2, HeLa, Calu-1 y SK-MES-1 muestran estimulación o bien, ningún efecto significativo en su actividad proliferativa, no sucede así con las células HEp-2 y L-929 que muestran

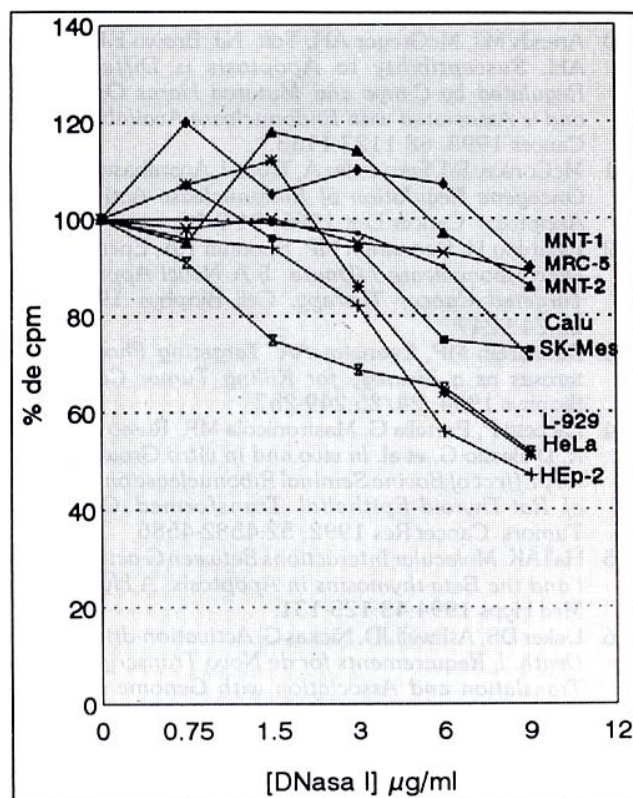


Figura 5. Se observa con las concentraciones bajas de DNasa un incremento en las cpm para varios tipos celulares, las diferencias significativas las tenemos con 6 y 9 µg/mL, principalmente en las células L-929, HeLa y HEp-2.

una disminución en la incorporación de timidina tritiada conforme se incrementan las concentraciones de la nucleasa. Se ha descrito que la célula en MCP, es metabólicamente muy activa¹⁶, en este trabajo se observa alta actividad al utilizar las concentraciones más bajas de la DNasa I, las cpm se incrementan de forma notable en algunos tipos celulares, debido quizás a que los mecanismos implicados en la MCP se activan.

En las figuras 3 y 4, se observa el aspecto que tienen las células en presencia o ausencia de la endonucleasa, y más aún en presencia de la DNasa I pues en ella se observan algunas de las características de las células que se encuentran en MCP⁵, con el patrón característico de la apoptosis como son: colapsamiento nuclear, vesículas autofágicas, formación de vesículas en la membrana celular.

Como se observa en los resultados obtenidos, tenemos que las células de origen tumoral son quienes muestran una mayor pérdida en su viabilidad, así como en su capacidad de proliferación, al comparar con los valores de las células de origen no tumoral. Con base a lo anterior, se propone la utilización de la DNasa I por sus características y por su importancia en la MCP, como un agente suplementario en el tratamiento del cáncer. Se tiene como fundamento entre otras cosas, los resultados obtenidos al utilizar a este tipo de enzima para disgregar a la masa tumoral, con lo que se facilitaría la entrada de los agentes quimioterapéuticos que se utilizan comúnmente en el tratamiento del cáncer¹⁷. Al utilizar DNasa I, se ha encontrado que en un 68% de sujetos con cáncer se tiene, una mejor respuesta al tratamiento convencional¹⁸, si bien el tipo de proceso canceroso que estos sujetos mostraban es diverso, lo cual da pie para una discusión aparte. Se ha usado además la determinación sérica de nucleasas como un factor de pronóstico y evolución en pacientes con tratamiento para linfomas¹⁹. La diferencia en las respuesta de células normales y líneas neoplásicas, concuerda con algunos trabajos en los cuales se ha encontrado que las nucleasas tienen mayor afinidad y efecto en células cancerosas²⁰. Por otra parte, cabe mencionar, que entre las muchas líneas de investigación que se siguen actualmente, se busca explotar las características de la MCP, utilizando diversos agentes inductores de ésta, pues se ha visto que una deficiente activación de la MCP está implicada en una gran diversidad de padecimientos²¹, entre los que se incluye, como ya se comentó al cáncer.

Actualmente, nos encontramos realizando experimentos complementarios que aporten más datos como apoyo de nuestras hipótesis, así como en la manera en que se encuentra actuando la DNasa I.

REFERENCIAS

1. Puck TT, Krystosek A. *Reverse Transformation, Genome Exposure and Cancer*. Adv Can Res 1993; 62:125-151.
2. Kokileva L. *Multi-step Chromatin Degradation in Apoptosis. DNA Breakdown in Apoptosis*. Int Arch Aller Immunol 1994; 105:339-343.
3. Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, et al. *Characterization of the Endogenous Deoxiribonuclease Involved in Nuclear DNA Degradation During Apoptosis (Programmed Cell Death)*. EMBO J 1993; 12:371-377.
4. Cohen RC, Duke VA, Fadok SS, Karen SS. *Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity*. Ann Rev Immunol 1992; 10:267-294.
5. Seamus JM. *Apoptosis: Suicide, Execution or Murder?* TICB 1993; 3:141-144.
6. Peitsch MC, Georg H, Tschopp M. *The Apoptosis Endonucleases: Cleaning up after Cell Death?* TICB 1994; 4:37-41.
7. Polzar R, Zanotti S, Stephan H, Peitsch MC, Irmeler M, et al. *Distribution of Deoxiribonuclease I in Rat Tissues and its Correlation to Cellular Turnover and Apoptosis (Programmed Cell Death)*. Eur J Cell Biol 1994; 64:200-210.
8. Peitsch MC, Irmeler M, French LE, Tschopp J. *Genomic Organization and Expression of Mouse Deoxiribonuclease I*. Biochem Biophys Res Commun 1995; 207:62-68.
9. Mély-Goubert B, Matzku S, Bellgrau D. *DNase I Inhibitions in Tumors of Different Metastasizing Capacities: A Possible Index of Invasiveness*. Cancer Biochem Biophys 1983; 7:39-44.
10. Arends MJ, McGregor AH, Toft NJ, Brown EJH, Wyllie AH. *Susceptibility to Apoptosis is Differentially Regulated by C-myc and Mutated Haras Oncogenes and is Associated with Endonuclease Availability*. Br J Cancer 1993; 68:1127-1133.
11. McConkey DJ, Fernandez A, Trent J, Ananthaswamy HN. *Oncogene Regulation of Endonuclease Activation in Apoptosis*. Cancer Lett 1995; 94:9-16.
12. Linardou H, Deonarain MP, Spooner RA, Epenetos AA. *Deoxiribonuclease I (Dnase I) A Novel Approach for Targeted Cancer Therapy*. Cell Biophys 1994; 25/25:243-247.
13. Deonarain MP, Epenetos AA. *Targeting Phosphodiesterases as a Strategy for Killing Tumor Cells*. Cells Biophys 1994; 24/25:249-257.
14. Laccetti P, Portella G, Mastronicola MR, Russo A, Piccoli R, D'alessio G, et al. *In vivo and in vitro Growth-inhibitory Effect of Bovine Seminal Ribonuclease on a System of Rat Thyroid Epithelial Transformed Cells and Tumors*. Cancer Res 1992; 52:4582-4586.
15. Hall AK. *Molecular Interactions Between G-actin, DNase I and the Beta-thymosins in Apoptosis: A Hypothesis*. Med Hyps 1994; 43:125-131.
16. Ucker DS, Ashwell JD, Nickas G. *Activation-driven T Cell Death. I. Requirements for de Novo Transcription and Translation and Association with Genome Fragmentation*. J Immunol 1989; 143:3461-3469.
17. Sugihara S, Yamamoto T, Tsuruta J, Tanaka J, Hiraoka T, Tashiro S, et al. *Enzyme-Induced Aggregation and Disaggregation of Tumor Cells Via the Cell Surface Glycocalyx in Association with Deoxiribonucleic Acid*. Acta Pathol Jpn 1991; 41:327-335.
18. Alcázar MH, Alcázar LS, Rivera LR, Benítez RMT. *Therapeutic Perspectives of Nucleases in Cancer*. Inv Med Int 1995; 22:9-13.

19. Economidou KA, Lans M, Taper HS, Michaux JL, Roberfroid M. *Variations in Serum Alkaline DNase Activity. A New Means for Therapeutic Monitoring of Malignant lymphomas.* J Am Can Soc Cancer 1988; 61:1838-1843.
20. Laccetti P, Spalletti-Cernia D, Portella G, De Corato P, D'alessio G, Vecchio G. *Seminal Ribonuclease Inhibits Tumor Growth and Reduces the Metastatic Potential of Lewis Lung Carcinoma.* Cancer Res 1994; 54:4256-4259.
21. Thompson CB. *Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease.* Science 1995; 267:1456-1462.