

Efectos de la corriente eléctrica directa en el tumor murino subcutáneo de Ehrlich. I: Estudios de necrosis y volumen del tumor en estadios avanzados.

Direct electric current effects on the Ehrlich subcutaneous murine tumor. I: Necrosis and volume of tumor studies in advanced stages

Luis Bergues Cabrales¹, Richard Hinojosa Aldana¹, Rodolfo Pérez Bruzón¹, Héctor Camué Ciria¹, Liban Montes de Oca González¹, Catalina Suárez Quevedo², Alcibiades Lara Lafargue¹, Ramón Ropero Toirac², Alfredo Fong Reyes¹

203

Resumen

La electroterapia con corriente eléctrica directa se aplicó a un modelo de tumor murino subcutáneo (tumor de Ehrlich). La corriente fue suministrada a través de electrodos de Pt, donde el cátodo fue introducido directamente en los tumores y el ánodo subcutáneamente en la vecindad de éstos. Después de la electroterapia de un solo estímulo se observó que la disminución del volumen y el porcentaje de necrosis de los tumores fueron significativos y dependientes de la intensidad de corriente directa (1,8 y 4 mA). En la electroterapia repetitiva con 1,8 y 4 mA en diferentes días y zonas del tumor, también se observó disminución del volumen del tumor. Los grupos controles en ambos casos fueron sometidos a las mismas condiciones, pero no se les suministró corriente eléctrica. Estos resultados indican que la electroterapia en estadios avanzados también puede ser una terapia antitumoral efectiva y que sus efectos son mejores a mayores intensidades de corriente. Se concluyó que la electroterapia para estos estadios debe aplicarse mediante el empleo de un arreglo de electrodos dispuesto simétricamente en todo el tumor o en secciones de éste por separado, con el objetivo de disminuir los altos voltajes que se aplican entre los electrodos.

Palabras claves: electroterapia catódica; tumor ascítico de Ehrlich; porcentaje de necrosis; volumen del tumor.

1 - División de Equipos y Magnetoterapia. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente, Gaveta Postal 4078, Santiago de Cuba 90 400. Cuba. 2 - Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Oncológico "Conrado Benítez". Ave. de los Libertadores S/N. Santiago de Cuba 90 100. Cuba. La correspondencia debe dirigirse a Luis Bergues Cabrales: Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Universidad de Oriente C.P. 90 400, Gaveta Postal 4078. Santiago de Cuba, Cuba. Teléfono: (53) 4 3721. Fax: (53 226) 4 3721. E-mail: bergues@cnea.uo.edu.cu

L. Bergues C.: Lic. Física y Profesor Asistente; R. Hinojosa A.: Lic. Física; R. Pérez B.: Lic. Física; H. Camué C.: Lic. Biología; L. Montes de Oca G.: Lic. Física; C. Suárez Q.: Dra. Medicina, Especialista de I Grado en Anatomía Patológica y Profesora Asistente; A. Lara L.: Ingeniero Control Automático y Profesor Asistente; R. Ropero T.: Lic. Química y A. Fong R.: Dr. en Ciencias Técnicas y Profesor Auxiliar.

Abstract

Electrotherapy with direct electric current was performed on a subcutaneous murine tumor model (Ehrlich tumor). The current was supplied through Pt electrodes, where the cathode was inserted directly into the tumors and the anode subcutaneously in their vicinity. After the single shock electrotherapy the tumors volume diminish and the necrosis percentage were observed to be significant and dependent on direct electric current (1.8 and 4 mA). On the repetitive electrotherapy with 1.8 and 4 mA in different days and sites of tumor, tumor volume decrease was also observed. The control groups in both were subjected to the same conditions without electric current. These results show that electrotherapy in advanced stages also can be an effective antitumoral therapy and that its effects are better for the highest current intensity. It was concluded that electrotherapy for these stages must be applied by means of an electrodes array placed symmetrically all over the tumor, or in sections of the tumor separately, with the aim of reducing the high voltage applied between the electrodes.

Key words: *cathodic electrotherapy; Ehrlich ascitic tumor; necrosis percentage; tumor*

Introducción

En la actualidad, la modalidad terapéutica de la corriente eléctrica (electroterapia) está siendo muy estudiada y aplicada, puesto que constituye un medio efectivo en el tratamiento de algunas enfermedades por su poder estimulador e inhibidor de la proliferación celular. Este poder inhibidor hace que ésta pueda ser utilizada en el tratamiento local de tumores malignos. Además, este tipo de terapia se caracteriza por su bajo costo, mínima invasividad, efectividad antitumoral extensible e inmediata⁽¹⁻¹⁵⁾, así como por su influencia positiva en el control de la diseminación metastásica del tumor⁽¹⁶⁾. En estos estudios se han realizado mediciones de parámetros cinéticos (tiempos de doblaje del volumen y de retardo del crecimiento del tumor) y análisis de necrosis (a través de cortes histológicos, técnicas de Espectroscopía de ³¹P e Imágenes de RMN)⁽¹⁻¹⁷⁾. Los estudios clínicos han confirmado la eficacia de la electroterapia en el tratamiento de tumores en humanos^(13,16). Para explicar el marcado efecto antitumoral de la corriente eléctrica directa, han sido propuestos varios mecanismos de acción, entre los cuales se encuentran: cambios en el potencial transmembrana^(6,8,9); cambios electroquímicos causados por el flujo de corriente establecido entre los electrodos^(1-3,10,13,15), ionización del tejido, entre otros. Sin embargo, estos mecanismos aún son pocos entendidos.

En la inmensa mayoría de los trabajos experimentales se ha demostrado la potencialidad antitumoral de la corriente eléctrica directa en los primeros estadios de la enfermedad, cuando aún los tumores son de pequeño volumen⁽¹⁻⁸⁾. En el presente

trabajo se evalúa la efectividad de la corriente eléctrica directa de bajo nivel sobre un tumor experimental murino (tumor de Ehrlich) en estadios avanzados que se corresponden con volúmenes que oscilan entre 100 y 4000 mm³.

Materiales y métodos

Animales

En el experimento se utilizaron ratones machos Balb/C, con edades entre 7 y 8 semanas y pesos entre 18 y 22 g, suministrados por el Laboratorio de Animales y Biomodelos Experimentales (LABEX) de Santiago de Cuba, Cuba, los cuales se encontraban en buen estado de salud y se mantuvieron dentro de un local, en cajas plásticas, a una temperatura constante de 23°C y humedad relativa de 65%.

Tumor

La suspensión de células del tumor ascítico de Ehrlich, singénicas al ratón Balb/C, fue preparada a partir de la forma ascítica del tumor. Los tumores sólidos subcutáneos se iniciaron en la región dorsolateral por inoculación de 5×10^6 células, con un 95% de viabilidad. El conteo de células se realizó utilizando un hematocitómetro.

El volumen del tumor se calculó aplicando la fórmula del volumen de un elipsoide ($V = \pi abc/6$), para lo cual se realizaron mediciones diarias a los tres diámetros (mutuamente ortogonales) a, b, c del tumor, con un pie de rey de 0,05 mm de precisión.

Electroterapia

Para la aplicación de la electroterapia, en el Centro Nacional de Electromagnetismo

Aplicado (CNEA) se diseñó y construyó una fuente de corriente directa de alta estabilidad y bajo ruido. Se utilizaron electrodos de Pt de 0,7 mm de diámetro y 20 mm de longitud, los cuales se insertaron subcutáneamente. La electroterapia aplicada fue la catódica, donde el cátodo fue insertado en el tumor y el ánodo a una distancia de 8-10 mm de su borde. Al grupo control se le colocaron igualmente los electrodos, pero no se le suministró corriente.

Las dosis utilizadas en el tratamiento fueron de 1,8 mA y 4 mA durante 60 y 30 min, respectivamente; controladas mediante el monitoreo continuo de la corriente eléctrica y el voltaje. Se siguieron dos esquemas de electroterapia: uno de un solo estímulo (en el día cero y en el centro del tumor), con 1,8 y 4 mA, siendo el volumen inicial del tumor de aproximadamente 140,5 mm³; y otro de un solo estímulo repetitivo (en diferentes días y zonas del tumor). En este último esquema se realizaron tres experimentos: en el primero se aplicó una dosis de 1,8 mA durante 60 min, en los días cero y sexto, a un tumor cuyo volumen inicial fue de aproximadamente 541 mm³; en el segundo se aplicó esta misma dosis en los días cero, segundo y quinto, en un tumor cuyo volumen inicial fue aproximadamente de 3.467 mm³ y en el tercero se suministró una dosis de 4 mA durante 30 min, en los días cero y segundo, a un volumen tumoral de aproximadamente 2516,5 mm³.

Para el estudio de necrosis se conformaron tres grupos: uno control (n = 16) y dos tratados, el primero con 1,8 mA durante 60 min (n = 19) y el segundo con 4 mA durante 30 min (n = 20). Se sacrificaron de 3 a 5 animales por grupo a las 24, 48, 72 y 96 horas, después de la electroterapia de un solo estímulo. El volumen inicial de estos grupos fue de aproximadamente 140 mm³.

Análisis anatómico-patológico del tumor

Los cortes histológicos de cada tumor se efectuaron según el diámetro mayor, se fijaron en formol al 10% y se procesaron por el método de la parafina. La coloración empleada fue la de Hematoxilina y Eosina. Cada corte se dividió en cuatro campos microscópicos para calcular el porcentaje de necrosis a través de lentes panorámicas; porcentaje este que se determinó por medio de la relación existente entre el área necrosada y el área total del tumor, multiplicada por 100%.

Análisis estadístico

El criterio estadístico no paramétrico utilizado fue el de la suma de rango de Wilcoxon-Mann-Whitney de una cola, para $\alpha = 0,05$, con el fin de comparar los volúmenes y el porcentaje de necrosis entre los grupos control y tratados.

Resultados

Electroterapia de un solo estímulo

En la Figura 1 se comparan las curvas de crecimiento del tumor de dos grupos tratados con intensidades de corriente y tiempos de exposición diferentes: 1,8 mA durante 60 min (n = 10) y 4 mA durante 30 min (n = 8); así como de un grupo control (n = 10) después de un solo estímulo de corriente en el día cero. Los volúmenes iniciales de los grupos sometidos a 1,8 mA durante 60 min y 4 mA durante 30 min fueron, respectivamente, de $141,5 \pm 0,78$ y $139 \pm 1,80$ mm³; mientras que el del control resultó ser de $142 \pm 0,86$ mm³. Después de la electroterapia se observó que los volúmenes de los tumores disminuyeron significativamente en los grupos tratados con respecto al grupo control, efecto que fue más acentuado con 4 mA (Tabla 1).

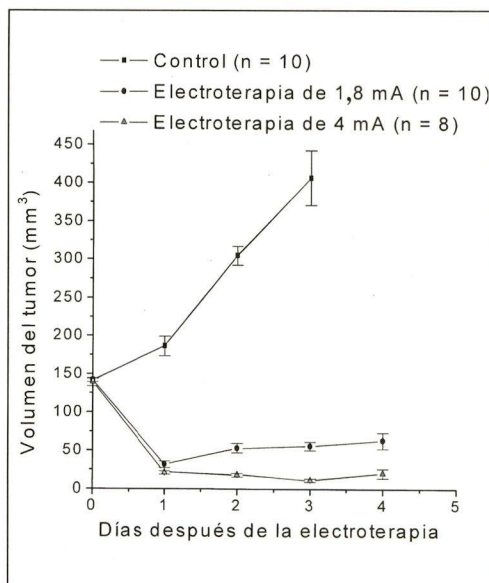


Figura 1 - Efecto antitumoral de la electroterapia catódica de un sólo estímulo (1,8 mA durante 60 min y 4 mA durante 30 min) aplicada el día cero, en tumores de Ehrlich subcutáneo. Se grafican los valores medios de los volúmenes con barras verticales que indican la desviación estándar de la media.

Tabla 1 - Evaluación estadística de las curvas de crecimiento del tumor después de la electroterapia con 1,8 mA durante 60 min y 4 mA durante 30 min, en el modelo de tumor de Ehrlich.

Probabilidad p	Cero día	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día
$p[V_{1,8\text{ mA}} < V_c]$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$p[V_{4\text{ mA}} < V_c]$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$p[V_{4\text{ mA}} < V_{1,8\text{ mA}}]$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

$V_c, V_{1,8\text{ mA}}, V_{4\text{ mA}}$: volúmenes de los tumores para los grupos control y tratados con 1,8 y 4 mA, respectivamente.

En los grupos tratados, los estudios de necrosis revelaron que los porcentajes de necrosis fueron significativamente mayores que en los del grupo control, particularmente en el grupo que se aplicó electroterapia de 4 mA (Tabla 2). Estos altos porcentajes de necrosis justifican la disminución del volumen del tumor, lo cual demuestra que la naturaleza de la electroterapia es citotóxica. En los grupos tratados se observó alrededor del cátodo una gran área necrótica y una mayor vascularización; mientras que en el grupo control, el área de necrosis fue observada aleatoriamente sobre el área total del tumor.

Electroterapia de un solo estímulo repetitivo

En la Figura 2 se comparan las curvas del crecimiento del tumor en los grupos control ($n = 10$) y tratado ($n = 10$) con corriente directa de 1,8 mA durante 60 min. Los volúmenes iniciales en estos grupos fueron de $541 \pm 11,27$ y $541 \pm 13,13$ mm³, respectivamente. La electroterapia se aplicó en los días cero y sexto, observándose en ambos casos, a las 24 horas postratamiento, una disminución significativa del volumen del tumor (Tabla 3).

Tabla 2 - Porcentajes de necrosis (P) del tumor de los grupos control y tratados con electroterapia de 1,8 y 4 mA, a las 24, 48, 72 y 96 horas postratamiento en el modelo de tumor de Ehrlich.

Tiempo postratamiento horas	Control	1,8mA $p_1 = p[P_{1,8\text{ mA}} < P_c]$	4,0mA $p_2 = p[P_{4\text{ mA}} < P_c]$ $p_3 = p[P_{4\text{ mA}} < P_{1,8\text{ mA}}]$
24	$24 \pm 5,48$ (5)	$77 \pm 4,47$ (5) $p_1 = 0,004$	$86 \pm 5,48$ (5) $p_2 = 0,004$ $p_3 = 0,028$
48	$27,5 \pm 5$ (4)	$62 \pm 8,37$ (5) $p_1 = 0,008$	$88 \pm 4,47$ (5) $p_2 = 0,008$ $p_3 = 0,028$
72	$30 \pm 8,16$ (4)	$60 \pm 18,7$ (5) $p_1 = 0,016$	$92 \pm 4,47$ (5) $p_2 = 0,008$ $p_3 = 0,000$
96	$23,3 \pm 5,8$ (3)	$55 \pm 12,9$ (4) $p_1 = 0,028$	$86 \pm 5,48$ (5) $p_2 = 0,018$ $p_3 = 0,008$

Entre paréntesis se especifica el número de muestras utilizadas; p significa la probabilidad calculada por el criterio estadístico no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Tabla 3 - Evaluación estadística de las curvas de crecimiento del tumor, en el modelo de tumor de Ehrlich, después de la electroterapia de 1,8 mA durante 60 min en los días cero y sexto.

Probabilidad p	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día	Quinto día	Sexto día	Séptimo día
$p [V_{1,8 \text{ mA}} < V_c]$	0,010	0,000	0,000	0,080	0,001	0,010	0,000

$V_c, V_{1,8 \text{ mA}}$: volúmenes de los tumores para los grupos control y tratado con 1,8 mA.

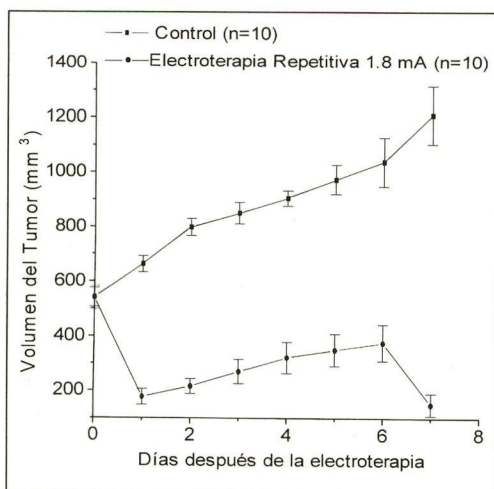


Figura 2 - Curvas de crecimiento del tumor para los grupos control y tratado con corriente eléctrica catódica repetitiva de 1,8 mA durante 60 min, aplicada los días cero y sexto en un tumor de Ehrlich subcutáneo. En las curvas de crecimiento se presentan las barras verticales que indican la desviación estándar de la media.

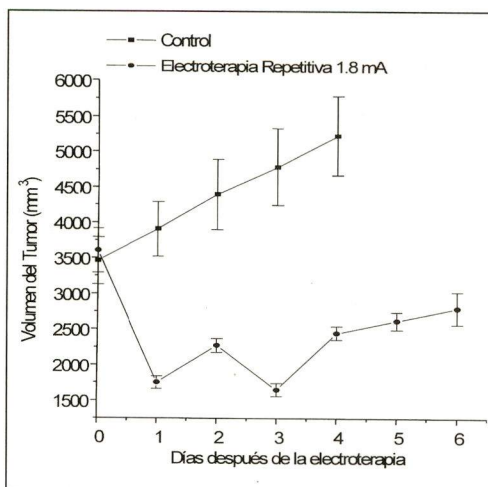


Figura 3 - Curvas de crecimiento del tumor siguiendo una electroterapia catódica repetitiva (1,8 mA durante 60 min), aplicado los días cero, segundo y quinto en un modelo de tumor de Ehrlich subcutáneo. Barras verticales indican la desviación estándar de la media.

Al aplicar la electroterapia de 1,8 mA durante 60 min en los días cero, segundo y quinto (Figura 3), disminuyó el volumen del tumor después de los días cero y segundo, no ocurriendo así el quinto día. Se observó una diferencia altamente significativa en la curva de crecimiento del tumor del grupo tratado con respecto a la del control (Tabla 4). En esta situación, el volumen inicial en el grupo control (n = 6) fue de $3.458 \pm 135,64 \text{ mm}^3$; y en el grupo tratado (n = 6), de $3.476 \pm 134,68 \text{ mm}^3$.

Cuando al grupo tratado se le aplicó corriente de 4 mA durante 30 min, los días cero y segundo (Figura 4), se observó que después de cada estímulo disminuyó el volumen del tumor (Tabla 5). Los volúmenes iniciales, mostrados en la Figura 4, de los grupos control (n = 6) y tratado (n = 6) fueron de $2.508 \pm 58,33$ y de $2.525 \pm 55,41 \text{ mm}^3$, respectivamente. Los tumores con volúmenes mayores a 2.000 mm^3 resultan irregulares y es difícil definir con exactitud sus tres ejes; razón por la cual se

Tabla 4 - Evaluación estadística de las curvas de crecimiento del tumor, en el modelo de tumor de Ehrlich después de la electroterapia con 1,8 mA durante 60 min, en los días cero, segundo y quinto.

Probabilidad p	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día	Quinto día	Sexto día
$p[V_{1,8 \text{ mA}} < V_c]$	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

$V_c, V_{1,8 \text{ mA}}$: volúmenes de los tumores de los grupos control y tratado con 1,8 mA.

consideró la masa fundamental del tumor, tomando como criterio la medición de las longitudes de los tres ejes acotados, sin tener en cuenta sus contornos indefinidos.

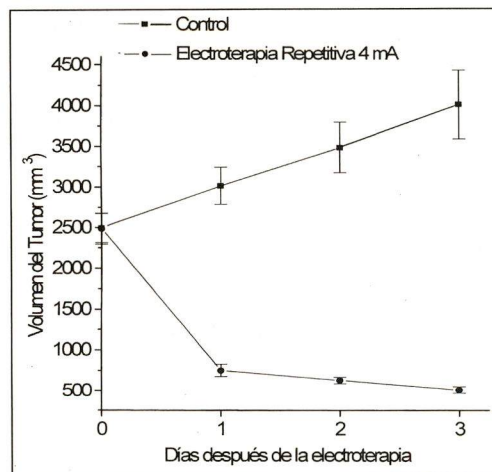


Figura 4 - Curvas de crecimiento de tumores de Ehrlich sometido a electroterapia catódica repetitiva de 4 mA durante 30 min aplicada los días cero y segundo. Barras verticales indican la desviación estándar de la media.

La aplicación de corriente eléctrica de 1,8 mA durante 60 min y 4 mA durante 30 min a tumores de volúmenes mayores que los anteriormente mencionados ($\geq 4000 \text{ mm}^3$) retardó el crecimiento de éstos; pero en estos grupos tratados se observó una alta mortalidad a las 48 horas postratamiento, inducida por la acción de la corriente eléctrica directa.

En todas las fases estudiadas, los criterios estadísticos arrojaron diferencias altamente significativas ($p < 0,02$) entre los grupos tratados y sus controles (Tablas 1-5). En la electroterapia de un solo estímulo, aunque se encontró igualmente una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos tratados, los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 4 mA durante 30 min (Tabla 2).

Tabla 5 - Evaluación estadística de las curvas de crecimiento del tumor en el modelo de tumor de Ehrlich después de la electroterapia, con 4 mA durante 30 min, en los días cero y segundo.

Probabilidad p	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día	Quinto día	Sexto día
$p[V_{4 \text{ mA}} < V_c]$	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

$V_c, V_{4 \text{ mA}}$: volúmenes de los tumores para los grupos control y tratado con 4 mA.

Discusión

Este estudio evidenció que la electroterapia catódica ejerce un marcado efecto antitumoral en estadios avanzados, resultado también obtenido por Sersa y colaboradores en tumores de volumen pequeño^(1-7, 15-17). Otros autores han reportado resultados similares con la terapia anódica^(1-3, 8-14). La existencia de una relación lineal entre la carga suministrada al tumor y los volúmenes de regresión de éste, independientemente de la terapia utilizada, nos permite emplear indistintamente la terapia catódica o anódica, siempre y cuando la razón entre las cargas suministradas al tumor, para cada terapia, sea igual a la razón entre las pendientes de las rectas obtenidas de forma experimental, para cada tipo de terapia, y a su vez igual a una constante, la cual es característica para cada tipo de tumor, garantizándose de esta forma resultados similares para ambas situaciones. Griffin y colaboradores⁽¹⁻³⁾ reportaron la existencia de cargas límites para ambas terapias, por encima de las cuales hay un alto índice de mortalidad en los animales tratados.

Los grupos tratados con corriente eléctrica, respecto a sus controles, mostraron porcentajes de necrosis y disminución del volumen tumoral altamente significativos (Figuras 1-4) (Tablas 1-5). En las Tablas 1-3 y Figura 1, se comparan los resultados entre las dosis utilizadas, observándose los mejores resultados para la dosis de 4 mA durante 30 min. Este resultado indica que el efecto antitumoral de las corrientes eléctricas es más efectivo para los niveles de corriente más altos, coincidiendo con lo reportado por Dodd y colaboradores⁽¹⁻³⁾; Zhu y colaboradores⁽¹³⁻¹⁴⁾; Sersa y colaboradores⁽¹⁷⁾.

La electroterapia repetitiva fue utilizada para los mayores volúmenes tumorales, observándose respecto a la electroterapia de un solo estímulo, una disminución del volumen más acentuada debido a que en diferentes días, el

cátodo fue colocado en distintas zonas del tumor, produciéndose un aumento del área de necrosis (Figuras 2-4).

La disminución del volumen tumoral observada en los grupos tratados fue consecuencia del alto porcentaje de necrosis debido a la acción directa y/o indirecta de la corriente eléctrica sobre las células cancerosas, conduciendo a la muerte de éstas. La acción directa puede estar dada por perturbaciones electromecánicas inducidas en la membrana de las células cancerosas, lo que trae como resultado cambios en el potencial transmembrana, en los procesos metabólicos y/o en los componentes estructurales de estas células. La acción indirecta (aspecto que será objeto de discusión en un próximo trabajo) puede ser explicada por la acción de radicales libres tales como los iones hidroxilo (OH^-) e hidronio (H_3O^+) que se producen en el cátodo y el ánodo, respectivamente. La producción de estos iones es dependiente de la intensidad de la corriente eléctrica directa e inducen alteraciones en los aminoácidos, enlace cruzado proteína-proteína y lípidos que componen la membrana celular.

También se observó vascularidad del tejido peritumoral atribuible a la electroterapia. Dodd y colaboradores⁽¹⁾ explican que esto puede estar dado por la presencia de trombos en los vasos capilares del tumor o en los que lo alimentan, e incluso en ambos. Además de esta hipótesis, suponemos que la afectación de la vascularidad pudiera deberse a la sustitución del tejido necrótico por fibroso.

La alta mortalidad observada en los grupos tratados, donde los volúmenes tumorales fueron iguales o mayores a 4000 mm^3 , se debe a que para mantener los mismos niveles de corriente hay que aumentar la diferencia de potencial entre los electrodos, ya que éstos se encuentran más alejados uno del otro debido al gran tamaño del tumor. Este aumento de la diferencia de potencial trae consigo un incremento del campo eléctrico, que al estar próximo o por encima del umbral fisiológico permisible puede dañar al tejido normal circundante y, por ende, convertirse en letal. Este aumento del campo eléctrico también produce un reforzamiento de las vías de acción directa y/o indirecta de la corriente eléctrica directa sobre las células cancerosas, mencionadas anteriormente. De ello se infiere que es preciso ser cuidadoso

con la aplicación de la corriente eléctrica directa en estos estadíos, puesto que puede tener efectos adversos sobre el organismo, para la configuración de electrodos usada (un par de electrodos). Para tumores de gran tamaño, independientemente de los altos voltajes que hay que aplicar entre los electrodos, el uso de un par de electrodos no es recomendable ya que siempre una parte del tumor logra sobrevivir a la acción de la corriente eléctrica directa y luego comienza a recuperarse, aumentando su volumen (Figuras 1-3). Estos dos inconvenientes pueden resolverse mediante el empleo de un arreglo de electrodos (configuración que genera un campo eléctrico homogéneo sobre todo el tumor) y/o dividiendo el tumor en secciones, las cuales se tratan por separado con dicho arreglo, además de combinar esta modalidad terapéutica con otras, tales como: quimioterapia, genoterapia, cirugía y/o inmunoterapia.

Agradecimientos

Agradecemos a Idelisa Bergues Cabrales del Centro de Energía Solar (CES); a Gustavo Silva, del Laboratorio de Animales y Biomodelos Experimentales (LABEX); a Rosario Ungaro Bena, del Departamento de Histología de la Facultad # 2 de Medicina de Santiago de Cuba por sus sugerencias y colaboración en este trabajo; así como a Miguel Fabars Zamora, Martha Otero González, Jorge Luis García Rodríguez y Adonis Quintana Quintana, del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, por su participación en el diseño y construcción de la fuente de alimentación de alta estabilidad y bajo ruido.

Bibliografía

1. Dodd, N.J.F.; Moore, J.V.; Taylor, T.V.; Zhoo, S. - Preliminary evaluation of low level direct current therapy using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Physics Medical*, 4: 2- 8, 1993.
2. Griffin, D.T.; Dodd, N.J.F.; Zhao, S.; Pullan, B.R.; Moore, J.V. - Low-level direct electrical current therapy for hepatic metastases. I. Preclinical studies on normal liver. *B. J. Cancer*, 72: 31-34, 1995.
3. Griffin, D.T.; Dodd, N.J.F.; Moore, J.V.; Pullan, B.R.; Taylor, T.V. - The effects of low-

- level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumor regression and systemic biochemical sequelae. *Br. J. Cancer*, 69: 875-878, 1994.
4. Miklavcic, D.; Vodovnik, L.; Bobanovic, F., et al. - Local treatment of murine tumors by electric direct current. *Electro Magnetobiol*, 11: 109-125, 1992.
 5. Serša, G.; Miklavcic, D. - The feasibility of low level direct electric current electrotherapy for regional cancer treatment. *Reg Cancer Treat*, 1: 31-35, 1993.
 6. Vodovnik, L.; Miklavcic, D.; Serša, G. - Modified cell proliferation due to electrical currents. *Medical Biological Engineering Computing*, 30: CE21-CE28, 1992.
 7. Miklavcic, D.; Fajgelj, A.; Serša, G. - Tumor treatment by electric current: electrode material deposition. *Bioelectrochemistry Bioenergetics*, 35: 93-97, 1994.
 8. Schauble, M.K.; Habal, M.B.; Gullick, H.D. - Inhibition of experimental tumor growth in hamsters by small direct current. *Arch Pathol Lab Med* 101: 294-297, 1977.
 9. Habal, M.B. - Effects of applied DC currents on experimental tumor growth in rats. *J Biomed Mater Res*, 14: 789-801, 1980.
 10. Nordstrom, B.E.W. - Electrochemical treatment of cancer. I: Variable response on cathodic fields. *Am J Clin Oncol (CCT)* 12: 530-536, 1989.
 11. Watson, B.W. - The treatment of tumor with direct electric current. *Med Sci Res*, 19: 103-105, 1991.
 12. David, S.L.; Absolom, D.R., et al. - Effect of low level direct current on in vivo tumor growth in Hamster. *Cancer Res*, 45: 5625-5631, 1985.
 13. Zhun, F.; Tan, S.; Lin, J., et al. - Experimental and application of electrochemical treatment for cancer with electric pulses. 17th Ann-Conf. of IEEE BMES, 633-634, 1995.
 14. Zhun, F.; Tan, S.; Lin, J. - Effects of direct pulse on tissues of tumors in mice. Conference Proceedings 1996 IEEE Engineering in Medicine and Biology. 18th Annual International Conference Amsterdam.
 15. Miklavcic, D.; Serša, G.; Kryzanowski, N.; et al. - Tumor treatment by direct current tumor temperature and pH, electrode material and configuration. *Bioelectrochemistry Bioenergetics*, 30: 209-220.
 16. Plesnicar, A.; Serša, G.; Vodovnik, L.; Jancar, J.; Zaletel-Kragelj, L.; Plesnicar, S. - Electric treatment of human melanoma skin lesion with low level direct electric current: an assessment of clinical experience following a preliminary study in five patients. *Eur J Surg*, 574: 45-49, 1994.
 17. Serša, G.; Golouh, R.; Miklavcic, D. - Antitumor effect of tumor necrosis factor combined with electrotherapy on mouse sarcoma. *Anti-Cancer Drugs*, 5: 69-74, 1994.