

Efectos de la desoxirribonucleasa I sobre células del melanoma murino B16-F10

Mónica García-Higuera*
Noé Alvarado-Vásquez*
Susana Alcázar-Leyva†
Manuel Meneses-Flores‡
Eduarda Cerón-Rodríguez*
Pedro Zamudio-Cortés*

Palabras clave: Apoptosis, nucleasas, cáncer, melanoma, células B16-F10.

Key words: Apoptosis, nucleases, cancer, melanoma, cells B16-F10.

RESUMEN

Introducción: La importancia de las nucleasas en la regulación del crecimiento celular (a través de la apoptosis) hace relevante investigar su utilidad para controlar el crecimiento tumoral.

Objetivo: Valorar el efecto que una desoxirribonucleasa tuvo sobre células del melanoma murino B16-F10.

Material y métodos: Las células fueron incubadas a diferentes tiempos y concentraciones de la DNasa, después de lo cual se evaluó su viabilidad, crecimiento y daño al DNA.

Resultados: Se encontró que la viabilidad y actividad mitocondrial medida por medio de la técnica de exclusión con azul de tripán o, bien, por el colorante MTT no mostró ningún cambio significativa-

tivo, sin embargo, la capacidad de crecimiento celular (número total de células) sí se vio modificada de una manera dosis dependiente. Con respecto del daño al DNA, nuestros resultados indican un efecto a las 24 horas de incubación de la nucleasa con las células, bandas de 400 y 200pb se encontraron en el corrimiento electroforético.

Conclusión: la DNasa utilizada en este trabajo no tuvo ningún efecto significativo sobre la viabilidad, pero sí en el crecimiento celular, así como sobre la estructura del DNA por un mecanismo aún no determinado.

ABSTRACT

Introduction: Importance of the nucleases in the regulation of cellular growth (through the apoptosis) makes necessary to investigate their utility to control tumoral growth.

Objective: We evaluated the effect that deoxyribonuclease (DNase) had on cells of the melanoma murine B16-F10.

Material and methods: the cells were incubated at different times and concentrations of the DNase and then their viability, growth and damage to the DNA were evaluated.

Results: Showed that their viability and mitochondrial activity measured by means of the exclusion technique with trypan blue or with MTT didn't show any significant change, however, the capacity of cellular growth (total number of cells)

* Departamento de Investigación en Genética, INER.

† Instituto de Investigaciones Científicas, Hans Selye, A.C., México.

‡ Departamento de Investigación en Salud Ambiental, INER.

Correspondencia:

M en C. Noé Alvarado Vásquez. Departamento de Investigación en Genética, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI. México, D.F., 14080. E-mail: nnaavu@yahoo.com

Trabajo recibido: 8-VI-2001; Aceptado: 28-VI-2001

was modified in a dependent dose way. With regard to the damage to his DNA our results indicate an effect at the 24 hours of the nuclease incubation with the cells, bands of 400 and 200 pb were found in the agarose gel.

Conclusion: the DNase I used in this work didn't have any significant effect on the viability, but did on the cellular growth, as well as on the structure of the DNA due to an uncertain mechanism.

INTRODUCCIÓN

La desoxirribonucleasa I (DNase I) cumple funciones tan importantes como la lisis de las células envejecidas o disfuncionales, así como lleva a cabo la destrucción de las células neoplásicas, los resultados obtenidos por diferentes investigadores indican que este efecto es derivado de la degradación del ácido desoxirribonucleico (DNA). Se ha demostrado la activación de la DNase I por variaciones en la topología del DNA¹, asimismo, se ha determinado su presencia en tejidos o fluidos corporales como páncreas, hígado, riñón, suero u orina². Por otra parte, ha sido comprobada su participación en la fragmentación del DNA celular durante la apoptosis. Con respecto a su actividad, esta se encuentra regulada por factores como la proteína actina, la concentración de cationes divalentes, la temperatura o el pH³⁻⁶. En nuestros días la concentración de la DNase I en suero, se usa como un marcador en la evolución de la enfermedad en el paciente con cáncer⁷. Existen reportes provenientes de diferentes grupos de investigación, en donde se demuestra que la apoptosis se encuentra inhibida en las células tumorales, principalmente por la inactivación de la DNase I implicada en el corte del DNA durante la apoptosis, esta inhibición puede derivarse de productos derivados de los oncogenes⁸ o, bien, a la proteína actina⁹.

Buscando aprovechar su capacidad de degradación de los ácidos nucleicos, la aplicación de las nucleasas como tratamiento terapéutico del cáncer fue propuesto desde hace ya algún tiempo¹⁰, sin embargo, la falta de resultados concretos ha estimulado la investigación a este respecto. Actualmente se trabaja con técnicas de biología molecular en la modificación de la estructura de la nucleasa², buscando de esta manera facilitar su entrada a la célula y activar a la apoptosis en la célula tumoral.

En este trabajo, se utilizó a la DNase I estable en solución y se valoró su efecto sobre la viabilidad, actividad y degradación del DNA celular a diferentes tiempos en células del melanoma murino B16-F10.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Se utilizó la línea celular de melanoma murino B16-F10 que se obtuvo del *American Type Culture Collection* (donación del laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM), la cual se mantuvo en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, México) adicionado con 5% de suero de ternera fetal, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de sodio 1mM, L-glutamina 1mM,

100µg/mL de estreptomicina y 100UI/mL de penicilina, en botellas de cultivo de 50mL (Greiner, Alemania).

Reactivos. La desoxirribonucleasa I (DNase I) obtenida de páncreas bovino y estable en solución fue donada por el Laboratorio de Investigaciones Filosóficas y Científicas, S.A. de C.V., México. La tripsina-verseno sódico fue obtenida de *In Vitro*, México. Azul de tripán, MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2, 5-diphenyletrazolium bromide, thiazolyl blue]), cristal violeta, cloroformo, isopropanol y fenol (grado biología molecular) fueron obtenidos de Sigma Chemical.

Determinación del número celular total. Un número de 1×10^6 células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos (Greiner, Alemania) e incubadas inmediatamente con una de las siguientes concentraciones de DNase I: 175.0, 87.5, 43.7, 21.8, 10.9 y 5.45 ng/mL, en un volumen final de 2mL por 24, 48 y 72 horas. Cada 24 horas el medio de cultivo con la nucleasa fue renovado (cada una de estas concentraciones fue utilizada en los diferentes experimentos llevados a cabo). Todos los experimentos se realizaron por triplicado, los controles fueron cultivos celulares sin la nucleasa. Al finalizar cada uno de los tiempos de incubación, el medio de cultivo se recolectó junto con las células que permanecían en suspensión; a las células que se mantuvieron adheridas se les adicionó 500µL de tripsina (tripsina 0.05% con 0.05% de verseno sódico) por 1min, la tripsina se decantó y se incubó por 5min a 37°C. Al finalizar este tiempo con ayuda del medio de cultivo recolectado inicialmente, se resuspendieron las células y se centrifugaron por 10min a 1,800rpm, el medio se decantó y el paquete celular se resuspendió en 1mL de medio de cultivo fresco, se tomó una muestra de 20µL que se mezcló con 80µL de azul de tripán y finalmente se procedió a contar y determinar el número total de células con ayuda de una cámara de Neubauer.

Viabilidad y funcionalidad celular. En placas de cultivo de 24 pozos fueron sembradas 5×10^4 células por pozo e incubadas de inmediato con las siguientes concentraciones de DNase I: 175.0, 87.5, 43.7, 21.8, 10.9 y 5.45ng/mL por 24, 48 ó 72 horas a 37°C. Al finalizar cada uno de los tiempos de incubación mencionados, se decantó el medio de cultivo de cada pozo y se procedió a teñir la placa con el colorante MTT (5mg/mL) disuelto en medio de cultivo por 1 hora, el colorante fue decantado y la placa se lavó dos veces con medio de cultivo sin suero de ternera fetal. La sal de formazán producto de la reducción del MTT en la célula fue liberado mediante la adición de 200µL de dimetilsulfóxido (Sigma, México) y finalmente se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro a 570nm.

Determinación del número de colonias. Un número de 500 células por pozo fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos, estas fueron incubadas individualmente con las concentraciones de DNase I ya mencionadas (175.0, 87.5, 43.7, 21.8, 10.9 y 5.45ng/mL) por 24, 48 ó 72 horas. Posteriormente, cada uno de los cultivos fue

teñido y fijado con el colorante cristal violeta (0.05%) disuelto en metanol al 70% por 15min, el colorante fue decantado y los restos de éste fueron cuidadosamente eliminados de la placa de cultivo con agua corriente. La placa se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se contó el número de colonias formadas de acuerdo con la técnica de Laccetti y colaboradores¹¹.

Obtención del DNA. En placas de cultivo de 6 pozos se colocaron 1×10^6 células por pozo, las cuales fueron incubadas con las concentraciones ya mencionadas de la DNasa I. La incubación celular se realizó a los siguientes tiempos: 2, 6, 8, 24, 48 y 72 horas; al concluir los tiempos de incubación se colectaron las células presentes en el medio de cultivo así como las adheridas. Todas las células fueron centrifugadas a 1,800rpm por 10min, el sobrenadante fue decantado y las células resuspendidas en 300 μ L de solución de lisis (Tris 50mM pH= 8.5, EDTA 1mM, Tween 20 0.5% y proteinasa K 100 μ g/mL), e incubadas por 18 horas a 55°C en Baño María. Posteriormente, se transfirió la solución con el lisado celular a tubos Eppendorff estériles, en donde se adicionó un volumen equivalente de la mezcla fenol-clorofórmol-alcohol isopropílico (25:24:1); se realizó su mezcla por inversión suave y se centrifugó a 14,000rpm por 15min, la fase acuosa fue transferida a otro tubo en donde 1/10 del volumen total de acetato de sodio (3M, pH= 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4°C fueron adicionados, centrifugándose nuevamente en las condiciones ya mencionadas. El sobrenadante fue decantado y el DNA lavado una vez con etanol al 70%. Se eliminó el alcohol y el botón con el DNA se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en 100 μ L de amortiguador TE (Tris-EDTA, pH= 7.4). Por 1 hora a 80 volts se realizó la electroforesis de 2 μ g de DNA por carril en gel de agarosa

al 2%, se visualizaron los resultados obtenidos en un transiluminador de luz ultravioleta. (Ultra-Lum).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Tukey y la de Dunnett en donde una $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Se muestra que el número total de células se modificó de manera directamente dependiente a la concentración de la nucleasa, observándose principalmente a las 72 horas (Figura 1). Es importante mencionar que las células incubadas con la nucleasa no mostraron daño en el nivel de la membrana celular (aumento en el número de células teñidas con el azul de tripán), sólo el número total de células fue quien mostró un cambio. Tal y como se observa en la Figura 1, el número de células (promedio $\pm$ DS) fue menor en todas las concentraciones utilizadas con respecto al crecimiento celular sin la DNasa I, sin embargo, existió un comportamiento ligeramente diferente al emplear la concentración de 87.5ng/mL ($p < 0.05$). A las 48 y 72 horas el efecto de la nucleasa se observó más claramente con las concentraciones utilizadas. Los resultados obtenidos al emplear al colorante MTT (Figura 2), el cual es reducido únicamente en células viables activas, no mostró ningún cambio significativo a las 24, 48 y 72 horas ($p < 0.05$), con excepción del punto a las 72 horas en presencia de una concentración de 175ng/mL.

Otro aspecto que consideramos importante valorar fue la capacidad formadora de colonias de las células B16-F10. La línea celular utilizada ha demostrado tener una alta capacidad para formar pequeños tumores, además de realizar metástasis en distintos modelos biológicos. En los resultados obtenidos se observa una disminución en la capacidad formadora de colonias dependiente

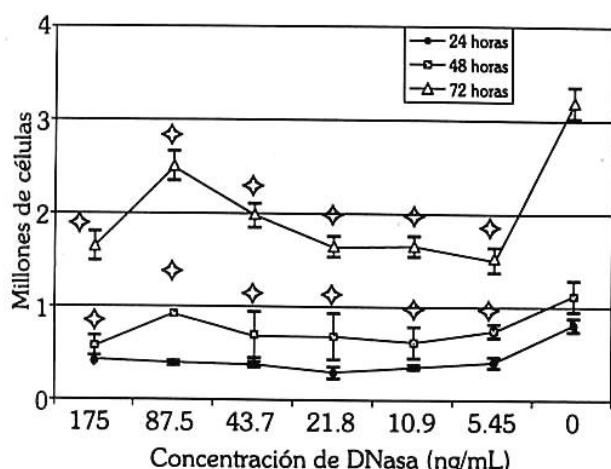


Figura 1. Número de células B16-F10 determinadas después de la incubación por 24, 48 ó 72 horas con una DNasa. La concentración más alta utilizada fue la de 175.0ng/mL; el control celular está representado con la concentración 0.0ng/mL ($\diamond p < 0.05$)

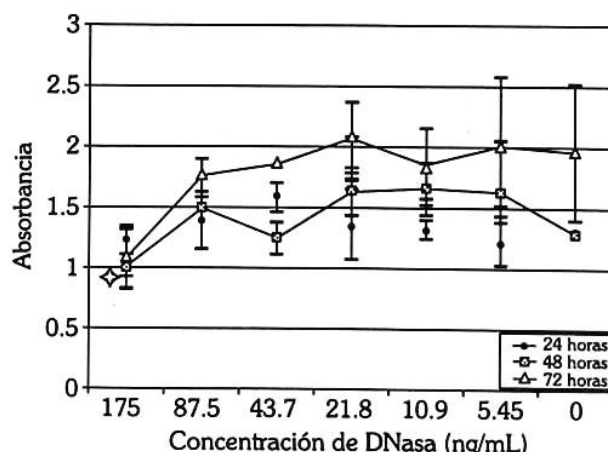


Figura 2. Viabilidad y funcionalidad celular en células B16-F10 incubadas con diferentes concentraciones de una DNasa utilizando al colorante MTT. El control celular está representado en el punto 0.0ng/mL, se muestra el promedio $\pm$ la DE ($\diamond p < 0.05$).

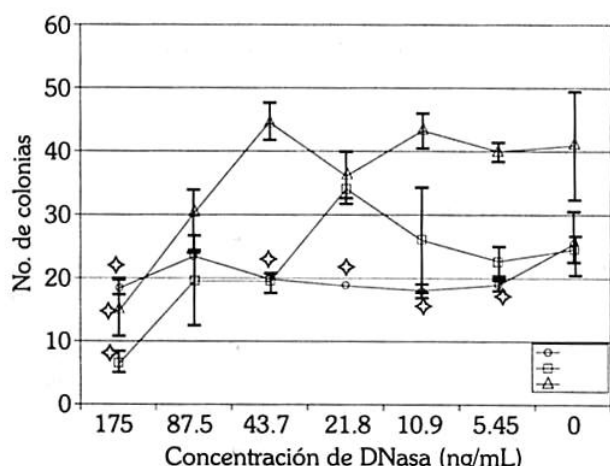


Figura 3. Número de colonias de células B16-F10 presentes después de la inoculación por 24, 48, ó 72 horas con distintas concentraciones de una DNasa utilizando la tinción con cristal violeta. Promedio $\pm$ DE ($\diamond$ $p < 0.05$).

de la concentración de la DNasa I, lo anterior con respecto a las células en donde estuvo ausente la nucleasa. Tal y como se observa en la Figura 3, las concentraciones que tienen el mayor efecto es nuevamente la de 175ng/mL y en algunos puntos la de 87.5ng/mL (72 horas). De estos resultados se puede inferir que la tasa de división celular de alguna manera se ve afectada por la presencia de la nucleasa.

Con el objetivo de determinar si la nucleasa administrada exógenamente a los cultivos era capaz de dañar el DNA celular, se realizó la purificación del DNA de células incubadas a distintas concentraciones y a diferentes tiempos con la nucleasa, y se realizó su corrimiento electroforético. El análisis de los geles obtenidos indicó que a las 2, 4 y 8 horas no se encontró ningún cambio diferente al mostrado por el DNA obtenido de las células cultivadas en ausencia de la DNasa I (resultados no mostrados), sin embargo a las 24 horas se observa una banda de un peso molecular aproximado de 400pb y una banda difusa de 200pb, aunque es importante mencionar que este no es el patrón de corrimiento del DNA en "escalera" característico de las células en apoptosis. La banda de 400 pb se observa a las 48 y a las 72 horas, aunque hay que mencionar que para estos tiempos también se observa en el DNA procedente de las células control (Figuras 4A, 4B y 4C).

DISCUSIÓN

La importancia de las desoxirribonucleasas (DNasa) en la degradación del DNA en la apoptosis celular o en las células en rápido crecimiento, hizo proponer hace ya 50 años a las nucleasas (desoxirribonucleasas y ribonucleasas) como tratamiento para el cáncer^{10,11}. Es relevante mencionar asimismo que, el hecho de que las DNasa, se encuentren inactivas en la célula cancerosa, hace relevan-

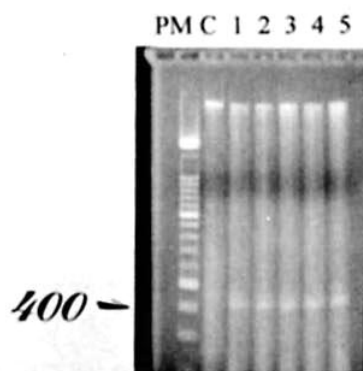


Figura 4A.

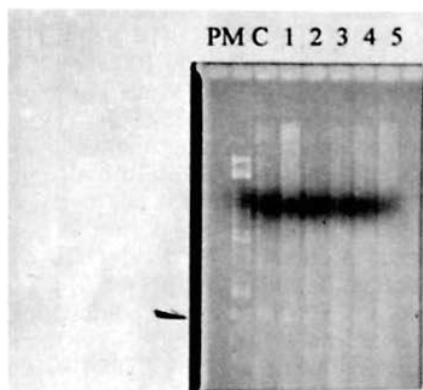


Figura 4B.

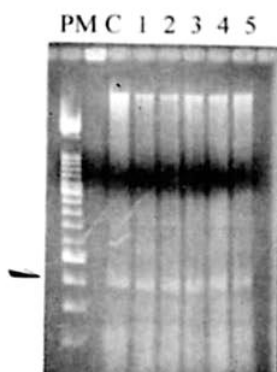


Figura 4C.

Figura 4. Corrimiento en gel de agarosa al 2% de 2 μ g de DNA obtenido de células incubadas por 24, 48 ó 72 horas con diferentes concentraciones de DNasa I. **A)** DNA obtenido de células B16-F10 incubadas por 24 horas con la nucleasa, **B)** por 48 horas y **C)** por 72 horas. PM= pesos moleculares, C= DNA obtenido de células cultivadas en ausencia de la DNasa I. El número de carril corresponde a las siguientes concentraciones, 1= 10.9, 2= 21.8, 3= 43.7, 4= 87.5, 5= 175.0ng/mL de DNasa I. La flecha indica la localización de la banda de un peso aproximado de 400 pb.

te estudiar la posibilidad de activar nuevamente a ésta, con el fin de regular o impedir la multiplicación tumoral.

En este trabajo, los resultados obtenidos indicaron una disminución en el número total de células de una manera dependiente de la concentración de la nucleasa, sin embargo, no se encontró que esta disminución estuviera relacionada con alteraciones a nivel de la membrana celular (determinada por tinción con el colorante azul de tripán). Lo anterior, nos hace proponer que probablemente sea la presencia de la nucleasa quien afecte la expresión de ciertos genes importantes para la proliferación de este tipo de células. Ha sido descrito con anterioridad que una de las características de la DNasa I es la de atacar zonas expuestas del DNA, tal y como sucede en los genes que se encuentran activos. Puck y colaboradores¹⁴ demostraron en un proceso que ellos denominaron "transformación reversa", que una de las características primordiales de la célula al perder sus características malignas y que puede por lo tanto sufrir nuevamente apoptosis, se debe a que su DNA se vuelve sensible al ataque de nucleasas como la DNasa I. Los corrimientos electroforéticos del DNA realizados a las 24 horas muestran una banda de 400pb y una banda muy difusa de aproximadamente 200pb (Figura 4). Aunque los resultados mencionados no constituyen el patrón de corrimiento electroforético en "escalera" característico de la apoptosis, es interesante considerar que es la exposición de ciertos segmentos del DNA celular a la nucleasa exógena, lo que da origen a estas bandas. Es relevante mencionar que, en este caso, se requirieron al menos de 24 horas para poder observar algún efecto, probablemente la similitud de tiempo necesario para llevar a cabo el ciclo celular de las células B16-F10 (el cual es muy parecido al de una célula normal, 16-18 horas), podría estar hablando de que es la exposición durante el proceso de la duplicación del DNA celular, quien facilitó su exposición a la desoxirribonucleasa.

Los resultados obtenidos al incubar a la DNasa I con las células B16-F10, difiere del observado en células HeLa o HEp-2 (de origen humano), en donde utilizando esta misma nucleasa se observó la alteración de su morfología, la disminución de su viabilidad y de su actividad celular. En contraste, en el mismo estudio mencionado, en células de origen no tumoral la presencia de la nucleasa no modificó de manera significativa ninguno de los parámetros mencionados¹². Por otra parte, la DNasa I empleada en este trabajo ha demostrado tener efecto sobre células procedentes de pacientes con leucemia, en donde con su utilización se han encontrado algunos buenos resultados¹³. Para asegurar que los efectos observados fueran derivados de la nucleasa, se realizó la incubación de las células B16-F10 con el vehículo utilizado, no encontrándose con éste ningún efecto significativo sobre los aspectos estudiados en este trabajo (resultados no mostrados).

Se consideró relevante valorar la capacidad de formación de colonias de las células B16-F10, por la alta capacidad de formar tumores (principalmente en pulmón) que este tipo de células posee; diversos autores han demos-

trado poder inhibir la formación de agrupaciones de células tumorales al incubarlas con una desoxirribonucleasa, lo anterior por la presencia de "parches de DNA" que al parecer facilitan la agrupación celular¹⁵, en estos casos, se considera que la importancia de usar a la nucleasa reside en que al impedir la agregación de las células tumorales se facilitaría el acceso de los agentes quimioterápicos al total de células. En nuestros resultados se observa al realizar la determinación del número de colonias formadas por las células B16-F10 que, el número de colonias se vio disminuido a las dos concentraciones más altas utilizadas de la nucleasa (175.0 y 87.5ng/mL), estos resultados se relacionan bastante bien con los encontrados en cuanto al número total de células (Figura 1). Hasta donde sabemos, no se ha demostrado la presencia de "parches" de DNA en esta línea celular, por lo cual sería interesante determinar si esto sucede o, si bien, como se mencionó es la acción de la DNasa I sobre ciertas áreas del DNA quien interfiere con la división de este tipo celular.

Por ser la mitocondria uno de los principales organelos afectados durante la apoptosis o la necrosis, consideramos importante la determinación indirecta de su actividad y de la viabilidad celular usando al colorante MTT, el cual sólo mostró cambios significativos a las concentraciones más altas utilizadas, esto principalmente a las 72 horas. El colorante MTT es reducido a una sal de formazán por el sistema de la succinato-tetrazolium reductasa el cual pertenece a la cadena respiratoria mitocondrial y es activo únicamente en células viables, aunque se considera que no es el único sistema que interviene en la reducción del MTT al parecer es uno de los principales, por lo anterior se utilizó como un indicador indirecto del daño a mitocondria. En los resultados obtenidos no se observaron cambios significativos (con excepción de los resultados obtenidos a las 72 horas con la concentración de 175.0ng/mL), esto armoniza con los demás resultados producidos, los cuales demostraron que la viabilidad celular no se ve afectada y al parecer tampoco la viabilidad y funcionalidad celular determinada por medio del colorante MTT. Así, consideramos que la incubación con la DNasa I no influye en la viabilidad de esta línea celular en particular, sino en la tasa de división celular por un mecanismo desconocido hasta ahora.

Uno de los principales problemas encontrados con la utilización de enzimas como la empleada en esta investigación, reside en el hecho de asegurar que lleguen al destino adecuado y permanezcan además activas, lo anterior ha estimulado la investigación al respecto. Actualmente se busca con técnicas de biología molecular el crear quimeras que contengan la porción Fc de una inmunoglobulina, la parte activa de la nucleasa y además una porción conocida como secuencia señalizadora nuclear, todo con el fin de favorecer la entrada al núcleo celular y hacer más selectivo el ataque contra la célula tumoral¹⁷. La baja actividad o selectividad de las nucleasas utilizadas, probablemente sea la explicación a la deficiente actividad antitumoral reportada por autores como Batelli

y colaboradores quienes no encontraron actividad antineoplásica usando a una DNasa¹⁶. Como ya se mencionó, la principal utilidad de la DNasa I en nuestros días es la de servir como indicador de la mejoría en el paciente con cáncer; en 1986 Taper y colaboradores¹⁷ mostraron que una disminución en la actividad de la DNasa I alcalina de suero indicaba la necrosis del tumor inducida terapéuticamente y que un aumento en la actividad de ésta por arriba de los niveles iniciales en fases avanzadas del tratamiento, correspondía a una total regresión del tumor, este resultado fue confirmado posteriormente por Economidou y colaboradores¹⁸.

Los resultados de los autores mencionados indican desde nuestro punto de vista que es importante estudiar la actividad y utilidad de las desoxirribonucleasas, ya que por sus características, probablemente una mayor actividad, indique una mayor degradación del DNA de las células con altas tasas de proliferación tal y como sucede con las células tumorales.

Actualmente, nos encontramos realizando experimentos utilizando a la DNasa I marcada con un cromógeno buscando determinar su camino y su principal sitio de acción en la célula tumoral, consideramos que esto es importante ya que hasta el momento no se conoce la existencia de receptores de membrana que sean capaces de facilitar la entrada de la endonucleasa a la célula, asimismo está en proceso el estudio *in vivo* con el cual intentamos demostrar que la nucleasa permanece activa y es capaz de actuar sobre la formación de tumores en un modelo murino.

Todo lo mencionado nos hace ver la importancia de buscar opciones que nos permitan (utilizando mecanismos fisiológicos normales) regular o impedir el crecimiento tumoral en las condiciones naturales del organismo, la búsqueda que al respecto hacen numerosos investigadores utilizando enzimas (como las nucleasas) fundamentales en la fisiología celular, nos hacen creer que este camino puede dar algunas respuestas para ayudar al individuo con cáncer^{19,20}.

REFERENCIAS

1. Peitsch CM, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald RH, Mannherz GH, et al. *Characterization of the endogenous Deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death)*. EMBO J 1993; 12:371-377.
2. Taper SH, Deckers OCh, Deckers-Passau OL. *Increase in nuclease activity as a possible means for detecting tumor cell sensitivity to anticancer agents*. Cancer 1981;47:523-529.
3. Polzar B, Zanotti S, Stephan H, Rauch F, Peitsch CM, Irmier M, et al. *Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death)*. Eur J Cell Biol 1994;64:200-210.
4. Linardou H, Deonarain PM, Spooner AR, Epenetos AA. *Deoxyribonuclease I (DNase I). A novel approach for targeted cancer therapy*. Cell Biophysics 1994;24/25:243-248.
5. Kerr JFR, Harmon BV. *Definition and incidence of apoptosis an historical perspective*. In: Tomei LD, Cape OF, editors. *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. Número 3, serie: Current communications in cell and molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1991:5-29.
6. Arends MJ, McGregor AH, Toft NJ, Brown EJH, Wyllie AH. *Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Ha-ras oncogenes and is associated with endonuclease availability*. Br J Cancer 1993;68: 1127-1133.
7. Puck TT, Krystosek A. *Role of the cytoskeleton in genome regulation and cancer*. Int Rev Cytol 1992;132:75-108.
8. Peutscg CM, Mannherz GH, Tschopp J. *The apoptosis endonucleases: Cleaning up after cell death?* TICB 1994; 4:37-41.
9. Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. *Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972;26:239.
10. Salganik IR, Martynova PR, Matienko AN, Ronichevskaya MG. *Effect of deoxyribonuclease on the course of lymphatic leukaemia in AKR mice*. Nature 1967;214:100-102.
11. 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: 4253-4256.
12. Alvarado VN, Alcázar LS, Benítez RMT, Zamudio CP, Rosas MP. *Disminución de la viabilidad y capacidad de proliferación en líneas celulares de origen tumoral por efecto de una desoxirribonucleasa*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1996;9:93-97.
13. Alcázar MH, Alcázar LS, Rivera LR, Benítez RMT. *Therapeutic perspectives of nucleases in cancer*. Inv Med Int 1995;22:9-13.
14. Puck TT, Krystosek A. *Reverse transformation, genome exposure, and cancer*. Adv Cancer Res 1993;62:125-151.
15. 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 deoxyribonucleic acid*. Acta Pathol Jpn 1991;41:327-335.
16. Batelli T, Bonsignori M, Manocchi P, Rossi G. *Use of deoxyribonuclease in the therapy of the neoplastic patient*. Minerva Med 1977;68:1447-1452.
17. Taper H, Lans M, Economidou-Karaoglou A, De Gerlache J, Roberfroid M. *Variations in serum alkaline DNase activity: a possible clinical test for therapeutic prognosis of human tumors*. Anticancer Res 1986; 6: 949-956.
18. Economidou-Karaoglou A, Lans M, Taper HS, Michaux JL, Roberfroid M. *Variations in serum alkaline DNase activity. A new means for therapeutic monitoring of malignant lymphomas*. Cancer 1988;61:1838-1843.
19. Deonarain MP, Epenetos AA. *Targeting enzymes for cancer therapy: Old enzymes in new roles*. Br J Cancer 1994;70: 786-794.
20. Sikora K. *Genes, dreams, and cancer*. BMJ 1994;308:1217-1221.