LEONARDO AFFONSO MASSABKI CAFFARO

# Influência da estimulação elétrica nervosa transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação
Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto

**São Paulo**
**2016**

LEONARDO AFFONSO MASSABKI CAFFARO

# Influência da estimulação elétrica nervosa transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação
Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto

**São Paulo**
**2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Caffaro, Leonardo Affonso Massabki
Influência da estimulação elétrica transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos / Leonardo Affonso Massabki Caffaro. -- São Paulo, 2016.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências da Reabilitação.
Orientadora: Raquel Aparecida Casarotto.

Descritores: 1.Camundongos 2.Estimulação elétrica nervosa transcutânea 3.Fisioterapia 4.Modalidades de fisioterapia 5.Neoplasias 6.Neoplasias da mama

USP/FM/DBD-465/16

## Agradecimentos

*Agradeço à minha família que sempre me incentivou e apoiou em todas as minhas escolhas profissionais e acadêmicas.*

*Aos meus amigos que me ajudaram a manter meus níveis de estresse e serotonina, em especial ao Felipe Américo.*

*À minha Orientadora-mãe ou Mãe-orientadora, alguém de tamanha importância para mim que nem consigo definir a ordem entre sujeito e predicado, Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto, que me orientou com maestria, auxiliou e participou ativamente das inúmeras fases desta pesquisa, de forma profissional e humana, fazendo deste um trabalho mais agradável.*

*Aos meus professores de graduação da Universidade Paulista (UNIP) e da pós-graduação em Fisioterapia Musculoesquelética da Irmandade da Santa Casa de Misericórida de São Paulo (ISCMSP).*

*Agradeço em especial o Prof. Dr. Cristiano Schiavinato Baldan que despertou meu interesse pela eletrotermofototerapia e ao Prof. Dr. Thiago Saikali Farcic que me ensinou e mostrou como é o universo da pesquisa experimental; juntos, estes professores tiveram grande importância em minhas escolhas profissionais e acadêmicas.*

*Ao Prof. Dr. Roger Chammas, à Mara Junqueira, à Dra. Karina Mie Furuzawa e à Camila Miranda por ajudarem no delineamento desta pesquisa, pela participação na parte prática nos diferentes laboratórios que passei e pelos conhecimentos que me foram transmitidos.*

*À Vânia e à Dila da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) pela orientação recebida por diversas vezes, com a maior paciência, sobre o preenchimento das documentações necessárias deste estudo.*

*À Tania Tonezzer pelas conversas construtivas que tivemos sobre o tema de meu mestrado e por sua disposição em me ajudar.*

*Aos profissionais envolvidos nas diversas etapas deste trabalho, em especial aqueles do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que me forneceu bolsa emergencial de fomento à pesquisa no início do mestrado.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que me forneceu bolsa por quota.*

*Ao Departamento de Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (FOFITO) e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).*

## Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# Sumário

Agradecimentos ..... vi
Normalização adotada ..... vii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos ..... x
Lista de figuras e gráficos ..... xiii
Resumo ..... xiv
Abstract ..... xv

**1. INTRODUÇÃO ..... 1**

**2. REVISÃO DA LITERATURA ..... 5**

2.1 Câncer ..... 6
2.1.1 Microambiente tumoral (TME) ..... 6
2.1.1.1 Imunidade e câncer ..... 7
2.1.1.2 Imunoedição ..... 9
2.1.1.3 Inflamação crônica, cooptação e progressão tumoral ..... 10
2.1.2 Vascularização tumoral e progressão tumoral ..... 12
2.1.2.1 Fase avascular e troca angiogênica ..... 12
2.1.2.2 Fase vascular ..... 13
2.1.3 Câncer de mama ..... 14
2.1.4 Células 4T1 ..... 15
2.2 Uso de agentes eletrofísicos sobre tumores ..... 16
2.2.1 Efeitos de correntes elétricas sobre tumores e células cancerígenas ..... 17
2.3 Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS) ..... 19
2.3.1 Modalidades ..... 19
2.3.1.1 TENS convencional ..... 20
2.3.1.2 TENS acupuntura ..... 20
2.3.1.3 TENS intenso ..... 20
2.3.2 Efeitos vasculares da TENS e dosimetria ..... 21
2.3.2.1 Influência da TENS no fluxo sanguíneo e temperatura ..... 21
2.3.2.2 Influência da TENS na reparação tecidual ..... 25
2.3.3 Mecanismos de ação da TENS sobre a vascularização ..... 26
2.3.4 TENS em pacientes oncológicos ..... 29

**3. OBJETIVOS ..... 33**

3.1 Objetivo geral ..... 34

3.2 Objetivos específicos ..... 34

**4. MÉTODOS ..... 35**

4.1 Aspectos Éticos ..... 36

4.2 Animais ..... 36

4.3 Experimento *in vitro*: Cultura de células 4T1 ..... 37

4.4 Experimento *in vivo*: Inoculação das células 4T1 e análise do crescimento tumoral ..... 37

4.5 Procedimentos experimentais ..... 37

4.6 Protocolo experimental: Grupos de tratamento ..... 41

4.7 Eutanásia e preparação das lâminas histológicas ..... 42

4.8 Análise da porcentagem de área de necrose em tecido viável ..... 43

4.9 Análise estatística ..... 43

**5. RESULTADOS ..... 45**

**6. DISCUSSÃO ..... 50**

**7. CONCLUSÕES ..... 56**

**8. REFERÊNCIAS ..... 58**

**ANEXO ..... 67**

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

| | |
|---|---|
| **%** | Porcentagem |
| **+/-** | Mais ou menos |
| **=** | Igual a |
| **<** | Menor |
| **>** | Maior |
| **°C** | Grau Célsius |
| **µg/ml** | Micrograma por quilograma |
| **µL** | Microlitro |
| **µm** | Micrometro |
| **µm²** | Micrometro quadrado |
| **µs** | Microssegundo |
| **ADM** | Amplitude de movimento |
| **Ce6** | Cloro e6 |
| **CEUA** | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| **CGRP** | Peptídeo relacionado ao gene calcitonina (*Calcitonin gene-related peptide*) |
| **CIOMS** | Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas |
| **cm²** | Centímetro quadrado |
| **$CO_2$** | Dióxido de carbono |
| **EGF** | Fator de crescimento endotelial (*Endothelial growth factor*) |
| **EVA** | Escala visual analógica |
| **FGF** | Fator de crescimento básico dos fibroblastos (*Fibroblastic growth factor*) |
| **FMUSP** | Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| **FREMS** | Estimulação elétrica de frequência modulada (*Frequency-* |

| | |
|---|---|
| | *modulated electrical stimulation*) |
| **GAF** | Grupo de alta frequência |
| **GBF** | Grupo de baixa frequência |
| **GP** | Grupo placebo |
| **HIF-1α** | Fator-1α induzido por hipóxia (*Hypoxia inducible factor-1α*) |
| **HVPC** | Corrente pulsada de alta voltagem (*High voltage pulsed current*) |
| **Hz** | Hertz |
| **ICESP** | Instituto do Câncer do Estado de São Paulo |
| **IL-1** | Interleucina-1 |
| **IL-6** | Interleucina-6 |
| **IL-8** | Interleucina-8 |
| **INCA** | Instituto Nacional do Câncer |
| **g** | Grama |
| **LLLT** | Terapia por laser de baixa intensidade (*Low level laser therapy*) |
| **mA** | Miliampère |
| **MCP-1** | Proteína quimiotática de monócitos 1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) |
| **MDR1** | Gene de resistência a múltiplas drogas (*Multi-drug resistence gene*) |
| **mg/Kg** | Miligrama por quilograma |
| **MIF** | Fator inibidor da migração de macrófagos (*Macrophage migration inhibitory factor*) |
| **$mm^3$** | Milímetro cúbico |
| **NMES** | Estimulação elétrica neuromuscular (*Neuromuscular electrical stimulation*) |
| **PBS** | Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*) |
| **PBS/EDTA** | Tampão fosfato salino com ácido etilenodiamino tetra-acético |

| | |
|---|---|
| | (*Phosphate buffered saline plus Ethylenediamine tetraacetic acid*) |
| **PDGF** | Fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor*) |
| **RPMI** | *Roswell Park Memorial Institute* |
| **Σ** | Somatória |
| **SBCAL** | Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório |
| **SP** | Substância P |
| **TAM** | Macrófagos associados ao tumor (*Tumor-associeted macrophages*) |
| **TENS** | Estimulação elétrica nervosa transcutânea (*Transcutaneous electrical nerve stimulation*) |
| **TGF-β** | Fator de crescimento transformador-β (*Transforming growth factor-β*) |
| **TME** | Microambiente tumoral |
| **TNF** | Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*) |
| **TNF-α** | Fator de necrose tumoral-α (*Tumor necrosis factor-α*) |
| **TSE** | Eletroanalgesia transcutânea espinal (*Transcutaneous spinal electroanalgesia*) |
| **tto** | Tratamento |
| **UST** | Ultrassom terapêutico |
| **V** | Volume |
| **VEGF** | Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*) |
| **π** | Pi |

## Lista de figuras e gráficos

Figura 1. Fluxograma do protocolo de estudo. .....38

Figura 2. Estimulação elétrica enquanto os animais permanecem anestesiados com isofurano a 1,5%. .....39

Figura 3. Eletrodo de silicone carbonado com 1 cm² de área de superfície e paquímetro digital. .....40

Figura 4. Fixação dos eletrodos com fita curativa hipoalergênica em região abdominal. .....41

Figura 5. Imagens histológicas das lâminas coradas com hematoxilina de Harris ..49

Gráfico 1. Crescimento tumoral ao longo do tempo. .....47

Gráfico 2. Porcentagem de área de necrose em tecido neoplástico viável por grupo .....48

# Resumo

Caffaro LAM. *Influência da estimulação elétrica nervosa transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da TENS no crescimento do tumor e área de necrose no tecido viável do carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos. 22 camundongos Balb/c foram dividos em três grupos e submetidos à inoculação de células 4T1 e tratados por 20 minutos durante 10 dias: grupo do placebo (GP) estimulado com a intensidade zerada; grupo de alta frequência (GAF), tratados com frequência de 100 Hertz (Hz) e o grupo de baixa frequência (GBF), com frequência de 10 Hz. Os demais parâmetros da TENS foram duração do pulso - 200 microssegundos (µs) e intensidade sensorial. A intensidade foi reajustada em 1,0 mA a cada cinco minutos nos grupos GAF e GBF para evitar a acomodação da corrente. O crescimento do tumor foi mensurado seis vezes por meio de um paquímetro digital e depois de 10 sessões de tratamento, os animais foram eutanasiados por injeção de xilazina e quetamina. Os tumores foram extirpados para análise histológica. O teste Two-way ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve um aumento no volume do tumor em todos os grupos ($p<0,001$) e não houve diferença estatisticamente significante na relação entre grupos e tempo ($p>0,05$). O One-way ANOVA mostrou que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos para área de necrose no tecido neoplásico viável ($p>0,05$). Concluiu-se que a TENS não influenciou o crescimento tumoral do carcinoma 4T1.

Descritores: camundongos; estimulação elétrica nervosa transcutânea; fisioterapia; modalidades de fisioterapia; neoplasias; neoplasias da mama.

## Abstract

Caffaro LAM. *Influence of transcutaneous electric nerve stimulation on 4T1 carcinoma in mammary gland of mice.* [dissertation]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

The aim of this study was to evaluate the influence of TENS in tumor growth and necrotic area in viable tissue of 4T1 mammary gland carcinoma in mice. 22 Balb/c mice were subjected to inoculation of 4T1 cells and were divided into 3 groups subjected to 20 minutes of treatment for 10 days: placebo group (PG) stimulated with intensity at zero; High frequency group (HFG), treated with a frequency of 100 Hertz (Hz) and Low frequency group (LFG), with 10 Hz frequency. The others TENS parameters were pulse duration - 200 microseconds (µs) and sensory intensity. The intensity was readjusted on 1.0 mA every five minutes in HFG and LFG groups to avoid the current accommodation. The tumor growth was measured by a caliper six times and after 10 treatment sessions, the animals were euthanized by injection of xylazine and ketamine. The tumors were excised for histological analysis. Two-way ANOVA for repeated measures showed that there was an increase in tumor volume in all groups ($p<0.001$) and there was no statistically significant difference in the relationship among groups and time ($p>0.05$). One-way ANOVA showed that there was no statistically difference between groups for necrotic area in viable neoplastic tissue ($p>0.05$). It was concluded that TENS did not influence the tumor growth of 4T1 carcinoma.



Descriptors: mice; transcutaneous electric nerve stimulation; physical therapy speciality; physical therapy modalities; neoplasms; breast neoplasms.

# 1. INTRODUÇÃO

Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontam que o câncer de mama é o segundo mais prevalente entre as mulheres no Brasil, permanecendo atrás apenas do câncer de pele não melanoma, representando 25% dos novos casos. Estes dados coincidem com as estatísticas sobre a prevalência mundial desta patologia. A estimativa do INCA é de 57.960 novos casos em 2016 (INCA, 2016).

Os pacientes submetidos à mastectomia podem apresentar sintomas como dor, edema, lesão nervosa periférica, parestesias, fraqueza muscular e limitações na amplitude de movimento durante o período pós-operatório. Estas alterações, se não tratadas de forma adequada, podem contribuir para o aparecimento de disfunções como linfedema e déficits funcionais do membro superior (Sagen et al., 2014; Silva et al., 2014; Loh e Musa, 2015).

Programas de reabilitação física precoce, no pós-operatório em pacientes com câncer de mama, melhoram significativamente a mobilidade da articulação glenoumeral, a qualidade de vida e geram menos dor e disfunção neste pacientes (Silva et al., 2014; Testa et al., 2014).

A dor pós-operatória pode ser um fator que interfere no início precoce da fisioterapia, por isso a necessidade de estudar recursos terapêuticos que possam contribuir para minimizar a dor pós-operatória, sem o risco de potencializar o aparecimento de tumores reincidentes.

A estimulação elétrica nervosa transcutânea é um dos recursos de eletroterapia mais utilizado na prática clínica da fisioterapia. De acordo com o trabalho de Springer et al. (2015), 88,4% dos fisioterapeutas fazem uso deste recurso, e 47,8% o usam diariamente.

Meta-análises de ensaios clínicos randomizados utilizando técnicas e dosagens apropriadas da TENS fornecem fortes evidências de que a TENS é superior à TENS placebo para tratamento da dor musculoesquelética crônica e da dor pós-operatória e, evidências moderadas sugerem que a TENS é eficaz para tratar a dor neuropática (Johnson, 2014).

A aplicação local de agentes eletrofísicos tem sido contraindicada em pacientes oncológicos. O guideline de Rennie (2011) coloca que o único recurso tido como seguro na aplicação local de tumores malignos é o gelo. Os recursos que promovem efeitos térmicos e elétricos, como o ultrassom terapêutico (UST), a diatermia por ondas curtas, bolsas térmicas quentes, corrente pulsada de alta voltagem (HVPC), estimulação elétrica nervosa neuromuscular (NMES) e a estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) são contraindicados em aplicação local.

A racionalidade para a contraindicação da utilização da TENS em pacientes oncológicos se baseia nos efeitos fisiológicos relacionados a um possível aumento do fluxo sanguíneo local, devido a um aumento na liberação da Substância P (SP), do Peptídeo Relacionado ao Gene Calcitonina (CGRP) (Machado et al., 2012) e da estimulação da angiogênese mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Liebano e Machado, 2014). Estes efeitos poderiam aumentar a vascularização e consequente nutrição do tumor, o que estimula a proliferação de células malignas e, consequentemente, favorece o crescimento tumoral e promove metástases.

A utilização da TENS no tratamento de pacientes com neoplasias é mais frequente no manejo da dor (Robb et al., 2009; Searle et al., 2009; Bennett et al., 2010), como o tratamento da dor óssea oncológica (Searle et al., 2009), da dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (Smith et al., 2010) e na redução do uso de morfina de longa duração (Fiorelli et al., 2012), embora existam outras aplicações clínicas, como o controle de náusea e vômito pós-quimioterapia (Chao et al., 2009; Tonezzer et al., 2012).

Robb et al. (2009) em revisão sistemática apontam para a necessidade de estudos mais robustos para comprovar o efeito da TENS sobre a dor oncológica. Estes estudos, no entanto, devem ser precedidos de estudos em animais para verificar a segurança da utilização deste recurso terapêutico relacionado à estimulação ou não do crescimento do tumor.

Laakso e Young (2010) sugerem que enquanto não houver pesquisas que comprovem a segurança do uso da TENS em pacientes oncológicos, a aplicação deste recurso deve ser limitada ao controle de sintomas em estágios paliativos da doença.

Assim sendo, é necessária a realização de estudos pré-clínicos sobre a segurança da utilização da TENS em tumores.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 Câncer

O câncer é uma doença multifatorial que representa uma das principais causas de morte em todo o mundo (Tsai et al., 2014). É o resultado do acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas, que causam aumento da taxa de proliferação e de dano celular que, consequentemente, alteram o sistema de regulação do crescimento e morte celular, o que contribui para o início da carcinogênese (Viera et al., 2008; Tsai et al., 2014).

O câncer está relacionado com o processo de invasão e de migração celular, que podem causar metástase, sendo este o motivo da maior parte das mortes por câncer. As etapas que levam ao surgimento de metástases são: soltura de células malignas do tumor primário, invasão do tecido adjacente, invasão em vasos linfáticos ou sanguíneos, disseminação no sistema linfático ou na corrente sanguínea e extravasamento e crescimento em um sítio secundário (Bozzuto et al., 2010).

### 2.1.1 Microambiente tumoral (TME)

Stephen Paget, em 1989, após examinar dados *postmortem* de 735 mulheres com câncer de mama, notou que a distribuição de metástases não era aleatória e que o tumor tinha predileção para o desenvolvimento de metástases em sítios específicos. A partir desta observação Paget propôs a teoria de *seed and soil* (semente e fertilidade), que sugere que um ambiente “fértil” é essencial para o desenvolvimento de “sementes”, sendo esta uma

analogia ao microambiente tumoral (TME) e às células tumorais, respectivamente (Paget, 1889; Langley e Fidler, 2011).

A teoria de Paget de *seed and soil* não é universalmente aceita. Alguns pesquisadores atribuem que o principal fator que determina o padrão metastático de um tumor é a anatomia vascular e a drenagem linfática do tumor primário. Existem inúmeras evidências que corroboram com esta preposição em relação a fatores anatômicos e mecânicos, porém, estas hipóteses não são mutuamente excludentes (Langley e Fidler, 2011).

O câncer tem sido abordado, atualmente, como um microambiente, em que células normais, como fibroblastos, células imunes e endoteliais, interagem com vasos sanguíneos, células geneticamente alteradas e substâncias produzidas neste microambiente ou advindas da circulação sanguínea. A presença e participação de células não cancerígenas nos processos de progressão tumoral, sendo estes a proliferação celular, a angiogênese e a metástase, mostram que o tumor deve ser visto como um tecido e que não deve estar limitado apenas às células cancerígenas, uma vez que é resultado de uma série de fatores (hábito alimentar, estresse ambiental) associados à contribuição de células mal controladas (Onuchic e Chammas, 2010; Tsai et al., 2014).

#### 2.1.1.1 Imunidade e câncer

A influência de células não cancerígenas do infiltrado inflamatório no desenvolvimento tumoral indica que este está inserido em um

macroambiente, ou seja, o organismo do indivíduo, no qual as células imunes migram até o tumor e passam a ser um componente de seu estroma, tendo influência em seu curso (Onuchic e Chammas, 2010).

Respostas inadequadas do sistema imune associadas a mutações carcinogênicas são o começo para a progressão e invasão cancerígena. As células mutantes, que representam uma malignidade, providas de um ambiente propício para seu devenvolvimento contribuem para o desenvolvimento da habilidade de invasão (Tsai et al., 2014).

A formação tumoral dificilmente ocorre por conta de uma mutação genética isolada, de forma geral, são necessárias entre duas e seis mutações (ou mais), que vão afetar de forma progressiva os mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular. Nos tecidos tumorais ocorre um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, o que acarreta em aumento da população e do tamanho do tumor (Onuchic e Chammas, 2010).

Importante destacar que nem todas as células do tumor estão em atividade proliferativa e que aquelas que estão se replicando (*growth fraction*) não representam por si só o crescimento tumoral. A taxa de crescimento do tumor compreende a proliferação, a morte (apoptose e necrose) e a perda celular (metástase e disseminação local) (Onuchic e Chammas, 2010).

Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram que para a transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena devem ocorrer seis alterações fundamentais na fisiologia celular, sendo estas: auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento,

potencial replicativo ilimitado, evasão da apoptose, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase.

#### 2.1.1.2 Imunoedição

O sistema imune além de eliminar células tumorais também pode atuar na seleção ou edição de tumores emergentes; este fenômeno é conhecido como imunoedição ou edição imunológica. Os autores Dunn e Schreiber propuseram três fases que compõem a imunoedição, chamadas de três “Es”: eliminação, equilíbrio e escape (Onuchic e Chammas, 2010).

A primeira consiste no reconhecimento e eliminação de células malignas ou pré-malignas pelo sistema imunológico, que corresponde à teoria de vigilância imunológica. A fase seguinte representa um equilíbrio dinâmico que pode ter duração de anos; nesta fase, o sistema imune consegue controlar as células tumorais, porém, não consegue eliminá-las por completo (Onuchic e Chammas, 2010).

Estas duas fases acarretam em uma seleção de células neoplásicas instáveis que são continuamente sujeitas à mutação e, como resultado, ocorre uma “seleção natural” de células tumorais, em que aquelas que são mais resistentes à atuação do sistema imunológico sobrevivem, replicam-se e acabam por formar uma nova população clonal do tumor. Este processo é conhecido como imunosseleção (Onuchic e Chammas, 2010).

Os clones tumorais resistentes ao conseguirem crescer independente da atuação do sistema imunológico normal e competente; assim é atingida a

terceira fase, na qual as células neoplásicas escapam do até então controle imunológico da fase de equilíbrio (Onuchic e Chammas, 2010).

Estas células malignas não só se esquivam do sistema imune como também utilizam o infiltrado inflamatório tumoral para seu desenvolvimento, este processo é conhecido como cooptação e subversão do sistema imune (Onuchic e Chammas, 2010).

#### 2.1.1.3 Inflamação crônica, cooptação e progressão tumoral

A inflamação crônica, assim como os mediadores inflamatórios, é de grande importância para a carcinogênese, o desenvolvimento tumoral e a metástase. Estes mediadores podem ser produzidos de forma intrínseca, a partir de alterações genéticas das células neoplásicas, ou de forma extrínseca, advindos de células do infiltrado tumoral, principalmente de células imunes (Onuchic e Chammas, 2010; Tsai et al., 2014)

A relação entre a inflamação crônica e a carcinogênese foi observada pela primeira vez por Virchow em 1898. As principais explicações para a influência da inflamação crônica no aparecimento e desenvolvimento de tumores são: a regeneração tecidual contínua em decorrência da resposta inflamatória, o que leva à maior probabilidade de ocorrência de mutações e consequente proliferação destas células; a criação de uma região mutagênica local, por meio da produção de células reativas ao oxigênio e ao nitrogênio por células imunes recrutadas; e a angiogênese, que tem um

papel fundamental para o desenvolvimento de tumores (Onuchic e Chammas, 2010; Tsai et al., 2014).

A interação entre células tumorais e células inflamatórias promove um ambiente propício para a progressão do tumor. A proliferação celular tumoral gera hipóxia e necrose, o que promove o recrutamento de células imunes (Lorusso e Rüegg, 2008).

Células imunes que compõe o microambiente tumoral, ao sofrerem a cooptação por células tumorgênicas, contribuem para a limpeza tecidual, a angiogênse e a proliferação celular. Este processo foi dividido em três etapas, sendo estas: o recrutamento de células imunes (interleucina-8 (IL-8) e monócitos-1 (MCP-1)) por meio da produção de citocinas (proteína quimiotática); a cooptação, a partir da secreção de citoninas que regulam a diferenciação de células imunes de tal forma que promovem o desenvolvimento tumoral, tais como interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF); e a resposta imune, em que as células imunes já diferenciadas geram hormônios, fatores de crescimento e citocinas, que promovem o desenvolvimento tumoral e a tolerância deste ao sistema imune (Onuchic e Chammas, 2010).

Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são relacionados a um mau prognóstico, e suas atividades são usualmente pró-tumorgênicas. Os TAM auxiliam na migração celular, invasão e em metástases a partir da liberação de fatores de crescimento relacionados à angiogênese, e perpetuam a inflamação (Lorusso e Rüegg, 2008; Balkwill et al., 2012).

### 2.1.2 Vascularização tumoral e progressão tumoral

Os vasos saguíneos tumorais têm características anormais quando comparados com vasos sanguíneos de tecidos saudáveis. Os vasos da vascularização tumoral têm grande variabilidade no tamanho de seus poros, são mais dilatados, imaturos, têm maior permeabilidade (o que gera hemorragias), formatos irregulares, tortuosos, possuem grande quantidade de “fins cegos” (o que causa estase), e não têm organização hierárquica entre vênulas, arteríolas e capilares sanguíneos (o que acarreta em fluxo sanguíneo desordenado) (Carmeliet, 2005; Moreira et al., 2007). Estas características são relacionadas ao fato destes vasos sanguíneos serem produzidos pela estimulação de VEGF (Moreira et al., 2007).

#### 2.1.2.1 Fase avascular e troca angiogênica

Tumores são tidos como inativos durante a fase avascular, na qual são de fenótipo avasular e são nutridos por difusão. Neste período existe um equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose. Estes tumores aumentam de volume até chegar em 1-2 $mm^3$ sem suporte vascular (ou quando possuem aproximadamento $10^6$ de células malignas), ou segundo Hoeben et al. (2004), até aproximadamente 2-3 $mm^3$ de volume (Hoeben et al., 2004; Carmeliet, 2005).

Esta fase é seguida pelo fenômeno conhecido como troca angiogênica, em que o tumor, que inicialmente era de fenótipo avascular, passa a ser de

fenótipo vascular. Isto ocorre por conta do desbalanço entre fatores estimuladores e inibidores (Hoeben et al., 2004; Carmeliet, 2005).

#### 2.1.2.2 Fase vascular

A fase vascular, na qual o VEGF tem papel importante como mediador da angiogênese tumoral, dá início a uma série de eventos que, a partir da formação de capilares sanguíneos, fornece aos tumores acesso ao oxigênio e aos nutrientes e, portanto ocorre o aumento do volume tumoral e de consequentes metástases (Hoeben et al., 2004; Carmeliet, 2005).

A expressão do gene VEGF é regulada por inúmeros fatores, como os fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento transformador-β (TGF-β) e interleucina-1 (IL-1)). Outro importante fator na indução de VEGF é a hipóxia, que parece ser obíqua (onipresente) durante o processo de crescimento tumoral (Carmeliet, 2005).

A relação entre a hipóxia, o VEGF e o crescimento tumoral pode exemplificada da seguinte forma: o tumor cresce durante a fase avascular; o crescimento tumoral aumenta a distância entre partes do tumor e os vasos saguíneos; este evento causa hipóxia, assim não ocorre a degradação do fator-1α induzido por hipóxia (HIF-1α), o que permite a dimerização e ligação com o promotor do gene VEGF, que estimula a produção de VEGF que, por sua vez, causa aumento da permeabilidade vascular e da angiogênese.

Desta forma, o tumor torna-se de fenótipo vascular e, a partir da vascularização tumoral, recebe oxigênio e nutrientes para crescer e metastizar (Carmeliet, 2005).

Como resultado de uma desorganização da arquitetura da vascularização tumoral, podem aparecer áreas de hipóxia, o que estimula a liberação de VEGF e perpetua a desorganização vascular; o que leva a um ciclo de hipóxia, liberação de VEGF e neovascularização tumoral (Carmeliet, 2005).

Estudos sugerem que determinadas linhas de células tumorais podem expressar VEGF e receptores de VEGF, funcionando tanto de forma autócrina quanto parácrina, o que gera um ciclo vicioso que afeta diretamente as células tumorais (Carmeliet, 2005).

### 2.1.3 Câncer de mama

É o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, respondendo por cerca de 25% dos casos novos a cada ano. A estimativa de novos casos de câncer de mama no Brasil para o ano de 2016 é de 57.960 (INCA, 2015).

Fatores como doença benigna prévia, idade, genética, histórico familiar, obesidade, dieta, inatividade física, álcool e fatores endócrinos estão associados à patogênese deste tipo de câncer (Abdulkareem, 2013).

Apenas 5% dos casos de câncer de mama são relacionados a mutações específicas, sendo estes mais comuns em indivíduos com histórico familiar. Foi observado em uma meta-análise, que 12% das mulheres com câncer de

mama tem um parente que também possui esta afecção e que 1% de todos os indivíduos com câncer de mama têm um ou mais parentes com esta doença (Abdulkareem, 2013).

É relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta idade sua incidência cresce progressivamente, em especial após os 50 anos. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (INCA, 2015).

O risco do aparecimento de câncer de mama reduz de 15 a 20% para cada ano que a menarca é postergada e, mulheres que tiverem menopausa com 55 anos de idade ou mais, têm um maior risco de desenvolverem esta afecção. Estes dados podem indicar que uma maior exposição ao estrógeno durante período reprodutivo, fatores genéticos e ambientais podem influenciar no desenvolvimento do câncer de mama (Abdulkareem, 2013).

### 2.1.4 Células 4T1

As células do carcinoma de mama 4T1 é uma de quatro subpopulações do tumor 410.4, que foi originalmente isolado de um câncer de mama espontâneo de um camundongo Balb/cfC3H por Fred Miller e colaboradores no Karmanos Cancer Institute (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 2001; DuPré et al., 2007; Tao et al., 2008; Yoshimura et al., 2013).

Seu uso tem aumentado nos últimos anos por causa da grande propensão à metástase em múltiplos e diferentes sítios, tais como, linfonodos, sangue, pulmões, fígado, cérebro e osso. As células 4T1 podem

se desenvolver quando estas são injetadas ortotopicamente no tecido subcutâneo mamário (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 2001; Tao et al., 2008; Yoshimura et al., 2013).

O carcinoma de células 4T1 se assemelha ao estágio avançado do câncer de mama em humanos, pois tem a habilidade de gerar metástases nos mesmos sítios que o câncer de mama em humanos. Assim torna-se um modelo experimental de uso recorrente uma vez que sua progressão é semelhante ao quadro clínico em humanos (Li et al., 2014; Sayers et al., 2014).

O carcinoma 4T1 tem sido utilizado, nos últimos anos, em estudos para testar a eficácia da terapia antiangiogênica e imune (Huang et al., 2002); para estabelecer o modelo experimental de carcinoma de mama em estágio mais avançado a partir de células 4T1 modificadas (Tao et al., 2008); para investigar a influência do uso de licochalcone A na migração celular, invasão, inflamação, angiogênse, crescimento tumoral e metástase (Kwon et al., 2013); e para entender processos fisiológicos relativos à metástase e ao microambiente tumoral *in vivo* a partir de imagem de bioluminescência (Takahashi et al., 2015).

## 2.2 Uso de agentes eletrofísicos sobre tumores

Os efeitos de agentes eletrofísicos em tumores ainda são pouco estudados. Foram realizados trabalhos que avaliaram a influência da eletroestimulação em tumores (Jarm et al., 2003; Janigro et al., 2006; Linkov

et al., 2012), da terapia por laser de baixa intensidade (LLLT) em melanomas (Frigo et al., 2009) e em carcinoma espinocelular (Monteiro et al., 2011); da associação de LLLT e UST na mediação de um agente anticancerígeno (cloro e6 (Ce6)) no tratamento do carcinoma 4T1 (Wang et al., 2015); do uso do UST em rabdomiosarcoma (Sicard-Rosenbaum et al., 1995; 1998); do uso associado do UST com agentes anticancerígenos (Duvshani-Eshet et al., 2007; Todorova et al., 2012); e também foi estudado o mecanismo de ação do UST na melhora do aporte de quimioterápicos (Watson et al., 2012).

### 2.2.1 Efeitos de correntes elétricas sobre tumores e células cancerígenas

Jarm et al. (2003) realizaram um tratamento com corrente direta com 0.6 mA durante uma hora de tratamento em dois modelos de tumores diferentes. O primeiro foi o fibrosarcoma Sa-1 em camundongos A/J em uma concentração de $5x10^5$; o segundo foi o fibrosarcoma LPB a $1x10^6$ em camundongos C57B1. As células tumorais foram inoculadas subcutaneamente na lateral do tronco dos animais e estes foram tratados com os eletrodos inseridos subcutaneamente em lados opostos dos tumores. Foi estabelecido que os tumores deveriam ter um volume entre 50 e 100 $mm^3$ para iniciar o tratamento. Foi utilizada a seguinte fórmula para se calcular o volume da elipse: $V = AxBxCx\pi/6$, onde V é o volume e A, B e C são diâmetros ortogonais. Foi concluído que a corrente direta de baixa intensidade diminuiu severamente o fluxo sanguíneo e a perfusão destes

tumores por conta da oclusão ou lesão de vasos na região em que os eletrodos foram inseridos, o que acarretou em diminuição da oxigenação dos tumores.

Janigro et al. (2006) concluíram que a corrente alternada de 50 Hz de frequência, 7,5 µA, administrada por três dias, aumentou a eficiência da quimioterapia em tumores malignos que apresentam gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1); os autores realizaram as avaliações de *Western blot* e flurescência, que mostraram que a corrente alternada diminuiu a expressão de MDR1 e alterou sua distribuição celular da membrana plasmática ao citoplasma, o que contribuiu para a perda da capacidade de extrusão da droga e aumentou a quimiossensibilidade.

Linkov et al. (2012) realizaram um trabalho em que camundongos C3H nudes fêmeas (n=7) foram inoculados com células de carcinoma espinocelular na lateral do tronco e foram tratados por oito dias não consecutivos com NMES, com 80 Hz de frequência e duração de pulso de 700 µs, com intensidade de 1,0 mA e contração muscular visível por 30 minutos. Foram realizadas as análises imunohistoquímica de apoptose, proliferação, vascularização e ainda, os tumores foram medidos com um paquímetro. Estas mensurações foram realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 a partir da fórmula: Volume = ½ (altura x largura$^2$). O tratamento foi iniciado no quarto dia pós inoculação de $1x10^7$ de células SCC7. Foi concluído que a NMES não influenciou no crescimento tumoral em nenhuma das análises realizadas.

## 2.3 Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS)

A TENS foi introduzida na literatura por Wall e Sweet em 1967 e, desde então, tem sido estudada por inúmeros pesquisadores (Sluka et al., 2013). A estimulação elétrica nervosa transcutânea é um dos recursos de eletroterapia mais utilizados na prática clínica da fisioterapia. De acordo com o trabalho de Springer et al. (2015), 88,4% dos fisioterapeutas fazem uso deste recurso, e 47,8% a usam diariamente.

TENS é uma corrente elétrica, que é aplicada diretamente na epiderme, com uma variedade de modalidades e diferentes parâmetros, tais como, frequência, largura de pulso e intensidade com o objetivo de diminuir diversos tipos de dor, tanto aguda quanto crônica (Nnoaham e Kumbang, 2008; Fang et al., 2013).

TENS é, por definição, qualquer corrente elétrica que tem a capacidade de atravessar a pele sadia e estimular nervos localizados abaixo desta. Trata-se de uma corrente bifásica pulsada com largura de pulso que varia de 50 a 250 µs e frequência entre 1 e 200 Hz (Jones e Johnson, 2009).

### 2.3.1 Modalidades

A parametrização empregada durante a aplicação da TENS influencia na fibra nervosa estimulada e, consequentemente, no efeito terapêutico (Jones e Johnson, 2009).

#### 2.3.1.1 TENS convencional

É a TENS de alta frequência (50-100 Hz), largura de pulso pequena (50-200 µs), baixa intensidade (parestesia, nível sensorial), estimula fibras aferentes de grande diâmetro de limiar baixo (A-β). Estes parâmetros associados ao aumento da intensidade da corrente, ainda em nível sensorial, promovem a inibição da transmissão nociceptiva neuronal no sistema nervoso central. Os eletrodos devem ser posicionados sobre a região dolorosa (Johnson, 2009).

#### 2.3.1.2 TENS acupuntura

É a TENS de baixa frequência (2-4 Hz), grande largura de pulso (100-400 µs) e de alta intensidade (o máximo tolerável pelo paciente). Geralmente é utilizada quando os pacientes não respondem ao tratamento com TENS convencional. O uso desta parametrização visa estimular fibras aferentes de pequeno diâmetro e alto limiar (A-Δ), para ativar vias descendentes inibitórias de dor. É uma estimulação não dolorosa que promove contrações musculares; os eletrodos devem ser posicionados sobre miótomos, pontos gatilho ou pontos de acupuntura (Johnson, 2009).

#### 2.3.1.3 TENS intenso

É realizada com frequências altas (até 200 Hz), intensidade alta (o máximo tolerado pelo paciente, estimulação dolorosa) por pouco tempo de aplicação. Esta modalidade estimula fibras aferentes de pequeno diâmetro e alto limiar (A-Δ), a fim de bloquear a transmissão da informação nociceptiva nos nervos periféricos e ativar mecanismos analgésicos extrassegmentares (Johnson, 2009).

### 2.3.2 Efeitos vasculares da TENS e dosimetria

Autores têm reportado diferentes efeitos vasculares na aplicação da TENS ao longo dos anos (Owens et al., 1979; Abram et al., 1980; Casale, 1985; Indergrand e Morgan, 1994; Scudds et al., 1995; Cramp et al., 2000; 2002; Sherry et al., 2001; Liebano et al., 2006; 2008; Chen et al., 2007).

Estudos têm evidenciado aumento de temperatura e/ou do fluxo sanguíneo em humanos submetidos à aplicação de TENS (Owens et al., 1979; Abram et al., 1980; Scudds et al., 1995; Cramp et al., 2000; 2002; Sherry et al., 2001). Trabalhos mostram que a TENS tem influência na reparação tecidual (Liebano et al., 2006; 2008; Machado et al., 2012).

#### 2.3.2.1 Influência da TENS no fluxo sanguíneo e temperatura

Em alguns trabalhos com humanos foi evidenciado o aumento de temperatura sob determinadas condições. Owens et al. (1979) relatam que a aplicação da TENS com 75 +/- 25 Hz e largura de pulso de 100 µs sobre

nervo ulnar de voluntários saudáveis aumentou a temperatura nas mãos dos participantes; porém, não foram fornecidas maiores informações sobre a aplicação. Abram et al. (1980) mostram em seus resultados que a TENS, com uma intensidade abaixo do nível doloroso ou motor e frequência entre 75 e 100 Hz, causou um aumento de temperatura apenas nos voluntários que obtiveram analgesia (foram incluídos neste estudo apenas voluntários com dores de origem não maligna), não foram especificados outros parâmetros.

Scudds et al. (1995) aplicaram TENS na mão de mulheres saudáveis por 30 minutos. No grupo controle, a unidade de TENS não foi ligada; no grupo de alta frequência, o tratamento foi com TENS de 100 Hz, largura de pulso de 250 µs e intensidade sensorial; e no grupo de baixa frequência a TENS foi de 4 Hz, largura de pulso de 100 µs, com intensidade motora tolerável. Os autores concluem que todos os grupos estudados tiveram queda de temperatura local; porém, apenas o grupo de frequência baixa teve temperatura local estatisticamente significante superior aos demais e, em nenhum dos grupos foi evidenciado aumento de temperatura distal (quirodáctilos).

Cramp et al. (2000) aplicaram TENS com largura de pulso de 200 µs por 15 minutos em nervo mediano de humanos saudáveis. Os voluntários foram divididos em três grupos, que foram dispostos da seguinte maneira: TENS de 4 Hz, TENS de 100 Hz e TENS placebo. Para os grupos com as unidades de TENS ligadas, a intensidade utilizada foi descrita como “forte, mas confortável”, o que não deixa claro se foi utilizada em nível sensorial, motor

ou ambos. Os autores concluem que apenas o grupo de baixa frequência obteve aumento de fluxo sanguíneo local e que não houve alteração de temperatura em nenhum grupo de estudo.

A pesquisa de Sherry et al. (2001) com TENS burst de 2 Hz, frequência portadora de 85 Hz, largura de pulso de 250 µs e tempo de aplicação de cinco minutos, gerou aumento de fluxo sanguíneo local após a aplicação nos nervos fibular e tibial apenas quando aplicado com uma intensidade motora com um acréscimo de 25% da amperagem imediatamente acima do nível motor; os grupos de intensidade sensorial e intensidade imediatamente acima do nível motor não tiveram aumento de temperatura estatisticamente significante.

No trabalho de Cramp et al. (2002) também foi evidenciado aumento de fluxo sanguíneo local estatisticamente significante após a aplicação de TENS em nervo mediano com 200 µs, 4 Hz, durante 15 minutos com intensidade motora. Os grupos de intensidade imediatamente abaixo do limiar motor e de TENS percepção (intensidade mantida imediatamente acima do nível sensorial) não tiveram aumento de fluxo sanguíneo local. Em nenhum dos grupos estudados houve aumento de fluxo sanguíneo distal, temperatura local ou distal.

Por outro lado, existem autores que relatam diminuição de temperatura e/ou fluxo sanguíneo após a aplicação de TENS em indivíduos saudáveis (Casale, 1985; Indergrand e Morgan, 1994; Chen et al., 2007).

Casale (1985) relata diminuição de temperatura e fluxo sanguíneo em indivíduos tratados com a TENS com uma frequência de 120 Hz, quando

esta é aplicada em nervo mediano. Indergrand e Morgan (1994) relatam diminuição da temperatura do pé de indivíduos saudáveis, porém, sem alterações de fluxo sanguíneo após a aplicação de TENS com frequência de 110 Hz, largura de pulso de 150 µs, intensidade sensorial e motora por 20 minutos sobre nervo tibial e fibular. Os autores não atribuem esta diminuição da temperatura à aplicação da TENS, uma vez que a diminuição ocorreu depois de dez minutos de aplicação e permaneceu mesmo após o seu término da aplicação, sendo que o tempo necessário de estimulação de nervo simpático para que ocorra uma vasoconstrição é inferior a dez segundos (Indergrand e Morgan, 1994).

Chen et al. (2007) aplicaram TENS de 4 e 110 Hz, largura de pulso de 200 µs, com intensidade sensorial por 15 minutos sobre o nervo mediano de indivíduos saudáveis após um pré-aquecimento com infravermelho por 15 minutos. Os resultados mostram que houve diminuição do fluxo sanguíneo local nos grupos tratados e no grupo controle sem diferenças estatísticamente significantes entre si. Os autores desconhecem a razão para estas pequenas alterações vasculares e dizem que estas podem não ser reproduzidas e, ainda, podem ser fisiologicamente irrelevantes na prática clínica.

Segundo Reeves et al. (2004), as diferenças metodológicas entre estudos que avaliam os efeitos vasculares relacionados à TENS limitam as comparações entre estes, o que pode ser o motivo da existência de resultados conflitantes.

### 2.3.2.2 Influência da TENS na reparação tecidual

Liebano et al. (2006) relatam que apenas o grupo tratado com TENS, a 80 Hz com intensidade de 15 mA, que produziu leves contrações musculares, promoveu área de necrose menor e viabilidade de retalho cutâneo em ratos. Os grupos com intensidades de 5, 10 e 20 mA não tiveram melhora em relação ao grupo placebo. Estes resultados são semelhantes aos de Liebano et al. (2008), que trataram grupos de ratos com as mesmas intensidades, porém, com frequência de 2 Hz; e o grupo de 15 mA também foi o único que teve área de necrose menor estatisticamente significante em relação ao grupo placebo.

O trabalho de Bevilacqua et al. (2007) mostrou que a TENS não promoveu aumento do VEGF tanto em individuos saudáveis, quanto em individuos com diabetes tipo 2. Foi aplicada TENS por 10 minutos na face anterior do antebraço dos voluntários e, após um intervalo de 30 minutos, foi realizada a estimulação elétrica de frequência modulada (FREMS). Foram realizadas análises de VEGF a partir da coleta do sangue dos pacientes no antebraço contralateral antes da aplicação da TENS, durante o intervalo entre as eletroestimulações e após a aplicação de FREMS.

Foi observado aumento do VEGF no plasma sanguíneo em resposta à FREMS. Os autores relatam que a FREMS pode ter efeitos positivos na microangiopatia diabética, por conta de possível influência da FREMS na velocidade da condução nervosa. O estudo de Bevilacqua et al. (2007) não é um trabalho do tipo *crossover*, pois a ordem de aplicação foi fixa e não

randomizada. Os parâmetros da TENS não foram descritos e, de acordo com Liebano e Machado (2014), a liberação de VEGF com correntes elétricas terapêuticas deve ser parâmetro dependente. A estrutura do trabalho de Bevilacqua et al. (2007), associada à falta de uma parametrização adequada (Sluka et al., 2013) geram um importante viés e ainda dificultam a comparação com outros estudos.

Machado et al. (2012), abordaram os efeitos da TENS na reparação tecidual. Foram encontrados estudos em que os autores aplicaram a TENS em úlceras de pressão, úlceras diabéticas, úlceras leprosas crônicas, úlceras venosas crônicas e na reparação tecidual de coto terminal de membro inferior. Os parâmetros utilizados foram: frequência de 2 Hz, 80 Hz e 100 Hz; intensidade motora de 0 mA a 70 mA em voluntários com neropatia diabética, 10 mA a 15 mA em pacientes com bolhas e, 20 mA a 45 mA para a reparação tecidual de úlceras venosas crônicas; o tempo de aplicação variou de um minuto, 20 minutos e duas horas. Em todos os estudos abordados por Machado et al. (2012), a TENS promoveu uma melhora na reparação tecidual.

### 2.3.3 Mecanismos de ação da TENS sobre a vascularização

Autores têm estudado a influência da TENS no sistema nervoso autônomo simpático (Ebersold et al., 1977; Reeves et al., 2004) e pesquisadores, que avaliam alterações em temperatura e fluxo sanguíneo em voluntários submetidos à aplicação da TENS, têm justificado a inibição

ou a estimulação do sistema nervoso autônomo simpático como possível mecanismo para aumento ou diminuição de fluxo sanguíneo e temperatura respectivamente (Abraam et al., 1976; Owens et al., 1979; Abram et al., 1980, Cramp et al., 2000); porém, estes mecanismos não foram comprovados.

Por outro lado, pesquisadores relatam que a TENS não tem influência sobre o sistema nervoso autônomo simpático, uma vez que este foi avaliado indiretamente a partir da frequência cardíaca, conductibilidade da pele, pressão arterial, temperatura da pele e tamanho das pupilas de voluntários submetidos à TENS (Ebersold et al., 1977; Reeves et al., 2004).

Reeves et al. (2004) avaliaram a resposta do sistema nervoso autônomo simpático, a partir da frequência cardíaca e conductibilidade da pele (atividade sudomotora), com aplicação de TENS na mão de individuos saudáveis por 20 minutos. Os grupos foram dispostos da seguinte maneira: TENS de 4 Hz, largura de pulso de 250 µs, intensidade sensorial; TENS de 100 Hz, com largura de pulso de 250 µs, intensidade motora e, TENS placebo (sem bateria). Os autores concluem que a TENS não influenciou nas respostas estudadas.

Alguns pesquisadores que avaliaram o fluxo sanguíneo e/ou temperatura em voluntários submetidos à TENS descartam a hipótese do mecanismo relacionado ao sistema nervoso autônomo simpático (Indergrand e Morgan, 1994; Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2002; Chen et al., 2007).

Indergrand e Morgan (1994) sugerem que a diminuição de fluxo sanguíneo (não estatisticamente significante) em tríceps sural em pacientes

submetidos à TENS pode ter ocorrido devido à vasoconstrição produzida pela exposição a um ambiente que não é termicamente neutro; mesmo estes autores tendo descrito o ambiente de aplicação como um quarto com 24º +/- 1°C de temperatura.

Scudds et al. (1995) atribuem a queda de temperatura da pele dos participantes pela relação entre esta e o ambiente local, assim como a ausência de contração muscular voluntária, o que diminui o fluxo sanguíneo da mão e dos quirodáctilos e, consequentemente diminui a temperatura da pele. Os autores relatam que a TENS de baixa frequência pode ter aumentado o fluxo sanguíneo nos músculos estimulados e, consequentemente a temperatura local. Os autores também atribuem a maior temperatura local no grupo de baixa frequência a uma série de fatores: o fato de neste grupo ter sido utilizada uma intensidade superior ao grupo de alta frequência, de tal forma que gerasse uma estimulação desconfortável, o que causou uma resposta axonal reflexa na área que os eletrodos foram postos, a partir da estimulação de fibras aferentes C e, também, por este grupo ter, possivelmente, produzido uma inibição segmental do sistema nervoso autônomo simpático.

Sherry et al. (2001) relatam que não foi observada alteração na resistência vascular do tríceps sural dos voluntários submetidos à TENS, e que foi observado aumento do fluxo sanguíneo. Segundo os autores, este aumento pode ocorrer por conta do *muscle pump action*, que representa o acúmulo de substâncias vasodilatadoras locais e vasodilatação induzida por fatores relaxantes advindos do endotélio. Cramp et al. (2002) também

mencionam o mecanismo de *muscle pump action* para justificar o aumento de fluxo sanguíneo local em humanos submetidos à TENS em intensidade motora e, também teorizam que este aumento pode ter ocorrido pela maior demanda metabólica muscular.

Khalil et al. (2001) mostraram em seus resultados que a TENS de frequência de 5 Hz liberou peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) e em uma frequência de 15 Hz substância P (SP), após aplicação em nervo isquiático, estes neuropeptídeos são fortes vasodilatadores e têm sido associados ao aumento do fluxo sanguíneo local e modulação da reparação tecidual (Machado et al., 2012). Este mecanismo de ação da TENS na vascularização local é o mais bem aceito por pesquisadores (Liebano et al., 2006), porém, segundo Cramp et al. (2000), são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação da TENS em relação aos efeitos vasculares.

### 2.3.4 TENS em pacientes oncológicos

A TENS tem sido utilizada no manejo da sintomatologia de diversos quadros clínicos provocados por diferentes tipos de cânceres (Robb KA et al., 2007; Searle et al., 2009; Bennett et al., 2010; Fiorelli et al., 2012; Tonezzer et al., 2012; Sampaio et al., 2016).

Robb et al. (2007) compararam o tratamento de TENS com eletroanalgesia transcutânea espinal (TSE) e tratamento placebo em pacientes com histórico de dor crônica relacionada ao câncer de mama por pelo menos seis meses. Foi utilizada a técnica de ponto doloroso com

intensidade sensorial, modo convencional contínuo, com uma frequência alta e intensidade baixa por três semanas; porém, os pacientes poderiam alterar parâmetros, como por exemplo a intensidade. Não foram fornecidas maiores informações sobre a parametrização. Os autores concluem que todos os grupos melhoraram o quadro de ansiedade, dor e mobilidade do membro ipsilateral, não havendo diferença estatisticamente significante entre os tratamentos.

Searle et al. (2009) aplicaram TENS em um tumor metastizado de câncer de pulmão no úmero de uma voluntária por uma hora. O equipamento foi ajustado para emitir uma frequência de 80 Hz, largura de pulso de 200 µs, intensidade sensorial, com técnica de ponto doloroso. Foi concluído que a TENS promoveu analgesia tanto com o membro da voluntária em repouso quanto em movimento, em especial em movimento.

Bennett et al. (2010) realizaram um estudo *crossover* com pacientes que tinham dor por metástase óssea, advinda de um tumor primário, e avaliaram o efeito da TENS na dor destes voluntários. Ambos os grupos receberam o tratamento placebo e o tratamento ativo em diferentes ordens com um período de *wash out* de dois a sete dias. Os tratamentos foram aplicados por 60 minutos, e o tratamento ativo foi realizado com uma frequência de 80 Hz, largura de pulso de 200 µs, intensidade “forte, mas confortável”. Os resultados de Bennett et al. (2010) indicam que a TENS tem um bom potencial para diminuir a dor óssea oncológica ao movimento, quando esta é aplicada por 60 minutos; porém, como indicado pelos autores, a amostra

deste estudo foi inferior ao valor necessário segundo o cálculo amostral apresentado.

Fiorelli et al. (2012) aplicaram TENS com pulso assimétrico quadrado com frequência de 80 Hz, largura de pulso de 250 µs, intensidade “forte, mas confortável”, por 30 minutos até o quinto dia pós-operatório de pacientes submetidos à tocacotomia posterolateral por câncer de pulmão, chegaram à conclusão que a TENS reduziu os níveis de citocinas, promoveu analgesia, melhorou a função pulmonar e diminuiu o consumo de opióides no grupo ativo, quando comparado com o grupo placebo.

Tonezzer et al. (2012) avaliaram os efeitos da TENS em pacientes que fizeram uso de quimiotépicos (ou associação entre diferentes quimioterápicos) e possuíam um grau emetogênico de moderado a alto. Foi aplicada a TENS no ponto de acupuntura relativo ao meridiano do pericárdio, PC6 (*Niguan*), localizado sobre o nervo mediano no terço distal da face anterior do antebraço no grupo experimental e os voluntários do grupo controle não foram submetidos à aplicação da TENS. Os parâmetros utilizados foram a fraquência de 10 Hz, largura de pulso de 150 µs, com uma intensidade sensorial forte ajustada pelo sujeito por 30 minutos antes de começar o ciclo de quimioterapia, sendo esta aplicada por dois ciclos e avaliada 24 horas após estes. Foi evidenciada a redução da intensidade das náuseas e a diminuição dos episódios de náusea e vômito entre os ciclos nos pacientes do grupo experimental.

Sampaio et al. (2016) realizaram um estudo de caso único ou delineamento intrassujeitos com três voluntárias com câncer de mama e

doença óssea metastática vertebral. Todas as voluntárias foram tratadas com a TENS de alta frequência (130 Hz), seguida da TENS de baixa frequência (10 Hz) e por fim a TENS placebo. Cada tipo de TENS foi aplicada por 10 dias com largura de pulso de 130 µs, por 30 minutos de aplicação com intensidade sensorial. Os tratamentos foram intercalados com uma *baseline* de sete dias. Os autores concluiram que a TENS foi eficaz na redução do uso de fármacos analgésicos e que a TENS de baixa frequência mostrou grande eficácia ao diminuir os pontos da escala visual analógica (EVA) das participantes.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da TENS na progressão do carcinoma 4T1.

## 3.2 Objetivos específicos

Avaliar a influência da TENS com diferentes frequências sobre o crescimento tumoral do carcinoma 4T1, por meio da mensuração com paquímetro digital.

Avaliar a influência da TENS com diferentes frequências sobre a área de necrose em tecido neoplástico viável no carcinoma 4T1, por meio da análise histológica.

# 4. MÉTODOS

## 4.1 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (nº 040/15; 25/03/2015). Os animais são provenientes do Biotério Central da FMUSP, em São Paulo, e os procedimentos realizados estão de acordo com as normas éticas para experimentação animal do Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL – COBEA) e a legislação nacional atual sobre procedimentos para uso científico de animais (Lei Federal 11.794, de 9 de outubro de 2008).

## 4.2 Animais

Foram utilizados 30 camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas com 7 a 9 semanas de idade, em que já há influência dos hormônios sexuais (Chorilli et al., 2007) com 15 a 25 g de massa. Os animais ficaram em gaiolas com cinco animais cada, no Centro de Medicina Nuclear da FMUSP, e foram mantidos em ambiente controlado a 20ºC +/- 2ºC, ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais com 10 animais cada um. O número de animais necessários para alcançar significância estatística foi baseado no estudo de Eckelman et al. (2007). Os animais foram randomizados nos grupos experimentais através do site www.random.org.

## 4.3 Experimento *in vitro*: Cultura de células 4T1

As células de câncer de mama murino 4T1 foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Gibco, BRL), com pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL) e antibióticos estreptomicina e ampicilina (100 µg/mL, Sigma), em atmosfera úmida contendo 5% $CO_2$ a 37ºC. Ao atingirem de 80% a 90% de confluência celular, as células foram lavadas com uma solução de tampão de fosfato salino com ácido etilenodiamino tetra-acético (PBS/EDTA) com pH 7,2, destacadas das garrafas de cultura celular com solução de tripsina 0,2% (Sigma) e transferidas para novas garrafas.

## 4.4 Experimento *in vivo*: Inoculação das células 4T1 e análise do crescimento tumoral

As células tumorais foram inoculadas com 50 µL de uma suspensão contendo $5x10^4$ células 4T1 em meio RPMI, sem soro, subcutaneamente, na glândula mamária intermédia esquerda. Todos os grupos foram observados diariamente para verificação do aparecimento de massa tumoral.

## 4.5 Procedimentos experimentais

O tratamento com a TENS iniciou-se 12 dias após a inoculação das células, com aparecimento de tumor palpável (Favero et al., 2010), a fim de

tratar tumores com um volume superior a 3 $mm^3$, já vascularizados (Hoeben et al., 2004). Os animais foram tratados por 10 sessões de TENS com uma sessão de 20 minutos por dia com intervalo de 2 dias entre a quinta e sexta sessão a fim de reproduzir a prática clínica (Figura 1).

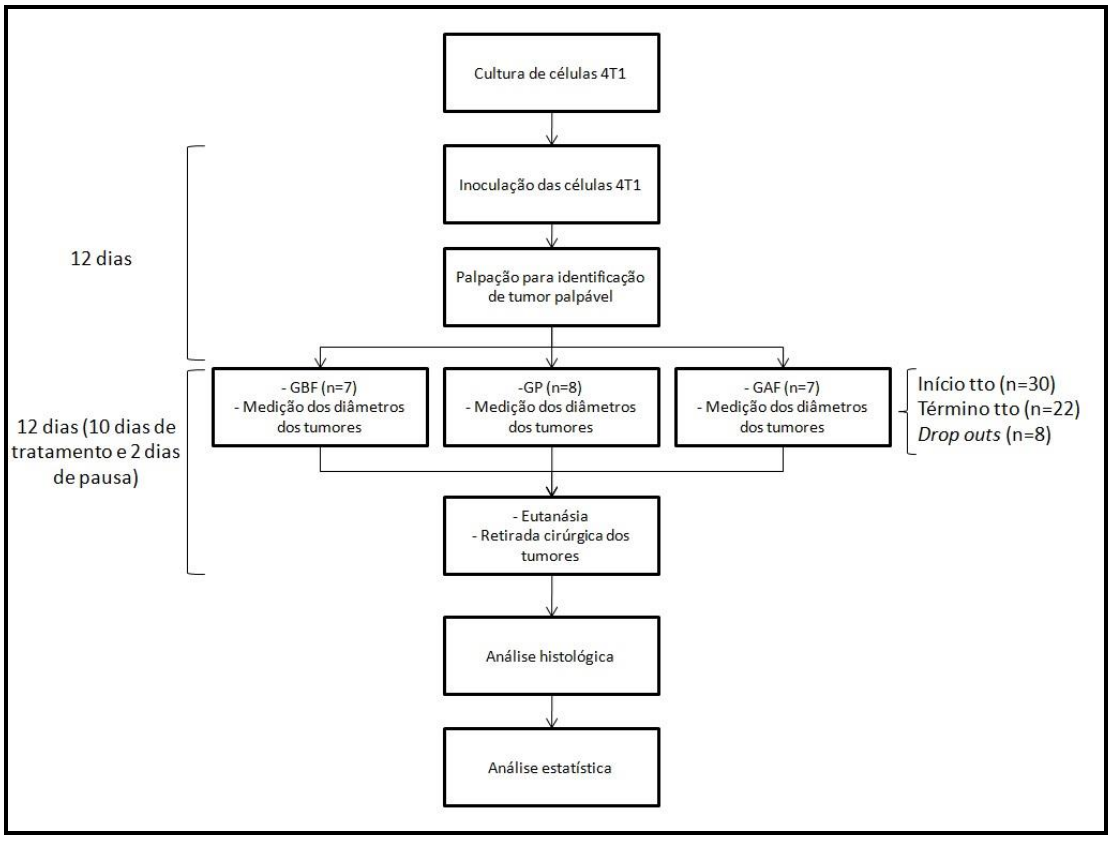


**Figura 1.** Fluxograma do protocolo de estudo. Legenda: GAF= Grupo tratado com TENS de alta frequência; GBF= Grupo tratado com TENS de baixa frequência; GP= Grupo tratado com TENS placebo; tto= Tratamento.

A realização da eletroestimulação foi efetuada sempre pelo mesmo pesquisador e durante o mesmo período do dia. Animais que apresentaram descontinuidade extensa da pele ao longo do experimento não receberam o tratamento por esta ser estabelecida como uma contraindicação local da eletroestimulação (Rennie, 2011).

A TENS foi realizada por meio do aparelho Fes VIF, modelo 995-4, número de série 07x150, desenvolvido pela QUARK produtos médicos Indústria Brasileira, previamente calibrado (Figura 2). A modalidade utilizada foi a TENS convencional com pulso bifásico simétrico.

**Figura 2.** Estimulação elétrica enquanto os animais permanecem anestesiados com isofurano a 1,5%.

Foram utilizados pares de eletrodos de borracha siliconada e carbonada, especialmente construídos para a estimulação elétrica com 1 $cm^2$ de área de superfície (Figura 3).

**Figura 3.** Eletrodo de silicone carbonado com 1 cm² de área de superfície e paquímetro digital.

Os eletrodos foram fixados com gel condutor e fita curativa hipoalergênica Micropore® (Nextcare – 3M) na região abdominal (Figura 4).

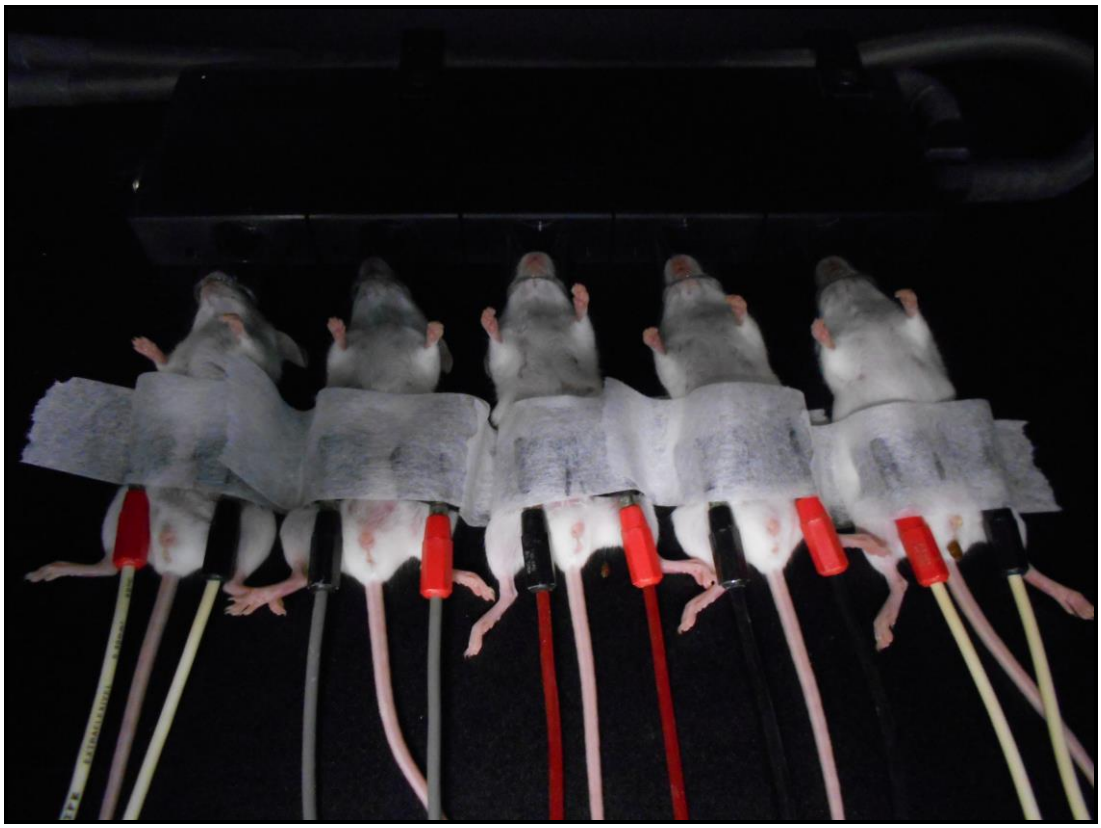

**Figura 4.** Fixação dos eletrodos com fita curativa hipoalergênica em região abdominal.

## 4.6 Protocolo experimental: Grupos de tratamento

Foi realizado um experimento prévio para determinar a intensidade que alcançasse o nível sensorial. Quatro animais foram submetidos à eletroestimulação com frequência de 100 Hz e largura de pulso de 200 µs e, a intensidade foi aumentada até ser observada contração muscular abdominal e/ou de quadril. Três animais apresentaram contração muscular com 4,0 mA. Assim, a intensidade inicial da aplicação foi fixada em 3,0 mA. Durante o tratamento, a cada cinco minutos, foi aplicado um acréscimo de 1,0 mA para não ocorrer acomodação sensorial da corrente. Caso ocorressem contrações musculares após o aumento da intensidade, manter-se-ia a intensidade anterior.

Todos os animais foram anestesiados com isoflurano a 1,5% durante a aplicação da TENS, por 20 minutos na câmara IVIS® Spectrum. Os animais foram divididos e tratados com os seguintes parâmetros:

**Grupo Placebo (GP)**: Foi tratado com a intensidade em zero mA.

**Grupo de Alta Frequência (GAF):** Foi tratado com frequência de 100 Hz, largura de pulso de 200 µs e intensidade sensorial.

**Grupo de Baixa Frequência (GBF):** Foi tratado com frequência de 10 Hz, largura de pulso de 200 µs e intensidade sensorial.

As dimensões dos tumores foram medidas por seis vezes com um paquímetro digital King Tools® e, o volume foi calculado segundo a fórmula V= 0,5235 x (eixo menor)$^2$ x eixo maior (V= representa o volume) (de Oliveira et al., 2010).

## 4.7 Eutanásia e preparação das lâminas histológicas

Os animais foram eutanasiados após o décimo dia de tratamento com quetamina + xilazina (100 mg/Kg + 10 mg/Kg) (Lapchik et al., 2010) seguido de permanência em câmara de $CO_2$. Os tumores foram extirpados e imersos em formol tamponado (3,7% em PBS) por pelo menos 18 horas, a seguir foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada para a remoção total do formol e o material foi mantido em etanol 70% até o preparo dos cortes para análise histológica.

Foram obtidos cortes de 3 µm de espessura dos tumores em parafina. Para desparafinização, as lâminas passaram por quatro banhos de xilol por 2 minutos e um banho de etanol 100% por 2 minutos. Após lavagem em

água corrente, as lâminas foram coradas por 1 minuto em hematoxilina de Harris e novamente lavadas em água corrente. As lâminas foram posteriormente incubadas em eosina alcoólica por 2 minutos e passaram por banhos de etanol 100% por 1 minuto e quatro banhos de xilol por 1 minuto. Por fim, foi realizada a montagem das lâminas com Entellan (Merck). Foi obtida uma lâmina histológica por animal. O material foi observado em microscópio de luz Nikon® e as imagens foram adquiridas utilizando a câmara digital Nikon®.

## 4.8 Análise da porcentagem de área de necrose em tecido viável

Foram tiradas 20 fotos aleatórias por lâmina da área de tecido viável de cada amostra, com aumento de 200 vezes, totalizando 440 fotos. A área de necrose destas foi analisada no Software ImageJ® 1.50i. Para se obter a porcentagem da área de necrose de tecido viável, os resultados da análise das fotos de cada lâmina foram colocados na seguinte fórmula:

$$Porcentagem\ da\ área\ de\ necrose\ de\ tecido\ viável\ (\%) = \frac{\sum_{n=20} Área\ de\ necrose\ (\mu m^2)}{Área\ total\ (\mu m^2) \times 20} \times 100$$

## 4.9 Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a homogeneidade dos dados. O teste Two-Way ANOVA de medidas repetidas foi usado para analisar o efeito da TENS de alta e baixa frequência sobre o crescimento do tumor e a relação entre os grupos estudados e, por fim, para

averiguar a relação entre a área de necrose em tecido neoplásico viável e os grupos estudados, foi utilizado o teste One-Way ANOVA. Foi adotado um nível de significância de $\alpha<0,05$ com um poder de 80% para todos os testes realizados. Todos os testes foram realizados no software SigmaPlot® 13.0 para Windows.

# 5. RESULTADOS

O teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou uma distribuição de dados normal para a análise do crescimento tumoral e da área de necrose em tecido neoplástico viável ($p<0,05$).

O teste Two-Way ANOVA de medidas repetidas revelou que houve efeito do tempo sobre o crescimento tumoral em todos os grupos estudados ($p<0,001$). Na análise sobre a interação entre tempo e os grupos estudados não houve diferenças significativas [ANOVA: $F(10,95)=0,49$; $p=0,88$; $ES=0,24$] (Gráfico 1).

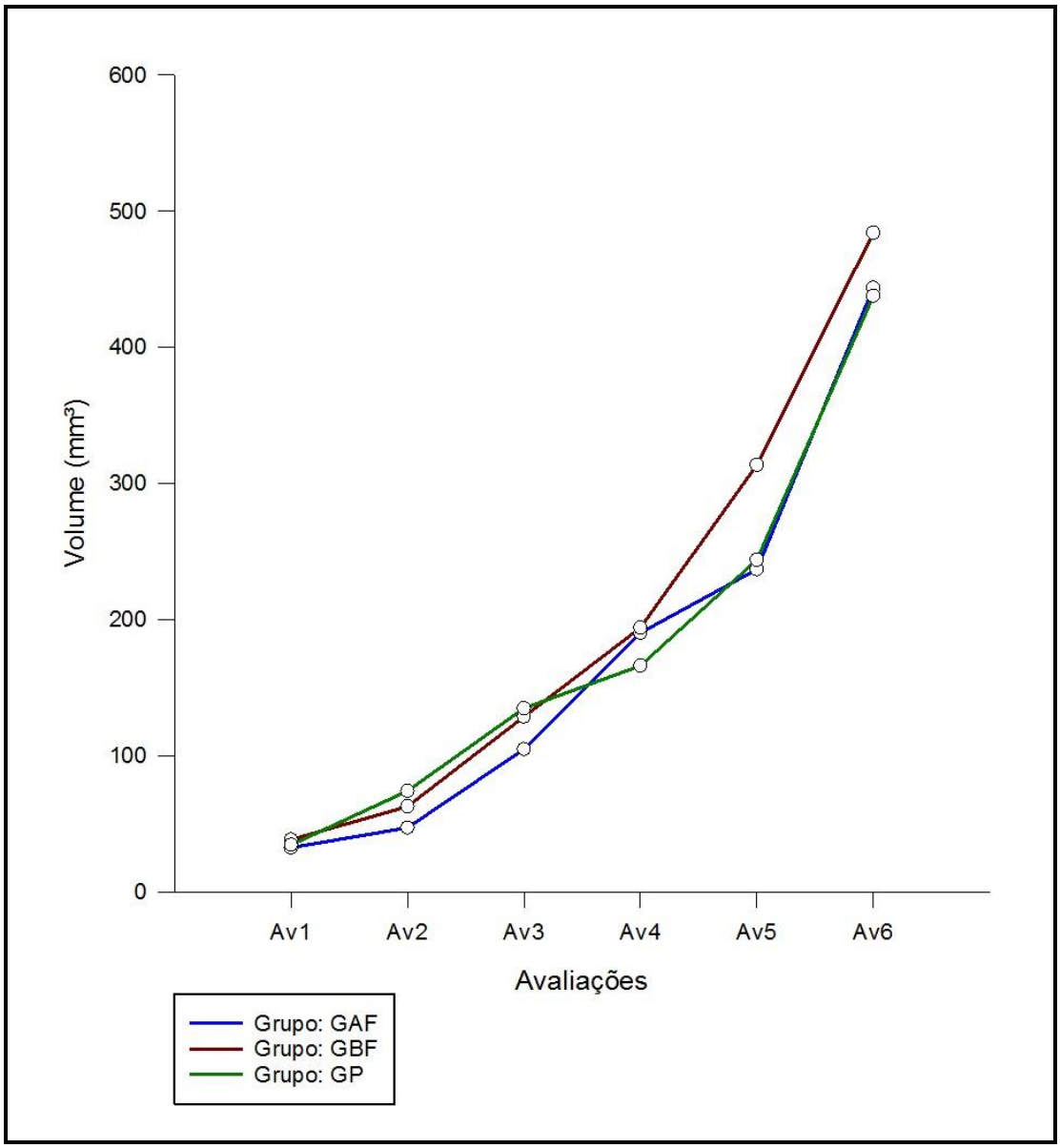


**Gráfico 1.** Crescimento tumoral ao longo do tempo. Legenda: Av - Avaliação; GAF - Grupo de alta frequência; GBF - Grupo de baixa frequência; GP - Grupo placebo.

Para a área de necrose em tecido neoplástico viável, o teste One-Way ANOVA não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (F=0,232; p=0,796) (Gráfico 2 e Figura 5).

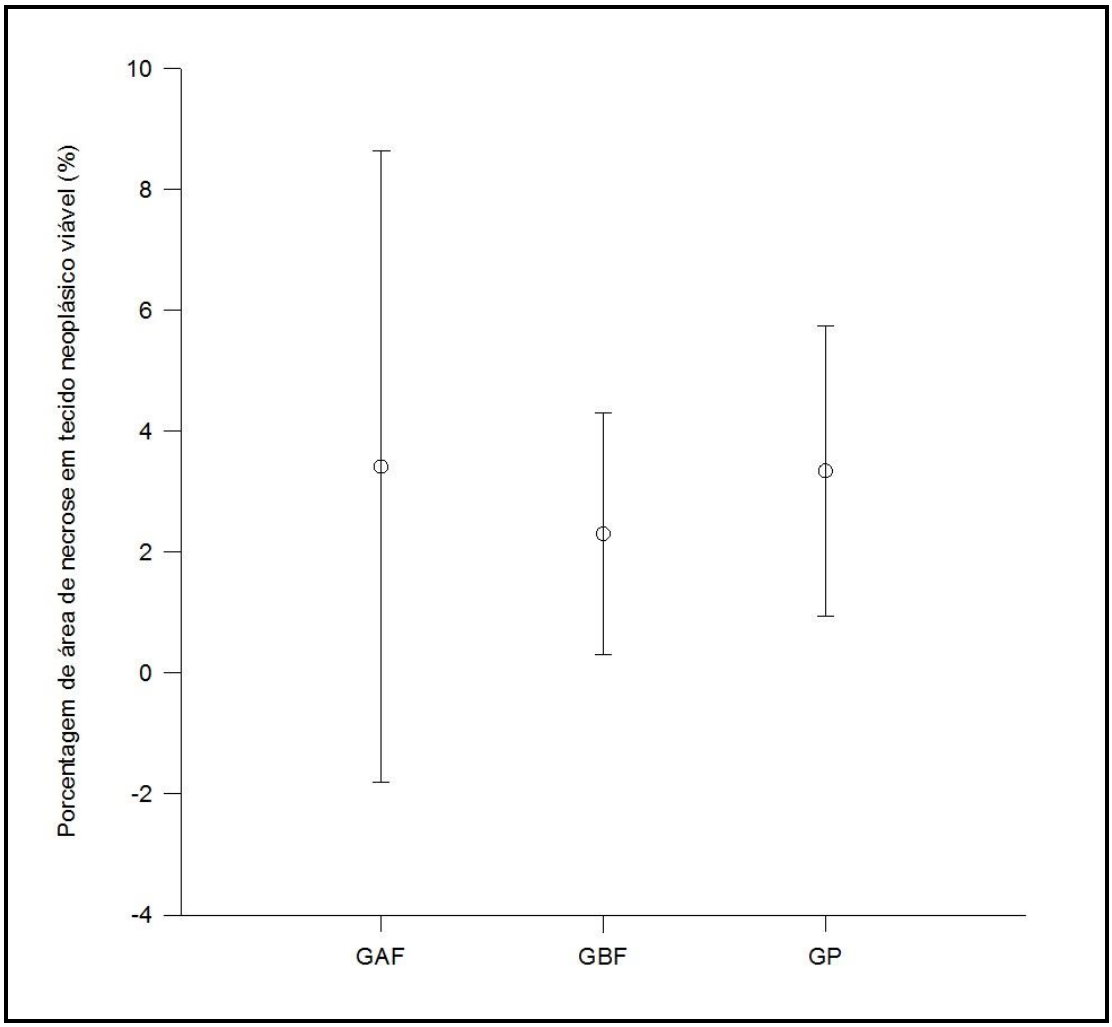


**Gráfico 2.** Porcentagem de área de necrose em tecido neoplástico viável por grupo. Legenda: GAF - Grupo de alta frequência; GBF - Grupo de baixa frequência; GP - Grupo placebo.

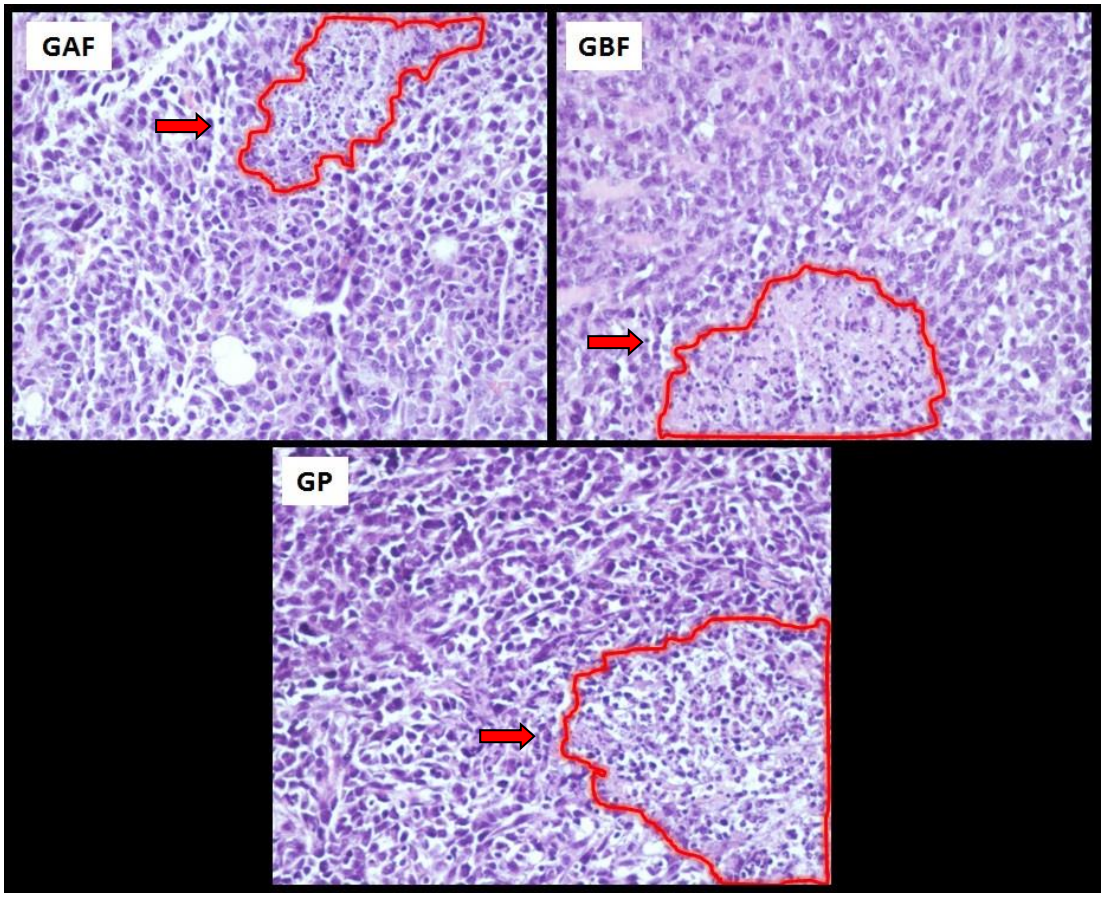


**Figura 5.** Imagens histológicas das lâminas coradas com hematoxilina de Harris e eosina. A área destacada mostra uma região com células de diâmetro menor e mais espaçadas entre si, o que indica a presença de necrose. Legenda: GAF - grupo tratado com TENS de alta frequência; GBF - grupo tratado com TENS de baixa frequência; GP - grupo tratado com TENS placebo.

# 6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a aplicação da TENS não teve efeito no crescimento tumoral e na área de necrose do tecido neoplásico viável do carcinoma de mama 4T1 independente da frequência utilizada.

O carcinoma 4T1 possui características semelhantes ao câncer de mama em humanos, tais como, as metástases são advindas do tumor primário e têm os mesmos sítios de metástases. Uma das vantagens é o fácil manuseio *in vitro* e *in vivo* (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 2001).

A necrose tumoral é um evento comum e pode ser relacionada à uma intervenção terapêutica ou estar associada ao crescimento tumoral. Centros de necrose representam a origem do infiltrado inflamatório e, inúmeros fatores celulares são liberados das células necróticas. Estes fatores são um importante estímulo para a migração e diferenciação de células imunes, portanto, um centro necrótico pode ser associado a um mau prognóstico (Onuchic e Chammas, 2010). Diversos autores utilizaram a hematoxilina e eosina para analisar os efeitos de diferentes intervenções na necrose tumoral como a quimioterapia cianogênica e a deleção da IL-33R, mas as diferenças metodológicas entre estes trabalhos e o presente estudo dificultam comparações (Ramalho et al., 2014; Milosavljevic et al., 2016).

Os resultados deste estudo convergem com o trabalho de Linkov et al. (2012) sobre o uso de NMES no carcinoma espinocelular em camundongos. Os animais foram tratados por oito dias não consecutivos com 80 Hz de frequência, duração de pulso de 700 µs, intensidade de 1,0 mA, com contração muscular visível por 30 minutos. Foram realizadas as análises imuno-histoquímica de apoptose, proliferação, vascularização e de volume

tumoral. Apesar destas diferenças metodológicas entre os estudos, os resultados são semelhantes aos do presente estudo, no que se refere à não influência da corrente elétrica sobre o crescimento tumoral em nenhuma das análises realizadas.

Os resultados deste estudo somados aos resultados de Linkov et al. (2012) podem indicar que a corrente bifásica não influencia no crescimento de carcinomas independente da frequência, largura de pulso e da intensidade da corrente.

Pacientes pós-operados de câncer de mama podem apresentar ferida pós-operatória, fibrose e encurtamento muscular, o que pode levar à dor local, déficit funcional de membro superior e consequente diminuição da amplitude de movimento (ADM) (de Groef et al., 2015).

Importante destacar que o período pós-operatório dos individuos submetidos a diferentes tratamentos cirúrgicos para câncer de mama é comumente associado à dor e restrição de movimento induzida pela dor, que se torna crônica em 49% dos casos (Legeby et al., 2002). Estudos têm mostrado que a dor pós-operatória aguda intensa tem forte relação com a dor pós-operatória crônica (Hovind et al., 2013).

O uso local da TENS poderia beneficiar estes pacientes com o manejo da dor (Robb et al., 2009) e modulação da cicatriz pós-operatória (Machado et al., 2012; Thakral et al., 2014), possibilitando a realização de mobilização precoce.

Os parâmetros utilizados para a TENS nesta pesquisa foram baseados em estudos prévios: a largura de pulso (Liebano et al., 2006; 2008;

Yokoyama et al., 2015), o tempo de aplicação (Sato et al., 2012; Yokoyama et al., 2015) e o tempo de tratamento (Sato et al., 2012; Farcic et al., 2013). As frequências de 10 e 100 Hz foram baseadas nos diferentes efeitos sobre a vasoconstrição venosa e os receptores adrenérgicos α-1, em que a baixa frequência aumenta e a alta frequência diminui a sensitividade destes receptores (Franco et al., 2014). A intensidade utilizada foi baseada no método de Yokoyama et al. (2012), onde a intensidade foi pré-estabelecida e foi acrescido 1,0 mA a cada 5 minutos ao longo da aplicação.

Existem poucos trabalhos que avaliaram a influência da eletroestimulação em tumores (Jarm et al., 2003; Janigro et al., 2006; Linkov et al., 2012).

Janigro et al. (2006) concluíram que a corrente alternada de 50 Hz de frequência, 7,5 µA, administrada por três dias aumentou a eficiência da quimioterapia em tumores malignos que apresentam gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1). Os autores realizaram as avaliações de *Western blot* e flurescência, que mostraram que a corrente alternada diminuiu a expressão de MDR1 e alterou sua distribuição celular da membrana plasmática ao citoplasma, o que contribuiu para a perda da capacidade de extrusão da droga e aumentou a quimiossensibilidade.

Jarm et al. (2003) realizaram um tratamento com corrente direta com 0.6 mA por uma hora de tratamento nos fibrosarcomas Sa-1 e LPB em camundongos. As células tumorais foram inoculadas subcutaneamente na lateral do tronco dos animais e estes foram tratados com os eletrodos inseridos subcutaneamente em lados opostos dos tumores. O tratamento foi

iniciado quando os tumores atingiram 50 e 100 $mm^3$ de volume. Os valores obtidos pela mensuração por meio de paquímetro foram colocados na fórmula do volume da elipse. Foi concluído que a corrente direta de baixa intensidade diminuiu severamente o fluxo sanguíneo e a perfusão destes tumores por conta da oclusão ou lesão de vasos na região em que os eletrodos foram inseridos, o que acarretou na diminuição da oxigenação dos tumores.

Pesquisadores estudaram os efeitos da TENS no fluxo sanguíneo (Cramp et al., 2000; 2002; Chen et al., 2007). Cramp et al. (2000) aplicaram TENS com uma largura de pulso de 200 µs por 15 minutos sobre o nervo mediano de humanos saudáveis. Os voluntários foram divididos em três grupos: aplicação de TENS com 4 Hz, TENS com 100 Hz e TENS placebo. Para os grupos tratados com TENS ativo, a intensidade foi descrita como "forte, mas confortável". Os autores concluíram que apenas o grupo de baixa frequência teve aumento do fluxo sanguíneo local e que não houve mudança da temperatura em nenhum grupo estudado. De acordo com Cramp et al. (2000), estes resultados sugerem que a TENS em baixa frequência inibiu o sistema nervoso autônomo simpático, causando vasodilatação cutânea.

Em outro estudo, Cramp et al. (2002) mostrou aumento no fluxo sanguíneo local estatisticamente significante durante a aplicação de TENS no nervo mediano com largura de pulso de 200 µs, frequência de 4 Hz por 15 minutos com uma intensidade motora. Os grupos tratados com intensidade sensorial não tiveram aumento do fluxo sanguíneo local. Os autores sugerem que este aumento do fluxo sanguíneo cutâneo pode ter

sido causado tanto pelo mecanismo de bomba muscular quanto pelo aumento da demanda metabólica do músculo em contração. Mas Cramp et al. (2002) consideram que o mecanismo de bomba muscular é o mais provável, uma vez que as mudanças ocorridas no fluxo sanguíneo coincidem com o começo e o fim da aplicação da TENS.

Os resultados de Cramp et al. (2000) indicam que o tratamento com a TENS com intensidade sensorial não aumenta o fluxo sanguíneo local.

Este estudo foi o primeiro a avaliar a influência da TENS na área de necrose em tecido neoplástico viável e no crescimento tumoral, o que abre novas possibilidades para futuras pesquisas. Nós sugerimos que sejam estudados temas relativos aos efeitos da TENS no microambiente tumoral, como na liberação de VEGF, de diferentes marcadores inflamatórios e na vascularização em carcinomas. Futuros trabalhos devem ser realizados a fim de elucidar os efeitos da TENS quando aplicada em sítios próximos e distantes do tumor; o uso da TENS sobre tumores em animais que estejam sob quimioterapia, em diferentes tipos de carcinomas e com diferentes parâmetros; e também, os efeitos da TENS na disseminação de células tumorais e consequentemente em metástases.

# 7. CONCLUSÕES

A TENS programada para emitir os parâmetros de largura de pulso de 200 µs, frequências de 10 Hz ou 100 Hz, tempo de aplicação de 20 minutos e intensidade sensorial de 3,0 mA a 6,0 mA por 10 dias não consecutivos de tratamento durante duas semanas não influenciou no crescimento do carcinoma 4T1.

# 8. REFERÊNCIAS

Abdulkareem IH. A Review on Aetio-Pathogenesis of Breast Cancer. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013;4(142). doi:10.4172/2157-7412.1000142.

Abram SE, Asiddao CB, Reynolds AC. Incresead skin temperature during transcutaneous electrical stimulation. *Anesth Analg* 1980;59:22-5.

Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012;123(23):5591-6.

Bennett MI, Johnson MI, Brown SR, Radford H, Brown JM, Searle RD. Feasibility study of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for cancer bone pain. *J Pain* 2010;11(4):351-9.

Bevilacqua M, Domingues LJ, Barrella, and Barbagallo M: Induction of vascular endothelial growth factor release by transcutaneous frequency modulated neural stimulation in diabetic polyneuropathy. *J Endocrinol Invest* 2007;30(11):944-7.

Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanità* 2010;46(1):66-80.

Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005;69:4-10.

Casale R, Gibellini R, Bozzi M, Bonelli S. Changes in sympathetic activity during high frequency TENS. *Acupunct Electrother Res* 1985;10:169–75.

Chao L-F, Zhang AL, Liu H-E, Cheng M-H, Lam H-B, Lo SK. The efficacy of acupoint stimulation of the management of therapy-related adverse events in patient of breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118(2):255-67.

Chen C-C, Johnson MI, McDonough S, Cramp F. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on local and distal cutaneous blood flow following a prolonged heat stimulus in healthy subjects. Clin *Physiol Funct Imaging* 2007;27(3):154–61.

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007;28(1):11-23.

Cramp AF, Gilsenan C, Lowe AS, Walsh DM. The effect of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation upon cutaneous blood flow and skin temperature in healthy subjects. *Clin Physiol* 2000;20:150-7.

Cramp FL, McCullough GR, Lowe AS, Walsh DM. Transcutaneous electric nerve stimulation: the effect of intensity on local and distal cutaneous blood flow and skin temperature in healthy subjects. *Arch Phys Med Rehabil* 2002;83:5-9.

DeSantana JM, da Silva LFS, de Resende MA, Sluka KA. Transcutaneous electrical nerve stimulation at both high and low frequencies activates ventrolateral periaqueductal grey to decrease mechanical hyperalgesia in arthritic rats. *Neuroscience* 2009;163(4):1233-41.

DuPré SA, Redelman D, Hunter Junior KW. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Path* 2007;88:351-60.

Duvshani-Eshet M, Benny O, Morgenstern A, Machluf M. Therapeutic ultrasound facilites antiangiogenic gene delivery and inhibits prostate tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2007;6(8):2371-82.

Ebersold MJ, Laws Jr ER, Albers JW. Measuraments of autonomic function before, during and after transcutaneous stimulation in patientswith chronic pain and in control subjects. *Mayo Clin Proc* 1977;52(4):228-32.

Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. *Nucl Med Biol* 2007;34:229-32.

Facci LM, Nowotny JP, Tormem F, Trevisani VFM. Efeitos da estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) e da corrente interferencial (CI) em pacientes com lombalgia crônica não específica: ensaio clínico randomizado. *São Paulo Med J* 2011;129(4):206-16.

Fang J-F, Liang Y, Du J-Y, Fang J-Q. Transcutaneous electrical nerve stimulation attenuates CFA-induced hyperalgesia and inhibits spinal ERK1/2-COX-2 pathway activation in rats. *BMC Complementary and Alter Med* 2013;13:134. doi: 10.1186/1472-6882-13-134.

Farcic TS, Baldan CS, Cattapan CG, Parizotto NA, João SMA, Casarotto RA. Treatment time of ultrasound therapy interferes with organization of collagen fibers in rat tendons. *Braz J Phys Ther* 2013;17(3):263-71.

Favero GM, Otuki MF, Oliveira KA, Bohatch Jr MS, Borelli P, Barros FE, Maria DA, Fernandes D, Bydlowski SP. Simvastatin impairs murine melanoma growth. *Lipids Health Dis* 2010;9(142): doi:10.1186/1476-511X-9-142.

Fiorelli A, Morgillo F, Milione R, Pace MC, Passavanti MB, Laperuta P, Aurilio C, Santini M. Control of post-thoracotomy pain by transcutaneous electrical nerve stimulation: effect on serum cytokine levels, visual analogue scale, pulmonary function and medication. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41(4):861-8.

Franco OS, Paulitsch FS, Pereira APC, Teixeira AO, Martins CN, Silva AMV, Plentz RDM, Irigoyen MC, Signori LU. Effects of different frequencies of transcutaneous electrical nerve stimulation on venous vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res* 2014;47(5):411-8.

Frigo L, Luppi JSS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, Bensadoun RJ, Lopes-Martins RAB. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma *in vitro* and *in vivo. BMC Cancer* 2009;9:404 doi:10.1186/1471-2407-9-404.

Gopalkrishnan P, Sluka KA. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2000;81(7):984-90.

de Groef A, Van Kampen M, Dieltjens E, Christiaens MR, Neven P, Geraerts I, Devoogdt N. Effectiveness of Postoperative Physical Therapy for Upper-Limb Impairments After Breast Cancer Treatment: A Systematic Review. *Arch Phys Med Rehabil* 2015;96:1140-53.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. 14. *Cell*. 2000;100:57-70.

Hingne PM, Sluka KA. Blockade of NMDA receptors prevents analgesic tolerance to repeated transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in rats. *J Pain* 2008;9(3):217-25.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Oosterom ATV, De Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56(4):549–80.

Hovind IL, Bredal IS, Dihle A. Women's experience of acute and chronic pain following breast cancer surgery. *J Clin Nurs* 2012;22(7-8):1044–52.

Huang X, Wong MK, Yi H, Watkins S, Laird AD, Wolf SE, Gorelik E. Combined therapy of local and metastatic 4T1 breast tumor in mice using SU6668, an inhibitor of angiogenic receptor tyrosine kinases, and the immunostimulator B7.2-IgG fusion protein. *Cancer Res* 2002;62(20):5727-35.

Indergrand HJ, Morgan BJ. Effects of high-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation on limb blood flow in healthy humans. *Phys Ther* 1994;74:361-7.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; c1996-2015 [acesso em 27 Nov 20015]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama.

Janigro D, Perju C, Fazio V, Hallene K, Dini G, Agarwal MK, Cucullo L. Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells. *BMC Cancer* 2006;6(72): doi:10.1186/1471-2407-6-72.

Jarm T, Čemažar M, Steinberg F, Streffer C, Serša G, Miklavčič D. Perturbation of blood flow as a mechanism of anti-tumour action of direct current electrotherapy. *Physiol Meas* 2003;24:75-90.

Johnson M. Transcutaneous electrical nerve stimulation: mechanisms, clinical application and evidence. *Reviews Pain* 2009;1(1):7-11.

Johnson M. Transcutaneous electrical nerve stimulation: review of effectiveness. *Nurs Stand* 2014; 28(40):44-53.

Johnson MI, Jones I. Transcutaneous electrical nerve stimulation. *Critical Care Pain* 2009;9(4):130-5.

Khalil Z, Merhi M, Livett BG. Differential involvement of conotoxin-sensitive mechanisms in neurogenic vasodilatation responses: effects of age. *J Geron A Biol Sci Med Sci* 2001;56(8):356-63.

Kramer MG, Masner M, Casales E, Moreno M, Smerdou C, Chabalgoity JA. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated Salmonella eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer* 2015;15(620): DOI 10.1186/s12885-015-1618-x.

Kwon SJ, Park SY, Kwon GT, Lee KW, Kang Y-H, Choi M-S, Yun JW, Jeon J-H, Jun JG, Park JHY. Licochalcone E present in licorice suppresses lung metastasis in the 4T1 mammary orthotopic cancer model. *Cancer Prev Res* 2013;6(6):603-13.

Laakso E-L, Young C. Electrophysical agents (EPAs) for symptom control in cancer care – what is the evidence? *Phys Ther Reviews* 2010;15(4):334-43.

Langley RR e Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* 2011;128(11):2527–35.

Legeby M, Segerdahl M, Sandelin K, Wickman M, Östman K, Olofsson C. Immediate reconstruction in breast cancer surgery requires intensive post-operative pain treatment but the effects of axillary dissection maybe more predictive of chronic pain. *Breast* 2002;11:156–62.

Li Y, Jin M, Shao S, Huang W, Yang F, Chen W, Zhang S, Xia G, Gao Z. Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. *BMC Cancer* 2014;14:329 http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/329.

Liebano RE, Abla LEF, Ferreira LM. Effect of high frequency transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* 2006;21(3):133-8.

Liebano RE, Abla LEF, Ferreira LM. Effect of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on viability of ischemic skin flaps in the rat: An amplitude study. *Wound Rep Reg* 2008;16(1):65-9.

Liebano RE, Machado AFP. Vascular Endothelial Growth Factor Release Following Electrical Stimulation in Human Subjects. *Adv Wound Care* 2014;3(2): 98-103.

Linkov G, Branski RC, Amin M, Chernichenko N, Chen C-H, Alon G, Langmore S, Wong RJ, Kraus DH. Murine model of neuromuscular electrical stimulation on squamous cell carcinoma: Potential implications for dysphagia therapy. *Head Neck*. 2012;34(10):1428–33.

Liu H-X, Tian J-B, Luo F, Jiang Y-H, Deng Z-G, Xiong L, Liu C, Wang J-S, Han J-S. Repeated 100 Hz TENS for the treatment of chronic inflammatory hyperalgesia and suppression of spinal release of substance P in monoarthritic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007;4(1):65-75.

Loh SY e Musa AN. Methods to improve rehabilitation of patients following breast cancer surgery: a review of systematic reviews. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2015;7:81–98.

Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008;130(6):1091-103.

Machado AFP, Santana EF, Tacani PM, Liebano RE. The effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on tissue repair: A literature review. *Can J Plast Surg* 2012; 20(4):237-40.

Maeda Y, Lisi TL, Vance CGT, Sluka KA. Release of GABA and activation of $GABA_A$ in the spinal cord mediates the effects of TENS in rats. *Brain Res* 2007;1036(1):43-50.

Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SLJ, Arsenijevic NN, Markovic BJS, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(14):18106-15.

Monteiro JSC, Pinheiro ALB, de Oliveira SCPS, Aciole GTS, Sousa JAC, Cangussú MCT, dos Santos JN. Influence of Laser Phototherapy (λ660 nm) on the outcome of oral chemical carcinogenesis on the hamster cheek pouch model: histological study. *Photomed Laser Surg* 2011;29(11):741-5.

Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition - a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med Chem* 2007;7(2):223-45.

Nnoaham KE, Kumbang J. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for chronic pain. *Cochrane Database of Syst Rev* 2008, Issue 3. Art. No.: CD003222. doi. 10.1002/14651858.CD003222.pub2.

de Oliveira SI, Andrade LNS, Onuchic AC, Nonogaki S, Fernandes PD, Pinheiro MC, Rohde CBS, Chammas R, Jancar S. Platelet-activating factor

receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer* 2010;10(200) doi:10.1186/1471-2407-10-200.

Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med* 2010;89(1):21-31.

Owens S, Atkinson ER, Lees DE. Thermographic evidence of reduced sympathetic tone with transcutaneous nerve stimulation. *Anesthesiology* 1979;50:62-5.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989; 8:98–101.

Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* (2000) 20.2.1-20.2.16.

Ramalho RT, Aydos RD, Schettert I, Cassino PC. Histopathological evaluation of tumor necrosis and volume after cyanogenic chemotherapy. *Acta Cir Bras* 2014;29:38-42.

Rasool Z, Hassan AUI, Hassan G, Masood T. Importance of lymphatic's in dissemination of breast cancer: anatomical, pathological, surgical and prognostic implications. *Int J Anat Res* 2013;1(2):64-8.

Reeves JL, Graff-Radford SB, Shipman D. The effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on experimental pain and sympathetic nervous system response. *Pain Med* 2004;5:150-61.

Rennie S. Electrophysical agents contraindications and Precautions: An Evidence-Based Approach to Clinical Decision Making in Physical Therapy. *Physiother Can* 2011;62(5):1-80.

Robb KA, Newham DJ, Williams JE. Transcutaneous electrical nerve stimulation vs. transcutaneous spinal electroanalgesia for chronic pain associated with breast cancer treatments. *J Pain Symptom Manage* 2007;33(4):410-9.

Robb KA, Oxberry SG, Bennett MI, Johnson MI, Simpson KH, Searle RD. A cochrane systematic review of transcutaneous electrical nerve stimulation for cancer pain. *J Pain Symptom Manage* 2009;37(4):746-53.

Sagen A, Kaaresen R, Sandvik L, Thune I, Risberg MA. Upper limb physical function and adverse effects after breast cancer surgery: a prospective 2.5-year follow-up study and preoperative measures. *Arch Phys Med Rehabil* 2014;95(5):875-81.

Sampaio LR, de Resente MA, Pereira LSM. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on vertebral metastatic bone pain of breast cancer patients: single case experimental study. *Rev Dor* 2016;17(2):81-7

Sato KL, Sanada LS, Rakel BA, Sluka KA. Increasing Intensity of TENS Prevents Analgesic Tolerance in Rats. *J Pain* 2012;13(9):884-90.

Sayers KT, Brooks AD, Sayers TJ, Chertov O. Increased secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) production by highly metastatic mouse breast cancer cells. *PLoS ONE* 2014;9(8): e104223.doi:10.1371/journal.pone.0104223.

Scudds RJ, Helewa A, Scudds RA. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on skin temperature in asymptomatic subjects. *Phys Ther* 1995;75(7):621-8.

Searle RD, Bennett MI, Johnson MI, Callin S, Radford H. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for cancer bone pain*. J Pain Symptom Manage* 2009;37(3):424-8.

Sherry JE, Oehrlein KM, Hegge KS, Morgan BJ. Effect of burst-mode transcutaneous electrical nerve stimulation on peripheral vascular resistance. *Phys Ther* 2001;81:1183-91.

Sicard-Rosenbaum L, Lord D, Danoff JV, Thom AK, Eckhaus MA. Effects of continuous therapeutic ultrasound on growth and metastasis of subcutaneous murine tumors. *Phys Ther* 1995;75:3-11.

Sicard-Rosenbaum L, Danoff JV, Guthrie JA, Eckhaus MA. Effects of energy-matched pulsed and continuous ultrasound on tumor growth in mice. *Phys Ther* 1998;78:271-7.

Silva JG, Santana CG, Inocêncio KR, Orsini M, Machado S, Bergman A. Electrocortical analysis of patients with intercostobrachial pain treated with TENS after breast cancer surgery. *J Phys Ther Sci* 2014;26(3):349-53.

Smith TJ, Coyne PJ, Parker GL, Dodson P, Ramakrishnan V. Pilot trial of a patient-specific cutaneous electrostimulation device (MC5-A Calmare®) for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Pain Symptom Manage* 2010;40(6):883-91.

Springer S, Laufer Y, Elboim-Gabyzon M. Clinical decision making for using electro-physical agents by physiotherapists, an Israeli survey. *Isr J Health Policy Res* 2015;4(14) doi 10.1186/s13584-015-0015-x.

Takahashi K, Nagai N, Ogura K, Tsuneyama K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent breast cancer-associated Inflammation. *Cancer Sci* 2015;106(7):867-74.

Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:228 doi:10.1186/1471-2407-8-228.

Testa A, Iannace C, Di Libero L. Strengths of early physical rehabilitation programs in surgical breast cancer patients: results of a randomized controlled study. *Eur J Phys Rehabil Med* 2014;50(3):275-84.

Thakral G, LaFontaine J, Najafi B, Talal TK, Kim P, Lavery LA. Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabet Foot Ankle* 2013;4:22081 - http://dx.doi.org/10.3402/dfa.v4i0.22081.

Todorova M, Agache V, Mortazavi O, Chen B, Karshafian R, Hynynen K, Man S, Kerbel RS, Goertz DE. Antitumor effects of combining metronomic chemotherapy with the antivascular action of ultrasound stimulated microbubbles. *Int J Cancer* 2013;132: 2956-66.

Tonezzer T, Tagliaferro J, Cocco M, Marx A. Uso da estimulação elétrica nervosa transcutânea aplicado ao ponto de acupuntura PC6 para a redução dos sintomas de náusea e vômitos associados à quimioterapia antineoplásica. *Rev Bras Cancerol* 2012;58(1):7-14.

Tsai M-J, Chang W-A, Huang M-S, Kuo P-L. Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer. *ISRN Biochemistry* 2014 http://dx.doi.org/10.1155/2014/351959.

Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL, Zeferino LC. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;30(1):42-7.

Wang P, Li C, Wanga X, Xiong W, Feng X, Liu Q, Leung AW, Xu C. Anti-metastatic and pro-apoptotic effects elicited by combination photodynamic therapy with sonodynamic therapy on breast cancer both in vitro and in vivo. *Ultrason Sonochem* 2015;23:116-27.

Watson KD, Lai C-Y, Qin S, Kruse DE, Lin Y-C, Seo J-W, Cardiff RD, Mahakian LM, Beegle J, Ingham ES, Curry F-R, Reed RK, Ferrara KW. Ultrasound increases nanoparticle delivery by reducing intratumoral pressure and increasing transport in epithelial and epithelial-mesenchymal transition tumors. *Cancer Res* 2012;72(6):1485-93.

Yokoyama LM, Pires LA, Ferreira EA, Casarotto RA. Low and high frequency transcutaneous electrical nerve stimulation have no deleterious or teratogenic effects on pregnant mice. *Physiotherapy* 2015;101(2):214-8.

Yoshimura T, Howard OMZ, Ito T, Kuwabara M, Matsukawa A, Chen K, Liu Y, Liu M, Oppenheim JJ, Wang JM. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. *PLoS ONE* 2013;8(3): e58791. doi:10.1371/journal.pone.0058791.

# ANEXO

MEDICINA
USP

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**A CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **040/15** intitulado: **"Influência da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos"** que utilizará **21** animais da espécie **camundongo,** apresentado pelo Departamento de Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Raquel Aparecida Casarotto**
**Pesquisador (a) Executante: Leonardo Affonso Massabki Caffaro**

**CEUA-FMUSP, 25 de Março de 2015**

**Dr. Eduardo Pompeu**
**Coordenador**
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br