

ACCIÓN DE LA CORRIENTE ELÉCTRICA DIRECTA EN LA INTERACCIÓN LINFOCITOS T – CÉLULAS CANCEROSAS

Direct electric current action in T lymphocytes – cancerous
cells interaction

LUIS BERGUES CABRALES¹, HÉCTOR CAMUÉ CIRIA²,
RODOLFO PÉREZ BRUZÓN³, RICHARD HINOJOSA ALDANA³,
LIBAN MONTES DE OCA GONZÁLEZ³

Resumen

Se discute la evolución de la población de células cancerosas (pequeña o grande) en interacción con los linfocitos T, en presencia de la acción citotóxica de la corriente eléctrica directa, usando el modelo matemático presa - predador. Se describen las bifurcaciones que sufre este sistema dinámico en las situaciones obtenidas, comparándose con aquellas en que las células cancerosas no han sido tratadas con electroterapia. Además, se establece una comparación, a partir de las situaciones obtenidas, entre las poblaciones grande y pequeña de células cancerosas. Se concluye que la electroterapia por si sola o combinada con la acción citotóxica de los linfocitos T puede reducir a cero o a un número menor la población de células cancerosas.

Palabras claves: linfocitos T; puntos críticos; retrato de fase; punto umbral.

Abstract

The cytotoxic action of direct electric current in the evolution of a cancerous cell population (small or big) in interaction with T lymphocytes is discussed, based on the predator – prey mathematical model. A description of the bifurcations of this dynamic system of the groups treated with electrotherapy is presented and a comparison with the control groups is also given. Furthermore, a composition is established, from the situations obtained, between the small and big cancerous cell population. It is concluded that electrotherapy by itself or combined with the cytotoxic action of T lymphocytes can reduce to a lesser number or zero the cancerous cell population.

Key words: T lymphocytes; critical point; phase plane; threshold point.

1- Lic. Física y Profesor Asistente

2- Lic. Biología

3- Lic. Física

División de Caracterizaciones Magnéticas y Magnetoterapia.

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente.
Santiago de Cuba, Cuba. La correspondencia debe dirigirse a: Luis Bergues
Cabral Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA).
Universidad de Oriente. Gaveta Postal 4078, C.P. 90 400. Santiago de
Cuba, Cuba. Tel./fax: (53) (226) 43721. E-mail: bergues@cnea.uo.edu.cu

Introducción

El crecimiento de los tumores malignos es el resultado de múltiples cambios heterogéneos genéticos y epigenéticos. Aunque han sido identificadas diferencias cualitativas entre células normales y cancerosas no ha sido posible encontrar una forma de terapia específica para el cáncer, que actúe de forma selectiva sobre las células cancerosas. En la actualidad, las terapias convencionales utilizadas de forma simple o combinada no satisfacen las necesidades, por lo que se buscan nuevas modalidades de tratamiento. Ejemplo de ello es la electroterapia (ET) o tratamiento electroquímico (TEQ), la cual se caracteriza por su acción selectiva, local, inmediata y potencialmente citotóxica sobre las células cancerosas.

En los últimos años, para el pronóstico y tratamiento del cáncer así como de otras enfermedades, han cobrado especial interés las técnicas de dinámica no lineal. Estos modelos matemáticos se proponen a partir de datos experimentales y mediante el empleo de métodos inversos que permiten dar una explicación cualitativa y cuantitativa del fenómeno en estudio. Existen muchos modelos de interacción presa - depredador⁽¹⁻³⁾ donde, en el caso particular del cáncer esta interacción ha sido analizada desde varios puntos de vistas, tales como: el crecimiento de tumores con y sin tratamiento⁽⁴⁾, interacción tumor - hospedero⁽⁵⁾, evolución de tumores cancerosos⁽⁶⁻⁸⁾, perturbación de los sistemas biológicos por la acción de corrientes eléctricas⁽⁹⁾ etc.

El objetivo de este artículo es modelar con la técnica de dinámica no lineal la interacción de una población de células cancerosas (pequeña o grande) y linfocitos T bajo la acción de la corriente eléctrica directa (CED) basados en los resultados experimentales reportados por en^(10-15, 17-23) y nuestras experiencias⁽¹⁶⁾ en el tratamiento de volúmenes de tumores pequeños y grandes.

Modelo Matemático

Los modelos presa-depredador más simples contienen sólo dos estados variables: la densidad de presa y la densidad de depredador, los cuales pueden ser descritos

matemáticamente por dos ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas. En nuestro caso la presa es la población de células cancerosas y el depredador es la población de linfocitos T.

Hemos observado experimentalmente, en ratones, altos porcentajes de necrosis en tumores sólidos subcutáneos a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de aplicado un determinado esquema terapéutico con CED⁽¹⁶⁾. Este esquema consiste de una selección de: la dosis de CED (intensidad y tiempo de aplicación); tipo de terapia (anódica, catódica, de campo, o los ánodos y cátodos en el interior del tumor); configuración de electrodos (un par de electrodos o multielectrodos); secuencia de estímulos (uno o varios estímulos); frecuencia de repetición (una vez o repetitiva), forma de aplicación (sola o combinada con otras formas de terapia) y estrategia de aplicación (sobre todo el tumor o por secciones de éste)⁽¹⁶⁾.

Los cortos tiempos de manifestación y altos porcentajes de necrosis^(4, 10-23) indican que la velocidad de muerte de las células cancerosas, por la acción citotóxica de la CED, no es constante sino que es proporcional al número de éstas, en dependencia de la efectividad terapéutica. Hemos encontrado experimentalmente que el porcentaje de necrosis en el tiempo se ajusta a un modelo de Sigmoide⁽¹⁶⁾. Desde el momento de aplicada el esquema terapéutico hasta donde se alcanza el máximo porcentaje de necrosis, se observa un aumento del porcentaje de necrosis, indicando un incremento del número de células cancerosas muertas debido a las acciones citotóxicas combinadas de la CED y de los linfocitos T, ajustándose esta parte de la Sigmoide a un modelo lineal. Una vez alcanzado el máximo porcentaje de necrosis, éste se mantiene constante (si desaparece completamente el tumor) o disminuye (recrecimiento del tumor), por lo que esta parte de la Sigmoide no se incluye en el modelo ya que no da información de cómo se afecta la proliferación de las células cancerosas una vez aplicado el esquema terapéutico. Por estas razones, partimos del sistema de ecuaciones⁽⁵⁾ propuesto por González y colaboradores⁽⁷⁾, en el cual sustituimos el término velocidad constante de muerte de células cancerosas, - k , propuesto

por ellos, por el término lineal, $-kx$, resultando el sistema no lineal de ecuaciones diferenciales ordinarias:⁽¹⁾

$$\frac{dx}{dt} = ax - bxy - kx$$

$$\frac{dy}{dt} = d(x - ex^2)y - fy + V$$

donde x e y son las poblaciones de células cancerosas y linfocitos T, respectivamente, ax es la proliferación de células cancerosas, $-kx$ es la inhibición de la proliferación por la acción citotóxica de la CED, $-bxy$ es la destrucción de células cancerosas por la acción citotóxica de la población de linfocitos T, $d(x - ex^2)y$ es la estimulación (dx) o inhibición ($-dex^2y$) de la población de linfocitos T en presencia de poblaciones de células cancerosas pequeñas o grandes, respectivamente, $-fy$ es la velocidad de muerte natural de los linfocitos T y V es el flujo de éstos desde otras partes del organismo. Todas estas variables son adimensionales, lo que facilita la resolución del sistema⁽¹⁾.

Este sistema dinámico no lineal tiene tres puntos críticos:

$$I) x_1 = 0, \quad y_1 = \frac{V}{f}$$

$$II) x_2 = \frac{1}{2e} + \sqrt{\frac{1}{4e^2} - h}, \quad y_2 = \frac{a - k}{b}$$

$$III) x_3 = \frac{1}{2e} - \sqrt{\frac{1}{4e^2} - h}, \quad y_3 = \frac{a - k}{b}$$

donde

$$h = \frac{1}{ed} \left[\frac{f - bV}{a - k} \right] = \frac{1}{ed(a - k)} [f(a - k) - bV]$$

Para que los puntos críticos II y III , si existen, tengan sentido físico tienen que ser reales y estar en el primer cuadrante, esto se cumple para la condición: $\frac{1}{4e^2} > h$, además al punto crítico III debe exigírsele otra condición: $h > 0$. Las curvas del retrato de fase tienen que ser continuas y no cortarse en ningún punto.

Los valores propios de la matriz de Jacobi correspondientes a los puntos críticos son:

$$I) \lambda_1 = (a - k) - \frac{bV}{f} = \frac{edh(a - k)}{f}, \quad \lambda_2 = -f$$

$$II) \lambda_1 = \frac{B}{2} + \frac{\sqrt{B^2 - 4C}}{2}, \quad \lambda_2 = \frac{B}{2} - \frac{\sqrt{B^2 - 4C}}{2}$$

$$\text{donde } B = d(x_2 - ex_2^2) - f \text{ y } C = 4d(a - k)(x_2 - 2ex_2^2)$$

$$III) \lambda_1 = \frac{B_0}{2} + \frac{\sqrt{B_0^2 - 4C_0}}{2},$$

$$\lambda_2 = \frac{B_0}{2} - \frac{\sqrt{B_0^2 - 4C_0}}{2},$$

$$\text{donde } B_0 = d(x_3 - ex_3^2) - f \text{ y } C_0 = 4d(a - k)(x_3 - 2ex_3^2)$$

En el sistema ⁽¹⁾ el caso de población pequeña o grande de células cancerosas aparece cuando se cumple la condición $x_2 < 1/e$ o $x_2 > 1/e$, para $a > k$, respectivamente. Al punto $x_2 = 1/e$ lo denominamos “punto umbral del primer estadio” porque una vez alcanzado éste, comienza la rápida proliferación de las células cancerosas debido a la ruptura por parte de éstas del equilibrio mantenido con y por la población de linfocitos T. En dependencia del tamaño de la población de células cancerosas aparecen las siguientes situaciones:

a) En el caso de población pequeña

- $h \leq 0$ [$f(a - k) \leq bV$] CON $a > k$

El punto crítico III no tiene sentido físico, ya que $x_3 < 0$; el punto crítico I es un nodo estable; y el punto crítico II , en dependencia del caso es: un nodo inestable si $C > 0$ y $B > 0$ (Figura 1); un nodo estable si $C > 0$ y $B < 0$; y un centro si $C > 0$ y $B = 0$. Estas dos últimas situaciones, para el punto crítico II , carecen de sentido físico ya que existe una discontinuidad en las curvas del retrato de fase.

- $h > 0$ [$f(a - k) > bV$] CON $a > k$ Y $\frac{1}{4e^2} > h$

El punto crítico I es una silla de montura; el III es un nodo estable; y el II , en dependencia del caso es: un nodo inestable si $C > 0$ y $B > 0$ (Figura 2); un nodo estable si $C > 0$ y $B < 0$; y un centro si $C > 0$ y $B = 0$. Estas dos últimas situaciones, para el punto crítico II , carecen de sentido físico ya que existe una discontinuidad en las curvas del retrato de fase.

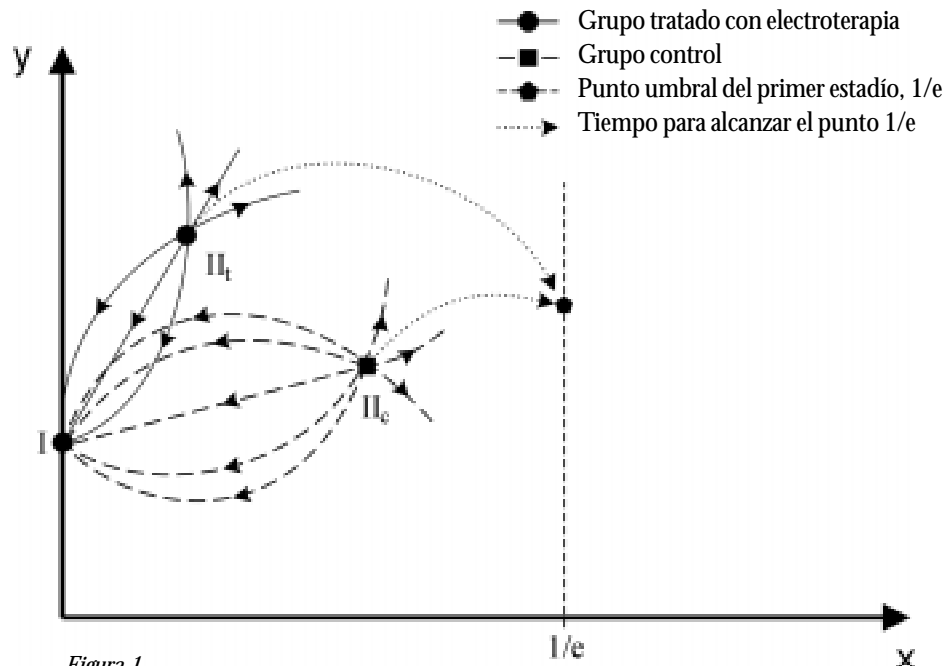


Figura 1
Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h \leq 0$ ($a > k$), para poblaciones pequeñas

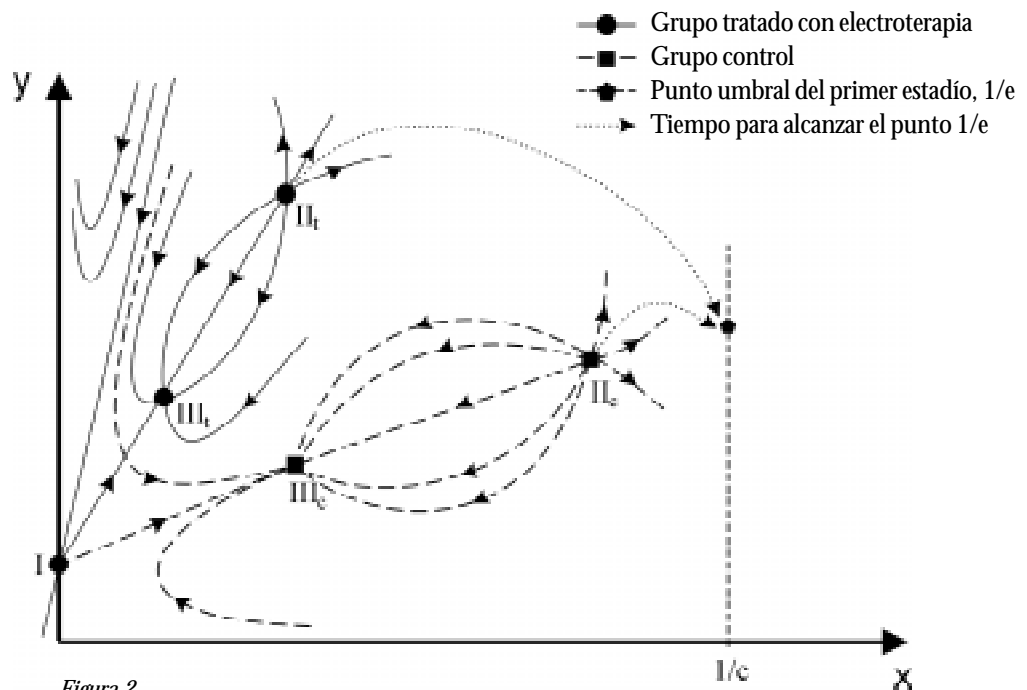


Figura 2
Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h > 0$ ($a > ky - \frac{1}{4e^2} > h$), para poblaciones pequeñas

• $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a < kY \frac{1}{4e^2} < h$
El punto crítico I es una silla de montura y los puntos críticos II y III no tienen sentido físico ya que $x_2 < 0$ y $x_3 < 0$, respectivamente (Figura 3).

• $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a < kY \frac{1}{4e^2} > h$
El punto crítico I es un nodo estable y los puntos críticos II y III son estable y silla de montura, respectivamente, para $C < 0$ y cualquier B. También, esta situación no tiene

sentido físico por la razón antes expuesta.

• $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a < k$ Y $\frac{1}{4e^2} < h$
 El punto crítico *I* es un nodo estable y los puntos críticos *II* y *III* no tienen sentido físico (Figura 4).

b) En el caso de población grande

• $h \leq 0$ [$f(a-k) \leq bV$] CON $a > k$
 El punto crítico *III* no tiene sentido físico, ya que $x_3 < 0$, el *I* es un nodo estable y el *II* es una silla de montura (Figura 5).

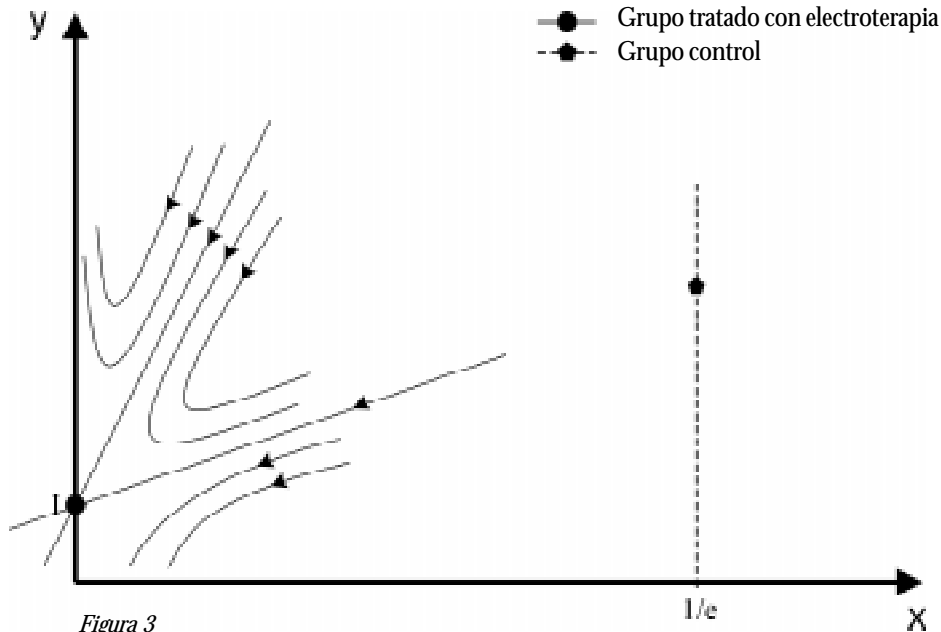


Figura 3
 Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h > 0$ ($a < ky \frac{1}{4e^2} < h$), para poblaciones pequeñas

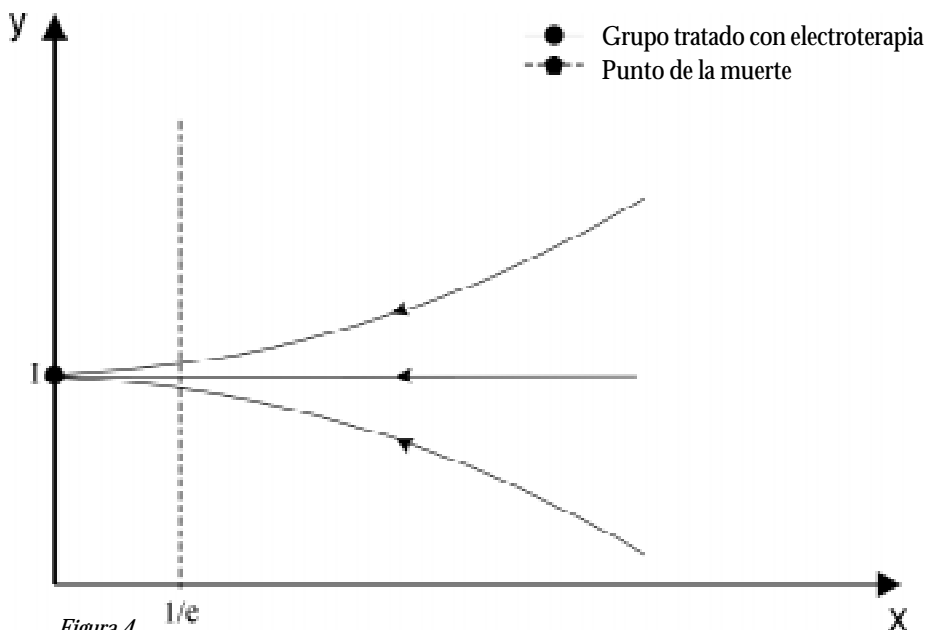


Figura 4
 Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h > 0$ ($a < ky \frac{1}{4e^2} < h$), para poblaciones pequeñas y grandes

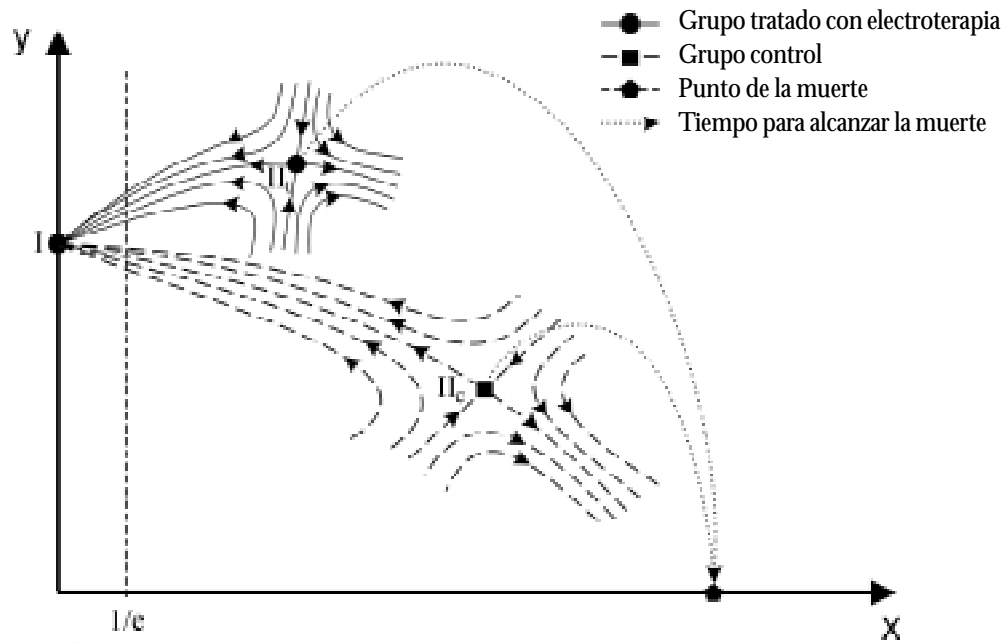


Figura 5
Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h \leq 0$ ($a > k$), para poblaciones grandes

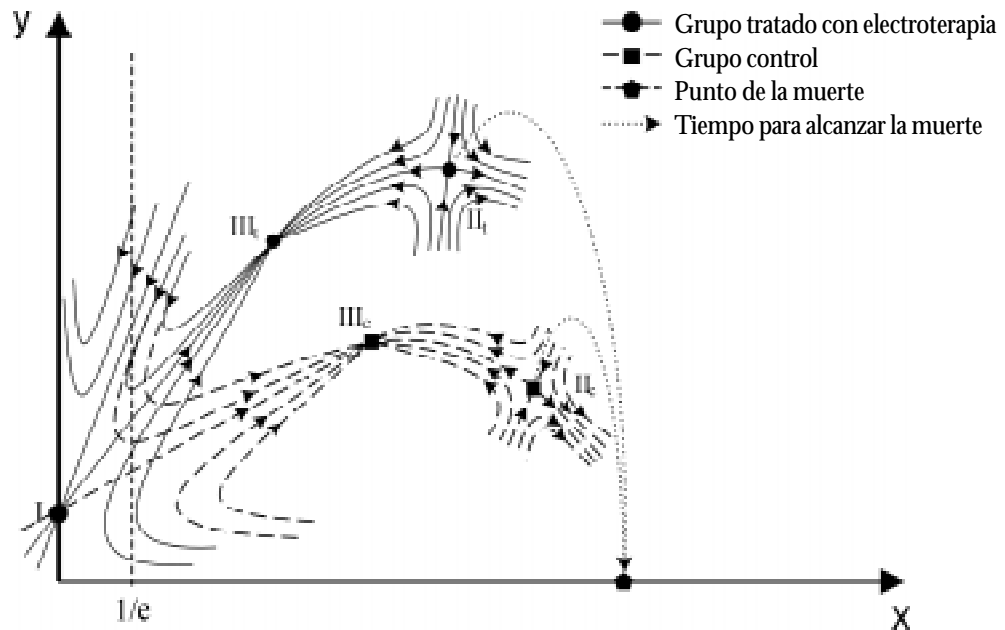


Figura 6
Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h > 0$ ($a > ky \frac{1}{4e^2} > h$), para poblaciones grandes

- $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a > kY \frac{1}{4e^2} > h$
Los puntos críticos I y II son sillas de montura y el III es un nodo estable (Figura 6).
- $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a < kY \frac{1}{4e^2} > h$
Los puntos críticos I y III son nodos estables y el II es una silla de montura. Esta situación carece de sentido físico por la razón antes expuesta.

- $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a > kY \frac{1}{4e^2} < h$
El punto crítico I es una silla de montura y los puntos críticos II y III no tienen sentido físico ya que $x_2 < 0$ y $x_3 < 0$, respectivamente (Figura 7).
- $h > 0$ [$f(a-k) > bV$] CON $a < kY \frac{1}{4e^2} < h$
El punto crítico I es un nodo estable y los puntos críticos II y III no tienen sentido físico (Figura 4).

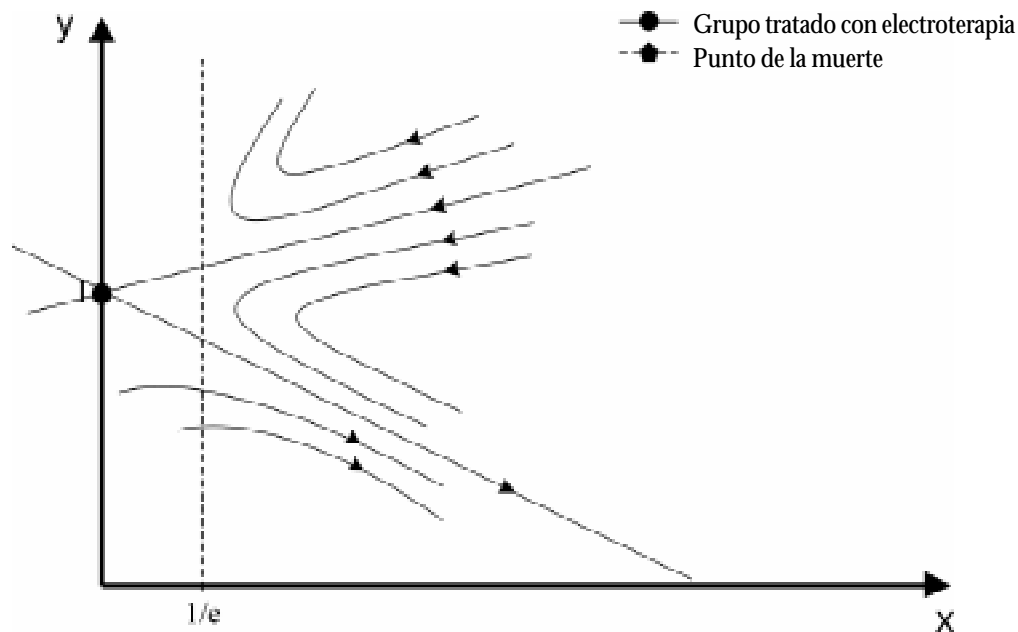


Figura 7
Plano de fase del sistema dinámico no lineal (1), cuando $h > 0$ ($a > ky - \frac{1}{4e^2} < h$), para poblaciones grandes

Resultados

Se ha obtenido experimentalmente que una vez aplicada la TEQ, en dependencia del tumor (localización, tamaño, tipo e histología, estadio y parámetros eléctricos) y del esquema terapéutico, existe una regresión significativa de los tumores, respecto a los no tratados^(4, 10-22). Esta regresión es representada por el término $-kx$ (ver ecuación 1), en el cual se incluye todos los posibles mecanismos que conducen a la muerte de las células cancerosa por la acción citotóxica de la CED. Entre estos se pueden mencionar: reacciones electroquímicas⁽¹¹⁻¹⁶⁾; estimulación del sistema inmune^(14, 16-21); rupturas de los vasos sanguíneos⁽¹⁰⁾, etc. Todos estos mecanismos que conducen a la muerte de las células cancerosas, se oponen a la velocidad de crecimiento de la población de estas células.

La regresión total o parcial del tumor observada en los diferentes experimentos explica la cura total o retardo del crecimiento del tumor, respectivamente. Este retardo observado explica a su vez, las altas razones de sobrevivencia. La regresión total del tumor, observada experimentalmente, se corresponde con el nodo estable *I* (Figuras 1 y 4), obtenido del sistema de ecuaciones 1. Este nodo estable indica que la población de células cancerosas es reducida a cero por la acción citotóxica de

la CED sola (Figura 4) o combinada con la acción citotóxica de los linfocitos T (Figura 1). El primer caso se corresponde cuando se ha eliminado todo el tumor usando un esquema terapéutico óptimo, teniendo en cuenta las características para cada tipo de tumor antes mencionadas,^(13, 14, 17-23); sin embargo, en el segundo, una vez aplicado el esquema terapéutico (no es el óptimo) se destruye la mayor parte del tumor. Las células cancerosas que sobreviven a la acción citotóxica de la CED, son eliminadas por el sistema inmune⁽¹¹⁻²³⁾. La regresión parcial del tumor, observada experimentalmente, se corresponde con el nodo estable *III* (Figura 2), obtenido del sistema de ecuaciones 1. Este nodo estable explica que se ha establecido un equilibrio entre las poblaciones de linfocitos T y células cancerosas, debido a la acción citotóxica de la CED. Este equilibrio, en dependencia del tamaño y estadio del tumor, es gobernado “establemente” (para el caso de población pequeña, Figura 2 o “meta-establemente” (para el caso de población grande, Figura 6 por el sistema inmune. El equilibrio que sostienen los linfocitos T con la población de células cancerosas es el responsable del retardo del crecimiento y aumento del tiempo de doblaje del tumor, resultando en un incremento de la sobrevivencia en animales y humanos⁽¹¹⁻²³⁾. Este estado de

equilibrio puede verse afectado si en el tumor actúan perturbaciones internas (propias del tumor) y/o externas (cualquier acción externa que estimule la proliferación de las células cancerosa y/o inmunodeprima al sistema inmune). Esta afectación es más evidente en las poblaciones grandes de células cancerosa que en las pequeñas, lo cual puede ser explicado porque en estadios más avanzados de la enfermedad se acentúa el influjo inmunosupresor del tumor debido a la segregación por parte de las células cancerosas de sustancia inmunosupresoras, que producen un desequilibrio entre la velocidad de desarrollo de la respuesta inmune y el crecimiento del tumor, así como al aumento de la circulación de los antígenos tumorales en la sangre. Todo este proceso afecta de manera sensible las funciones de las diferentes células, tanto específicas como accesorias, que forman parte de la respuesta inmune antitumoral. Los nodos estables *III* representados en las Figuras 2 y 6, en la práctica clínica, se corresponden con los estados de “microcáncer” y “macrocáncer”, respectivamente.

El estado de microcáncer, similar al de dormancia, corresponde a una población pequeña de células cancerosas que logró sobrevivir a la acción citotóxica de la CED. Este estado puede ser eliminado mediante el reforzamiento de la acción del sistema inmune y/o el incremento de la antigenicidad de las células cancerosas por modificaciones físico-química adecuadas, debido a la débil inmunogenicidad de éstas. Sin embargo, ocurre realmente en el caso de una población grande de células cancerosas sobreviviente a la acción citotóxica de la CED (estado de macrocáncer) donde se debe tener cuidado al aplicar cualquier tipo de terapia, por muy efectiva que ésta sea, ya que la misma puede provocar que el sistema evolucione hacia una situación desfavorable: estimulación de la proliferación de las células cancerosas (situación a la derecha del nodo inestable *II*, Figuras 1 y 2) o la muerte (situación a la derecha de la silla de montura *II*, Figuras 5 y 6). Esto también puede ocurrir debido a la liberación por parte del tumor, de sustancias capaces de alterar las funciones de las diferentes células que constituyen la respuesta inmune antitumoral. Este efecto denominado

inmunosupresor puede provocar la inhibición en la proliferación o migración de los linfocitos T y B, aumento de la actividad de los linfocitos T supresores, etc. Todos estos cambios inciden de forma indirecta sobre la acción citotóxica de los linfocitos T, ya que los mismos requieren de factores solubles necesarios para la intensificación de su actividad, los cuales son sintetizados por las células que han sido afectadas.

Si el esquema terapéutico no es el adecuado, por no tener en cuenta los parámetros del esquema terapéutico y del tumor antes mencionados, existe un recrecimiento rápido del tumor, correspondiendo esta situación al nodo inestable *II* (Figuras 1, 2, 5 y 6), obtenidos del sistema de ecuaciones 1. Además, si a esta situación se le superpone una elevada actividad tumorogénica de las células cancerosas y/o una inmunodepresión del sistema inmunológico, más inefectivo es el esquema terapéutico utilizado, conduciendo un desarrollo ilimitado de las células cancerosas y alcanzando el “punto umbral del primer estadio” (para el caso de población pequeña, Figura 4) o el “punto entre la vida y la muerte” (para el caso de población grande, Figura 4). Una vez alcanzado los puntos umbrales del primer estadio o entre la vida y la muerte, existe una rápida proliferación de las células cancerosas (las células cancerosas se han instalado en el hospedero y han roto el equilibrio establecido con el sistema inmune, Figura 4) o las células cancerosas conllevan a una inmunodepresión de los linfocitos T (conlleva a la inevitable muerte del animal o humano, Figura 4), respectivamente. El punto crítico *II* para el caso de poblaciones pequeña o grande es un nodo inestable (Figuras 1 y 2) o una silla de montura (Figuras 5 y 6). Esta diferencia la establecemos, a pesar de ser puntos inestables, para diferenciar como ocurre el paso de la primera etapa (establecimiento del tumor en el hospedero e interacción del tumor con el sistema inmune) a la segunda (ruptura del equilibrio sistema inmune – células cancerosas, por parte de estas últimas) y de la segunda a la etapa terminal (inmunodepresión del sistema inmune y producción ilimitada de células cancerosas, conllevando a la muerte del individuo). Estas tres etapas, definidas por los dos umbrales

antes mencionados, las hemos observados de nuestras experiencias. El paso de la primera etapa a la segunda es continuo, indicando que el establecimiento del tumor y la ruptura de su equilibrio con el sistema inmune ocurre en un solo proceso; sin embargo, en el paso de la segunda etapa a la terminal, ocurre una transición de fase de las células del hospedero, indicando que el sistema biológico pasa del estado activo (vida) al inactivo (muerte), donde las propiedades fisiológicas y eléctricas de las células son completamente diferentes a las de las normales.

En experimentos recientes hemos observado que la TEQ no sólo tiene efecto antitumoral sino que también incrementa la respuesta del sistema inmune. Resultados similares han sido reportados en^(14, 17-20). Este incremento de la respuesta inmune está dada por la activación de los macrófagos, monocitos, linfocitos T y de los polimorfonucleares neutrófilos, además, de la alta concentración peritumoral de éstos observada en los estudios histopatológicos. El incremento y actividad de los linfocitos T viene descrito en el sistema dinámico 1, por el parámetro V , el cual juega un papel fundamental en la estabilidad de este sistema dinámico. En dependencia de la efectividad del TEQ y de la fortaleza del sistema inmune, la población de células cancerosas puede ser reducida a cero (nodo *I*, Figuras 1, 4 y 5), establecer un equilibrio con el sistema inmune (nodo *III*, Figura 2 y 6), o proliferar indefinidamente (situación a la derecha del nodo *II*, Figuras 1, 2, 5 y 6; nodo *I*, Figura 4). En las Figuras 1, 2, 5 y 6, las curvas del retrato de fase, correspondientes al grupo experimental (animales o humanos) tratado con ET se encuentran más arriba que las del grupo experimental control (no se le suministró ET), indicando la estimulación del sistema inmune del grupo experimental tratado con ET respecto al control. Además, los puntos críticos *III* y *II*, pertenecientes a las curvas del retrato de fase del grupo experimental tratado con ET, se encuentran más a la izquierda que los del grupo experimental control, explicando esto que la acción citotóxica de la CED, sola o combinada con la acción citotóxica de los linfocitos T, ha reducido un número significativo de células cancerosas.

Discusión y Conclusiones

Si bien los linfocitos T tienen acción citotóxica sobre la población (pequeña o grande) de células cancerosas, no sólo éstas participan en este complejo mecanismo sino que existen otros elementos celulares de la respuesta inmune que tienen actividad antitumoral, como: las células asesinas naturales (natural killer, NK), killers, macrófagos, etc., los cuales están interrelacionados a través de señales bioquímicas, tales como interleukina-1, interferón-g, interleukina-2, etc. Esto hace pensar que la interacción células cancerosas - sistema inmune responde al modelo de una presa (tumor) con varios depredadores (elementos celulares de la respuesta inmune antitumoral), el cual será discutido en trabajos posteriores.

Las diferentes situaciones obtenidas del sistema dinámico no lineal 1 aparecen en la Oncología Clínica. Cuantificando las poblaciones de linfocitos T y células cancerosas en grupos experimentales controles, tanto en animales como en humanos, se puede obtener información de los parámetros del sistema dinámico 1, mediante el empleo de técnicas inversas, siéndole de mucha importancia para el investigador en su diagnóstico o tratamiento de la enfermedad neoplásica, ya que le permite identificar el estadio, tamaño, características cinéticas y fisiológicas del tumor, además, de dar la posibilidad de seleccionar el agente terapéutico (sólo o combinado) adecuado para el mismo y en que momento debe aplicarse.

Referências Bibliográficas

1. GUCKENHEIMER, J.; HOLMES, P.J. Non lineal oscillations, dynamical systems and bifurcations of vector fields. Berlin: Springer-Verlag, 1983.
2. SABIN, G.C.W.; SUMMERS, D. Chaos in a periodically forced predator-prey system. *Math Biosci* 1993; 113: 91-113.
3. STURIS, J.; KNUDSEN, C. Modelling seasonal predator-prey interactions. *J Theor Biol* 1996; 178: 99-103.
4. MIKLAVCIC, D.; JARM, T.; KARBA, R.; SERŠA, G. Mathematical modelling of tumor growth in mice following electrotherapy and bleomycin treatment. *Mathematics*. and

- Computers in Simulation 1995; 39: 597-602.
5. GATENBY, R. A. Models of tumor-host interactions as competing populations: implications for tumor biology and treatment, *J Theor Biol* 1995; 176: 447-455.
 6. VAIDYA, V.G.; ALEXANDRO, F.J. Evaluation of some mathematical models for tumor growth, *Internat. J Biomedical Comput* 1982; 13: 19-35.
 7. GONZÁLEZ, J. A.; MEDINA, L.Q.; HERNÁNDEZ, E.O. Investigación de modelos no lineales de evolución de tumores cancerosos. *Rev. Mex Fis* 1994; 40: 616-626.
 8. CASTELLANO, A. - Un modelo estocástico para la evolución de tumores cancerosos. *Rev Mex Fis* 1996; 42: 236 - 249.
 9. VODOVNIK, L.; MIKLAVCIC, D. A theoretical approach to perturbation of biological systems by electrical currents. *Electro - Magnetobiol* 1995; 14: 51-62.
 10. DODD, N.J.; MOORE, J.V.; TAYLOR, T.V.; ZHOO, S. - Preliminary evaluation of low level direct current therapy using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Physics Medical* 1993; 4: 2-8.
 11. DAVID, S.L.; ABSOLOM, A.R.; SMITH, C.R. et al. - Effect of low level direct current on in vivo tumor growth in hamsters. *Cancer Res* 1985; 45: 5626-5631.
 12. KAI-HUA, L.; YU-LING, X.; YING-NONG, G.; BAO-LAN, X.; DEN-JUN, FAN; BANG-FA, N. Effects of direct current on dog liver. *Bioelectromagnetics* 1997; 18:2-7.
 13. YU-LING, X.; FU-ZHOU, X.; BING-SHENG, G.; FENG-RUI, Z.; BIN, S.; WEI, Z. Electrochemical treatment of lung cancer. *Bioelectromagnetics* 1997; 18: 8-13.
 14. CHUNG-KWANG, C.; JOHN, A. MCD.; CHUL, A.; NAYANA, V. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics* 1997; 18: 14-24.
 15. NORDESTROM, B. Biologically closed electric circuits. Stockholm, Sweden: Nordic Medical Publications 1983.
 16. BERGUES, L.; HINOJOSA, R.; PÉREZ, R.; CAMUÉ, H.; MONTES DE OCA, L.; SÚAREZ, C.; ROPER, R.; FONG, A. Efectos de la corriente eléctrica directa en el tumor murino subcutáneo de Ehrlich. I: estudios de necrosis y volumen del tumor en estadios avanzados. *Rev Bras Cancerol* 1998; 44: 203-210.
 17. SERSA, G.; MIKLAVCIC, D. Combined treatment of murine SA-1 tumors by human leucocyte interferon alpha and electrotherapy. *Radiol Oncol* 1993; 27: 280-285.
 18. SERŠA, G.; GOLOUH, R.; MIKLAVCIC, D. Anti-tumor effect of tumor necrosis factor combined with electrotherapy on mouse sarcoma. *Anti-Cancer Drugs* 1994; 5: 69-74.
 19. SERSA, G.; KOTNIK, V.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; KOTNIK, A. Electrochemotherapy with bleomycin in SA-1 tumor-bearing mice-natural resistance and immune responsiveness. *Anti-cancer Drugs* 1996; 7: 785-791.
 20. SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; BATISTA, U.; NOVAKOVIC, S.; BOBANOVIC, F.; VODOVNIK, L. Anti-tumor effect of electrotherapy alone or in combination with interleukin-2 in mice with sarcoma and melanoma tumors. *Anti-Cancer Drugs* 1992; 3: 253-260.
 21. SUKHENDU, B. D. Killing cancer cells with a combination of pulsed electric field and chemotherapy agents. *Cancer Watch* 1994; 3: 1-16.
 22. SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; MIR, L.M. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. *Bioelectroch and Bioenerg* 1994; 35: 23-27.
 23. MATSUSHIMA, Y.; TAKAHASHI, I.; HAGIWARA, K.; KONAKA, C.; MIURA, H.; KATO, H.; KOSHICSHI, Y. Clinical and experimental studies of antitumoral effects or electrochemical therapy (ECT) alone or in combination with chemotherapy. *Eur J Surg Suppl* 1994; 574: 59-67. Supplement.