

Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 9-17

26.iii.2003

AÇÃO DA MELATONINA SOBRE AS CORRENTES MACROSCÓPICAS DE CÉLULAS H.Ep.-2

*Paloma Lys de Medeiros*¹

*Marcelo Moraes Valença*²

*Silene Carneiro do Nascimento*³

*Cláudio Gabriel Rodrigues*⁴

*Carlos Manuel Machado Carneiro*⁴

*Murilo Marchioro*⁵

*Catão Temístocles de Freitas Barbosa*⁵

RESUMO

Foram estudados os efeitos da melatonina (1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 7.50 e 10.0 mg/ml) sobre a proliferação celular e na expressão das correntes de células inteiras dependentes da voltagem (5.0, 10.0 e 15.0 mg/ml) sobre as células H.Ep.-2. Foi também analisada a atividade citotóxica da melatonina sobre a modulação eletrofisiológica das células H.Ep.-2. Os registros mostraram dois tipos de correntes: o tipo R é caracterizado por fraca dependência de voltagem para valores negativos; o tipo S mostrou forte retificação para potenciais hiperpolarizados. Na concentração de 10.0 mg/ml a melatonina aumentou a amplitude média de ambos os tipos de correntes; na concentração de 5.0 mg/ml somente correntes do tipo R foram expressas. A melatonina mostrou efeito inibitório sobre a proliferação *in vitro* de células H.Ep.-2. Na concentração de 10.0 mg/ml a melatonina induziu aumento macroscópico nas correntes R e S.

Palavras-chave: células H.Ep.-2; melatonina; eletrofisiologia; patch-clamp.

ABSTRACT

The effects of melatonin (1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 7.50 e 10.0 mg/ml) on cell proliferation and in the expression of voltage-dependent whole-cell currents (5.0, 10.0 e 15.0 mg/ml) were studied. The effect of melatonin cytotoxic activity on the electrophysiologic modulation of H.Ep-2 cells was also studied. Recordings showed two types of currents: the R-type was characterized by a weak voltage-dependence for negative values; the S-type showed strong rectification for hyperpolarized potentials. A melatonin concentration of 10.0 mg/ml increased the mean amplitude of both types of currents; at a concentration of 5.0 mg/ml only R-type currents were expressed. Melatonin showed an inhibitory effect on the proliferation *in vitro* of H.Ep.-2 cells. A melatonin concentration of 10.0 mg/ml induced a macroscopic increase of R and S currents.

Key words: H.Ep.-2 cells; melatonin; electrophysiology; patch-clamp

INTRODUÇÃO

A glândula pineal é considerada um temporizador do meio interno, estando envolvida na regulação de várias funções fundamentais (Hardeland *et al.*, 1994; Wahab *et al.*, 2000). A melatonina, *N*-acetil-5-metoxitriptamina, principal hormônio da

glândula pineal pode ser produzida por todos os animais (Poeggeler *et al.*, 1991) talvez devido a habilidade de sequestrar radicais livres, pela alta lipofilidade e fácil difusibilidade nos compartimentos celulares (Reiter *et al.*, 1994).

Estudos recentes revelaram alterações eletrofisiológicas e funcionais promovidas pela

¹ Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco

² Departamento de Neuropsiquiatria do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco.

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

⁵ Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.

melatonina sobre uma linhagem de células conhecida como carcinoma epidermóide da cérvix uterina, células HeLa (Klein *et al.*, 1999). As células H.Ep.-2 fazem parte da linhagem de células derivadas do carcinoma epidermóide e apresentam características bastante similares às das células HeLa, como crescimento rápido e formação de monocamadas (Moore *et al.*, 1955). Para contribuir com informações que possam elucidar o mecanismo pelo qual o hormônio melatonina suprime o crescimento das células tumorais, investigamos os efeitos da melatonina sobre a proliferação celular e sobre a modulação eletrofisiológica das células H.Ep.-2.

MATERIAL E MÉTODOS

Células: As células H.Ep.-2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Nº.: CR023) e mantidas pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Droga: A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (C₁₃ H₁₆ N₂ O₂), foi adquirida da Companhia Química Sigma e dissolvida em 0,5 % de etanol.

Condições da cultura e viabilidade celular: Foi utilizado o meio de cultura DMEM (SIGMA), suplementado com 1% (v/v) de soro fetal bovino (GIBCO), 1% (p/v) de glutamina 2,0 mM (SIGMA) e 1% (p/v) de uma solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/ml) (Nascimento, 1993). As células foram tripsinizadas e contadas (Benchimol *et al.*, 1996), obtendo-se uma suspensão de 5.10⁴ células/ml, 24 horas antes do início do experimento.

Após cada tripsinização, foi determinada a viabilidade celular pelo teste de exclusão do Azul Tripán (MERCK) 0,4 % p/v, em PBS, numa proporção de 1:10 (corante: amostra da suspensão celular), que permite determinar a porcentagem de células vivas e mortas (Weisenthal, 1983). A contagem das células foi realizada através de um microscópio invertido

LEITZ. Para os testes de citotoxicidade e o estudo da modulação eletrofisiológica das células H.Ep.-2 sob ação do hormônio melatonina, foram utilizadas preparações celulares cuja viabilidade se encontrava acima de 95%.

Determinação da atividade citotóxica: Para determinação da citotoxicidade (Geran *et al.*, 1972) com células H.Ep.-2, foi preparada uma suspensão de 5x10⁴ células/ml de meio e distribuída em placas de cultura com 96 poços. Estas placas foram incubadas a 37° C em estufa (Sedas, Milão-Itália) com atmosfera de 5 % de CO₂. Após 24 horas, o hormônio foi adicionado às células, nas seguintes concentrações: 1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 5.00, 7.50, 10.00 mg/ml. Cada concentração foi testada em quadruplicata. O meio de cultura sem suplemento foi utilizado como controle. Setenta e duas horas após a incubação das células com a melatonina, foi adicionado 25 ml de Brometo[3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio] (MTT ou sal tetrazólio - SIGMA) a 5% em PBS (p/v), a cada poço, e a placa foi reincubada a 37° C por mais duas horas. Ao término deste período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT, foi aspirado dos poços e 100 ml de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolução dos cristais formazan. A leitura óptica foi realizada em um registrador automático de placas modelo 3550 BIO-RAD a 595 nm. O ensaio colorimétrico do MTT baseia-se na capacidade que as células vivas têm de transformar o sal tetrazólio solúvel, de cor amarela, em um precipitado de formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação de uma enzima mitocondrial, a succinil desidrogenase (Hess & Pearse, 1963; Mosman, 1983).

Descrição da técnica de patch-clamp: A técnica de patch-clamp foi utilizada de acordo com a descrição de Hamill *et al.* (1981). Os registros de correntes foram obtidos através de micropipeta, na configuração de célula inteira ou “whole-cell”, preenchida com uma solução salina (solução interna). Esta solução banha um eletródio de Ag/AgCl conectado a um amplificador

de patch (List EPC8 - HEKA Elektronik), acoplado a um computador IBM compatível (PC 486) através de um conversor A/D (Lab PC +, National Instruments). O registro direto (on-line) foi feito com software "Whole Cell Program" (WCP, John Dempster, 2000); a micropipeta foi direcionada até a célula com a ajuda de um micromanipulador MX3 (Narishige, Japão). Após o contato da ponta da micropipeta com a membrana celular, a resistência elétrica medida através de um pulso de 10 mV, foi monitorada até que atingisse valores da ordem de 3 a 15 Gigaohms (selo Gigaohmico). A partir do selo, a configuração "whole-cell" foi obtida por sucções rápidas. A solução interna (mM) foi composta por : KCl 150; CaCl₂ 3,81; MgCl₂ 0,112; EGTA 5, tamponada com HEPES 10 e pH ajustado para 7,4 com KOH. Para a determinação da concentração de Ca²⁺ livre, fixada em 2×10^{-7} M, foi utilizado o programa "MaxChelator".

As células H.Ep.-2 foram cultivadas em placas de 6 poços com lamínulas de vidro redondas (THERMANOXÒ) para facilitar a aderência e formação de monocamadas. O protocolo de cultivo foi mantido como descrito anteriormente. Setenta e duas horas após a incubação das células com melatonina, procedeu-se a troca do meio de cultivo por solução externa (Hank's Balanced Salt Solution) com a seguinte composição (mM): NaCl 140; KCl 4,6; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1,6; glicose 10; NaHCO₃ 5 e HEPES 10; em um pH de 7,4 ajustado com NaOH. As soluções externa e interna foram filtradas com membranas (MILLIPORE), tipo GS, de éster de celulose, com poros de 0,22 µm. As resistências de acesso das micropipetas de patch-clamp foram de 4-6 MegaOhms.

Análise Estatística: Foi utilizada a análise de variância com um fator (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi de 5%

O efeito da melatonina no crescimento das células H. Ep.-2

Houve diferença significativa no crescimento das células da linhagem do carcinoma epidermóide de laringe (H.Ep.-2) sob a influência da melatonina por um período de três dias (ANOVA: F005;7;56=5.87, p<0.05).

A melatonina (1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 5.00 e 7.50 mg/ml) inibiu a proliferação das células (H.Ep.-2) quando comparadas ao controle (Tukey: $q_{0.05;56;8}=6.27$, p<0.05; $q_{0.05;56;8}=7.29$, p<0.05; $q_{0.05;56;8}=5.42$, p<0.05; $q_{0.05;56;8}=5.59$, p<0.05; $q_{0.05;56;8}=6.78$, p<0.05; $q_{0.05;56;8}=6.44$, p<0.05, respectivamente) (Figura 1). O crescimento celular observado na dose de 10 mg/ml, pode estar relacionado com a expressão de proteínas e fatores de crescimento envolvidos na proliferação; ou mesmo, com uma diminuição ou ausência da expressão de receptores essenciais a ação inibitória da melatonina.

A ação antiproliferativa *in vitro* dos indóis da pineal foi estudada sobre diversas linhagens de células tumorais, como melanomas (B16), sarcomas (S180), células semelhante a macrófagos (PUS), fibroblastos (3T3) e coriocarcinomas (JAR). As células foram examinadas pela mensuração da incorporação de timidina tritiada pelas células tumorais, onde a potência inibitória dos indóis foi encontrada na seguinte ordem: metoxitriptamina > melatonina = metoxitriptofol = hidroxitriptofol = ácido metoxindolacético > serotonina = ácido hidroxindolacético (Sze *et al.*, 1993). O efeito inibitório da melatonina também foi descrito como inibidor do crescimento de células tumorais mamárias e das células do câncer de próstata (Marelli *et al.*, 2000; Hill & Blask, 1988; Cos & Sánchez-Barceló, 1994).

O efeito adverso dos indóis sobre a viabilidade celular também foi investigado (Sze *et al.*, 1993). Estudos recentes revelaram que as linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e T47D) não foram inibidas pelo hormônio melatonina e o tratamento

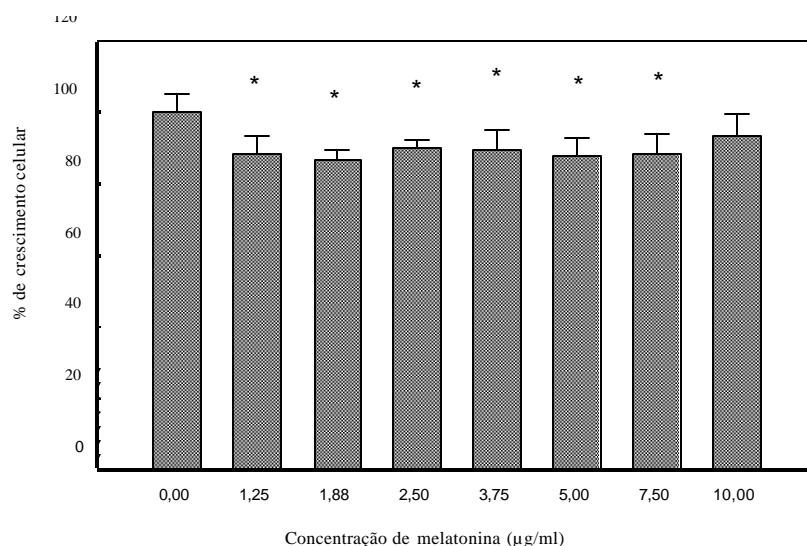


Figura 1 - Efeito da melatonina sobre a proliferação celular *in vitro* nas células do carcinoma epidermóide de laringe (H.E.p-2). * $p < 0,05$ comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).

seqüencial com melatonina e ácido retinóico, induzindo apoptose nas células tumorais MCF-7, não é capaz de suprimir a proliferação celular, devido a ausência de estimulação dos receptores do ácido retinóico pela não utilização prévia da melatonina (Papazisis *et al.*, 1998; Eck *et al.*, 1998).

Nossos resultados estão de acordo com os efeitos antiproliferativos descritos para os indóis, exceto na dose de 10 mg/ml. Entretanto, o mecanismo pelo qual o hormônio suprime o crescimento das células tumorais não está elucidado, necessitando de mais pesquisas para demonstrar o papel anticancerígeno da melatonina.

Alterações eletrofisiológicas induzidas pela melatonina sobre células H.Ep.-2 em cultura

Diferentes correntes de célula inteira induzidas em H.Ep.-2 foram registradas (Figuras 2A e 2B): correntes do tipo R, caracterizadas por uma fraca dependência de voltagem para valores negativos (Figura 2C) e correntes do tipo S, que mostraram uma forte retificação para potenciais hiperpolarizados

(Figura 2D). Uma vez que o etanol (0,5 %) foi utilizado para a diluição da melatonina, foi preciso testarmos os efeitos desse agente sobre as correntes macroscópicas dos tipos R e S. O etanol reduziu a amplitude média dos dois tipos de correntes, sem, entretanto, alterar sua dependência de voltagem (Figura 2C e 2D).

A ação da melatonina (5.0, 10.0 e 15.0 mg/ml) sobre as correntes de células inteiras em H.Ep.-2 está ilustrada na Figura 3. A amplitude média de corrente dos tipos R e S alcançaram os seus valores máximos na concentração de 10.0 mg/mL de melatonina, enquanto os outros valores de concentração (5.0 e 15.0 mg/ml) não foram significativamente diferentes do controle ($p > 0.05$).

Esses dados reforçam os resultados da ação proliferativa da melatonina numa dose específica sobre as células H.Ep.-2. Provavelmente a dose de 10.0 mg/ml represente a resposta mais efetiva do crescimento celular sobre as células estudadas, por ativar as correntes do tipo R e S (independente e dependente de voltagem respectivamente).

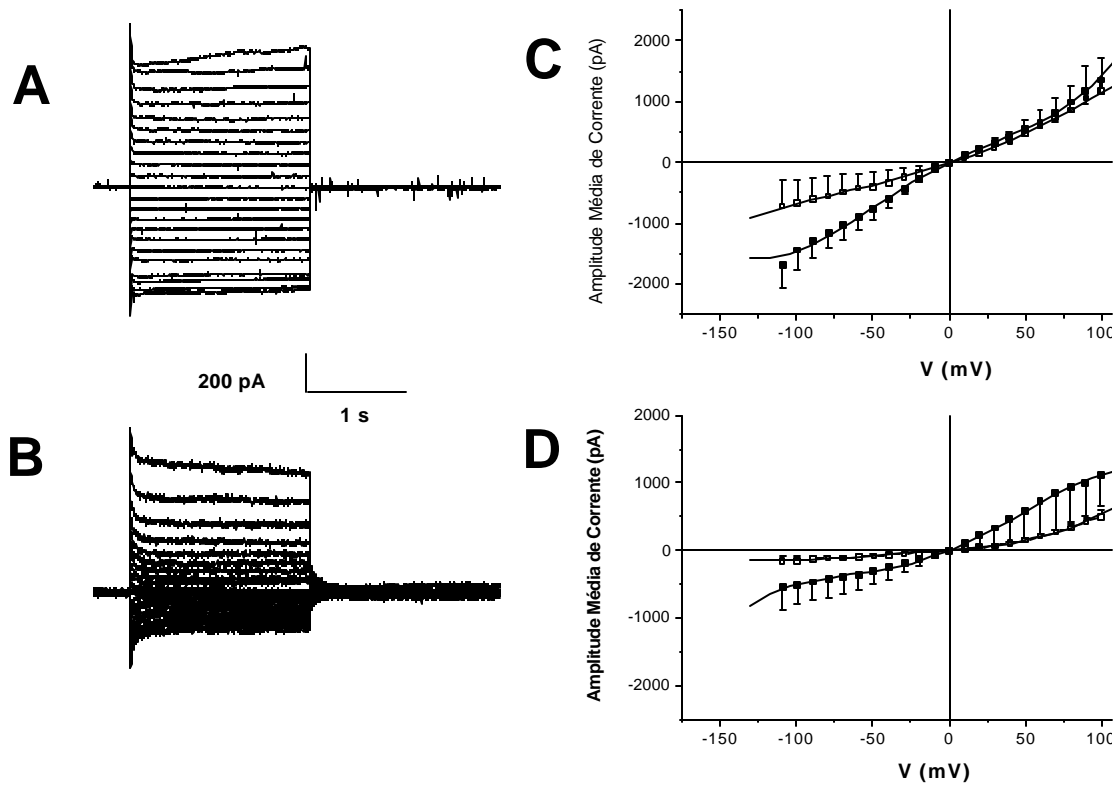


Figura 2 – Curvas corrente *versus* voltagem (I-V) para os diferentes tipos de correntes de célula inteira. A e B, registros das correntes do tipo R e S, em células individuais, ativadas a partir de 0 mV na faixa entre +110 mV a -110 mV, em intervalos de pulsos de 10 mV; C e D, curvas I-V para as correntes do tipo R e S nas condições controles sem álcool (■, n = 3 e n = 5, respectivamente) e controles com álcool (□, n = 5 para ambos).

Trabalhos recentes demonstram que vários canais iônicos expressos em células de tumores participam diretamente de sua proliferação: i) Os canais de K^+ , presentes em células de câncer de mama humano, glioma C6 de humanos e ratos; adenocarcinoma colônico de humanos; próstata de rato e de mieloma humanos RPMI-8226 (Grimes *et al.*, 1995; Woodfork *et al.*, 1995; Skryma *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2000; Malhi *et al.*, 2000; Rouzair-Dubois *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 2000; Rane, 2000; Ranson & Sontheimer, 2001); ii) os canais de cálcio de células de câncer de tumor prostático humano, carcinomas renal e pancreatobiliar, mieloma e próstata humana (Viglione *et al.*, 1995;

Kohn *et al.*, 1996; Wasilenko *et al.*, 1996); iii) canais de cloreto de células de câncer de mama humana; colon T84, mielomas, astrocitomas humano e glioma C6 de rato (Levitan & Garber, 1995; Chou *et al.*, 1995; Ulhich *et al.*, 1995; Rouzair-Dubois *et al.*, 2000); e iv) canais de sódio de células de câncer de mama humana, pulmão e próstata de ratos (Grimes *et al.*, 1995; Blandino *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 2000).

As junções comunicantes ou “gap junctions” também têm uma participação efetiva na proliferação celular. A expressão das junções regula o ciclo celular em tecidos normais e a ausência destas junções é observada entre as células de tumores (Grossman *et al.*, 1994; Laird *et al.*, 1999). É importante salientar

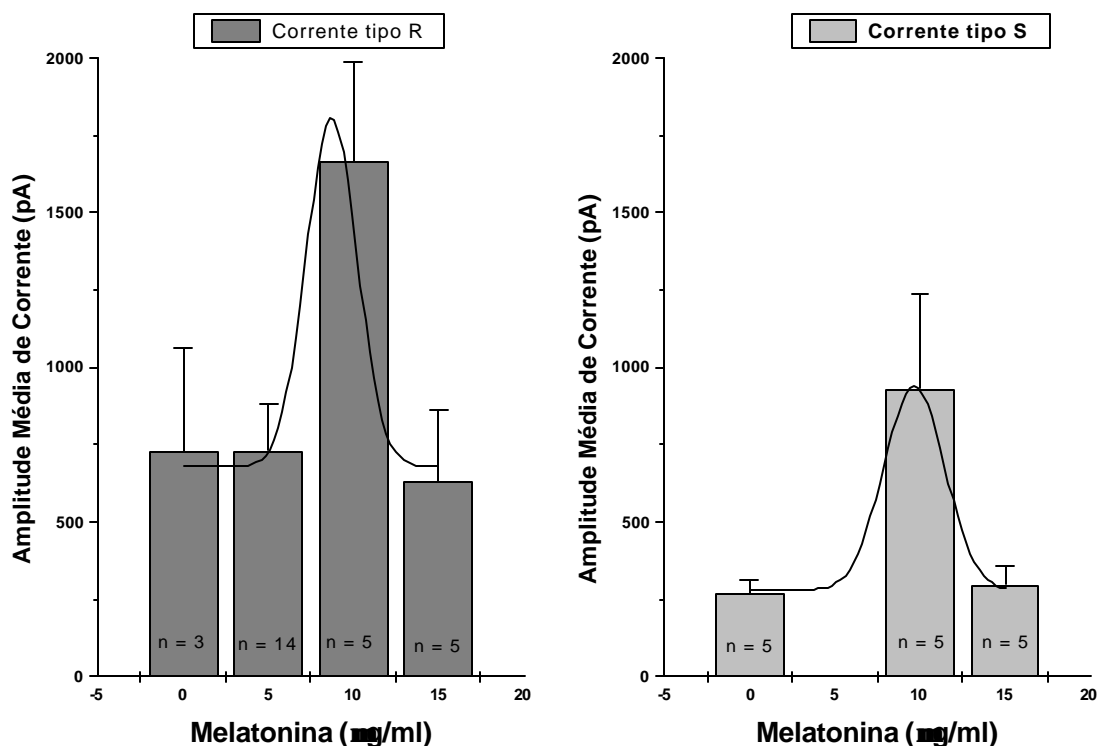


Figura 3 – Amplitude média de corrente de célula inteira em resposta a um pulso de voltagem variando de 0 mV para +70 mV para as correntes do tipo R (lado esquerdo) e do tipo S (lado direito), em diferentes concentrações de melatonina.

que entre todos os tipos de canais iônicos expressos em células excitáveis e não excitáveis, os canais de K^+ são os mais diversificados do ponto de vista estrutural e funcional (Hille, 1992).

Além do câncer existem várias doenças genéticas humanas relacionadas às mutações de genes estruturais de canais iônicos, como a paralisia periódica hipercalêmica familiar e a fibrose cística. A primeira é causada pelos canais de Na^+ do músculo esquelético, o qual permanece aberto por um período muito longo na presença de altas concentrações de potássio extracelular; a segunda ocorre quando os canais de cloreto perdem sua regulação (Hille, 1992).

Estudos realizados por Klein *et al.*, (1999) demonstraram que células de HeLa com semelhanças às H.Ep-2 expressam dois tipos de canais permeáveis

ao K^+ : canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (independente de voltagem) e canais de K^+ retificadores para o interior, independente de Ca^{2+} (Diaz, *et al.*, 1995; Sauvé *et al.*, 1990, Sauvé 1986). Outros estudos vêm demonstrando que a ação de substâncias inibidoras dos canais de K^+ são capazes também de inibir a proliferação de linfócitos T e B e das células de gordura marrom em cultura de tecidos normais (Woodfork *et al.*, 1995). A inibição da proliferação celular, através de substâncias inibidoras dos canais de K^+ , tem sido estudada também em células tumorais de linfomas e carcinomas podendo eventualmente ser utilizado no tratamento do câncer (Woodfork *et al.*, 1995, Grimes *et al.*, 1995; Skryma *et al.*, 1997, Bianchi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Meyer & Heinemann, 1998).

REFERÊNCIAS

- Benchimol, M. 1996. *In*: Benchimol, M., C.S. Attias & T.U. Carvalho. **Métodos de estudo da célula**. Editora Eletrônica-FENORTE/UENF, Rio de Janeiro.
- Bianchi, L. B. Wible, A. Arcangeli, M. Tagliatela, F. Morra, P. Castaldo, O. Crociani, B. Rosati, L. Faravelli, M. Olivotto & E. Wanke, 1998. Herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: aq selective advantage for cancer cells? **Can. Res.** 58:815-822.
- Blandino, J.K.W., M.P. Viglione, W.A. Bladey, H.K. Oie & Y.I. Kim. 1995. Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potential and inhibition by Lambert-Eaton syndrome. **J. Memb. Biol.** 143:153-163.
- Chou, C.Y., M.R. Shen & S.N. Wu. 1995. Volume-sensitive chloride channels associated with human cervical carcinogenesis. **Can. Res.** 55:6077-6083.
- Cos, S. & E.J. Sánchez-Barceló. 1994. Differences between pulsative or continuous exposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. **Can. Lett.** 85: 105-109.
- Diaz, M. & F.V. Sepulveda. 1995. Characterization of Ca²⁺-dependent inwardly rectifying K⁺ currents in HeLa cells. **Pflügers Arch.** 430: 168-180.
- Eck, K.M. L. Yuan, L. Duffy, P.T. Ram, S. Ayettey, I. Chen, C.S. Cohn, J.C. Reed & S.M. Hill. 1998. A sequential treatment regimen with melatonin and *all-trans*retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. **Brit. J. Cancer** 77: (12) 2129-2137.
- Fraser, S.P., J.A. Grimes & M.B.A. Djamgoz. 2000. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: Comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. **Prostate** 44:61-76.
- Geran, R.I., N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, A.M. Schumacher & B.J. Abbott. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Can. Chemother. Rep.** 3 (2), part 3.
- Grimes, J.A., S.P. Fraser, G.J. Stephens, J.E.G. Downing, M.E. Laniado, C.S. Forster, P.D. Abel & M.B.A. Djamgoz. 1995. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumor cell lines: contribution to invasiveness in vitro. **FEBS Letters** 369:290-294.
- Grossman, H.B., M. Liebert, I.W. Lee, & S. W. Lee. 1994. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. **Can. Res.** 54:3062-3065.
- Hamill, O.P., A. Marty & E. Neher. 1981. Improved Patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Arch.** 391: 85-100.
- Hardeland, R., B. Poeggeler, I. Balzer & G. Behrmann. 1994. A hypothesis on the evolutionary origins of photoperiodism based on circadian rhythmicity of melatonin in phylogenetically distant organisms, pp. *In*: (C. Guntenbrunner, G. Hildebrandt & R. Moog, Ed.). **Chronobiol. & Chronomed** Peter Sang Verlag, Frankfurt.
- Hess, R. & A.G.E. Pearse. 1963. Pathways of reduced pyridine nucleotide oxidation in rat-brain homogenate demonstrated by a tetrazolium method. **Biochim. Biophys. Acta** 71: 285-294.
- Hill, S.M. & D.E. Blasko. 1988. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. **Cancer Res.** 48: 6121.
- Hille, B. 1992. *Ionic channels and excitable membranes*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. USA.
- Karasek, M. & M. Pawlikowski, 1999. Antiproliferative effects of melatonin and CGP 52608. **Biol. Sign. Receptors** 8: (1-2) 75-78.
- Kholer R., C. Degenhardt, M. Kuhn, N. Runkel, M. Paul & J. Hoyer. 2000. Expression and function of endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. **Circul. Res.** 87:496-503.
- Klein, H., L. Garneau, M. Coady, G. Lemay, J.Y. Lapointe & R. Sauvé. 1999. Molecular characterization of an inwardly rectifying K⁺ channel from HeLa Cells. **J. Memb. Biol.** 167. 43-52.
- Kohn, E.C., E. Reed, G. Sarosy, M. Christian, C.J. Link, K. Cole, W.D. Figg, P.A. Davis, J. Jacob, B. Goldspiel & L.A. Liotta. 1996. Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancers. **Can. Res.** 56:569-573.
- Laird, D.W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H.T. Huynh, G.D. Carystinos & M.A. Alaoui-Jamali. 1999. Deficiency of connexin43 gap junctions is an

- independent marker for breast tumors. **Can. Res.** 59:4104-4110.
- Levitan, I. & S.S.Garber. 1995. Voltage-dependent inactivation of volume-regulated Cl⁻ current in human T84 colonic and B cell myeloma cell lines. **Pflügers Arch.** 431:297-299.
- Malhi, H., A.N.Irani, P.Rajvanshi, S.O.Suadicani, D.C.Spray, T.V.McDonald & S.Gupta. 2000. K(ATP) channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines: Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. **J. Biol. Chem.** 275:26050-26057.
- Marcelli, M.M.; P.Limonta; R.Maggi; M.Motta & R.M. Moretti. 2000. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. **Prostate** 45: (3) 238-244.
- Meyer, R. & S. H.Heinemann. 1998.Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. **J. Physiol.** 508:49-56.
- Moore, A.E., L.Sabachewsky & H.W. Toolan. 1955. Culture characteristics of permanent lines of human cancer cells. **Cancer Res.** 15: (9) 598-605.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65: 55-63.
- Nascimento, S.C. 1993. Recherche de l'activite antitumorale de produits de synthese ou d'origine naturelle. Utilisation du Samba pour l'analyse de modifications cellulaires induites. **Tese de doutorado - não publicada** - Universite Joseph Fourier.
- Papazisis, K.T., D.Kouretas, G.D.Geromichalos, E.Sivridis, O.K.Tsekrelis, K.A.Dimitriadis & A. H. Kortsaris. 1998. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. **J. of Pineal Res.** 25: (4) 211-218.
- Poeggeler, B., I.Balzer, R.Hardeland & A. Lerchl. 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Naturwissenschaften** 78: 268-269.
- Rane, S.G. 2000. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 16:457-463.
- Ranson, C.B. & H.Sontheimer. 2001. BK channels in human glioma cells. **J. Neurophysiol.** 85:790-803.
- Reiter, R.J., D.X.Tan, B.Poeggeler, A.Menedez-Pelaez, L.D.Chen & S. Saarela. 1994. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. **Ann. New York Acad. Sci.** 719: 1-12.
- Rouzaire-Dubois, B., J.B.Milandri, S.Bostel & J.M.Dubois. 2000. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 gliomas cells. **Pflügers Arch.** 440:881-888.
- Sauvé, R., A.Diarra, M.Chahine, C.Simoneau, L.Garneau & G. Roy. 1990. Single-channel and fura-2 analysis of internal Ca²⁺ oscillations in HeLa cells: Contribution of the receptor-evoked Ca²⁺ influx and effect of internal pH. **Pflügers Arch.** 416: 43-52.
- Sauvé, R., C.Simoneau, R.Monette & G. Roy. 1986. Single-channel analysis of the potassium permeability in HeLa cancer cells: Evidence for a calcium-activated potassium channel of small unitary conductance. **J. Memb. Biol.** 96: 199-208.
- Shen, A. Y.; H.F.Li & S.I. Lu. 1999. Cytotoxicity studies of 2-hydroxymethyl-1-naphthol diacetate on K⁺ currents in neoplastic plasma cells. **Drug Develop. Res.** 47:1-8.
- Skryma, R.N., N.B.Prevarskaya, L.Duffy-Barbe, M.F.Odessa, J.Audin & B.Duffy. 1997. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: Involvement in cell proliferation. **Prostate** 33:112-122.
- Sze, S.F., T.B.Ng & W.K. Liu. 1993. Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. **J. Pineal Res.** 14: 27-33.
- Ullrich, N., G.Y.Gillespie & H.Sontheimer. 1995. Human astrocytoma cells express a unique chloride current. **Neuroreport** 7:343-347.
- Viglione, M.P., T.J.O'Shaughnessy & Y.I.Kim. 1995. Inhibition of calcium currents and exocytosis by Lambert-Eaton syndrome antibodies in human lung cancer cells. **J. Physiol.** 488:303-317.
- Wahab, M.H.A., E.E.M.S.Akoul & A.H. Abdel-Aziz. 2000. Modulatory effect of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Tumori** 86: (2) 157-162.
- Wang, S., Z.Melkounian, K.A.Woodfork, C.Cather, A. G.Davidson, W.F.Wonderlin & J.S. Strbl. 1998. Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **J. Cell. Physiol.** 176:456-464.

- Wasilenko, W.J., A.J.Palad, K.D Somers, P.F.Blackmore, E.C.Kohn, J.S.Rhim, G.L.Wright Jr. & P.F.Schellhammer. 1996. Effects of the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole on the proliferation and invasiveness of human prostate tumor cell lines. **Int. J. Can.** 68:259-264.
- Weisenthal, L.M., J.A.Marsden, P.L.Dill & C.K.Macaluso. 1983. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. **Can. Res.** 43: 749-757.
- Woodfork, K.A.; W.F.Wonderlin; V.A.Peterson; J.S.Strobl. 1995. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. **J. Cell. Physiol.** 162:163-171.

Aceito: 3.x.2001