

LEONARDO AFFONSO MASSABKI CAFFARO

**Efeitos da estimulação elétrica nervosa transcutânea na angiogênese e
proliferação celular do carcinoma 4T1 de glândulas mamárias em
camundongas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida
Casarotto

São Paulo

2023

LEONARDO AFFONSO MASSABKI CAFFARO

**Efeitos da estimulação elétrica nervosa transcutânea na angiogênese e
proliferação celular do carcinoma 4T1 de glândulas mamárias em
camundongas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida
Casarotto

São Paulo

2023

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
Efeitos da estimulação elétrica nervosa
transcutânea na angiogênese e proliferação celular do
carcinoma 4T1 de glândulas mamárias em camundongos /
Leonardo Affonso Massabki Caffaro. -- São Paulo,
2023.

Tese(doutorado)--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-258/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus amigos de infância Valter Rocha, Rafael Palasthy, Rodrigo Blancato e Felipe Américo, que me ajudaram e me apoiaram ao longo dos cursos de pós-graduação.

À minha Orientadora-mãe ou Mãe-orientadora, Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto, que me orientou e me apoiou de forma humana e maternal, ajudando no meu crescimento pessoal e profissional de modo singular.

Aos meus amigos, preceptores e professores da graduação da Universidade Paulista (UNIP) e Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

Aos profissionais e amigos do Centro Educacional Sete de Setembro (CESS), que participaram do meu período de crescimento profissional e confiam no meu trabalho.

Agradeço em especial o Prof. Dr. Thiago Saikali Farcic que sempre me ajudou e me orientou dentro da carreira acadêmica bem como ao Prof. Dr. Cristiano Schiavinato Baldan, que me apresentou o universo da Eletroterapia.

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

Ao Prof. Dr. Adalberto Neto, que me orientou e me mostrou sobre o universo da histologia e imunohistoquímica, transmitindo um pouco de seu vasto conhecimento sobre o assunto.

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.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptação do 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.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
+/-	Mais ou menos
=	Igual a
<	Menor
>	Maior
°C	Grau Celsius
µg/ml	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µs	Microsegundo
µm	Micrômetro
ε ²	<i>Épsilon</i> ao quadrado (<i>Épsilon Squared</i>)
■	Média
•	<i>Oulier</i>
ADM	Amplitude de movimento
BSA	Albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CAF	Fibroblasto relacionado ao câncer
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina (<i>Calcitonin gene-related peptide</i>)
CIOMS	Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas
CIV	Corrente Interferencial Vetorial
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico

EGF	Fator de crescimento endotelial (<i>Endothelial growth factor</i>)
FGF	Fator de crescimento básico dos fibroblastos (<i>Fibroblastic growth factor</i>)
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FREMS	Estimulação elétrica de frequência modulada (<i>Frequency-modulated electrical stimulation</i>)
GA	Grupo de alta frequência
GB	Grupo de baixa frequência
GS	Grupo <i>Sham</i>
H₂O₂	Peróxido de oxigênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1α	Fator-1 α induzido por hipóxia (<i>Hypoxia inducible factor-1α</i>)
Hz	Hertz
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
g	Grama
LRCM	Linfedema relacionado ao câncer de mama
LOX	Lisil oxidase
mA	Miliampère
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1 (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MDR1	Gene de resistência a múltiplas drogas (<i>Multi-drug resistance gene</i>)
MEC	Matriz Extracelular

mg/Kg	Miligrama por quilograma
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos (<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>)
M	Mol
mm³	Milímetro cúbico
n	Número
NMES	Estimulação elétrica neuromuscular (<i>Neuromuscular electrical stimulation</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS/EDTA	Tampão fosfato salino com ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Phosphate buffered saline plus Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>)
PGC-1α	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 α (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1α</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Σ	Somatória
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNAP	Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SP	Substância P
TAM	Macrófagos associados ao tumor (<i>Tumor-associated macrophages</i>)

TBS	Solução Tris-Salina tamponada (<i>tris-buffered saline</i>)
TENS	Estimulação elétrica nervosa transcutânea (<i>Transcutaneous electrical nerve stimulation</i>)
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β (<i>Transforming growth factor-β</i>)
TME	Microambiente tumoral
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
TNF-β1	Fator de necrose tumoral- β 1 (<i>Tumor necrosis factor-β1</i>)
tto	Tratamento
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular-A (<i>Vascular endothelial growth factor-A</i>)

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Fluxograma do protocolo de estudo	40
Figura 2. Estimulação elétrica enquanto os animais permanecem anestesiados com isofurano a 1,5%.	41
Figura 3. Eletrodo de silicone carbonado com 1 cm ² de área de superfície	42
Figura 4. Fixação dos eletrodos com fita curativa hipoalergênica em região abdominal.....	43
Figura 5. Pré-processamento das imagens de imunohistoquímica..	49
Figura 6. Análise de <i>auto local thresholds</i> para imunohistoquímica.....	50
Figura 7. Teste de radius para imunohistoquímica.....	51
Figura 8. Fração da área de vasos sanguíneos por grupo	52
Figura 9. Balanceamento de cores.....	53
Figura 10. Pré-processamento das imagens de HE.....	54
Figura 11. Análise de auto local thresholds para imagens de HE	55
Figura 12. Teste de radius para HE	56
Figura 13. Análise de diferentes valores mínimos de área nuclear	58
Figura 14. Lâminas de Hematoxilina e Eosina	59
Figura 15. Pré-processamento das imagens de fibras de reticulina.....	61
Figura 16. Análise de auto local thresholds para imagens de reticulina	62
Figura 17. Teste de radius para fibras de reticulina	63
Figura 18. Fibras de reticulina	64
 Gráfico 1. Fração da área de vasos sanguíneos por grupo	 52
Gráfico 2. Fração de área de núcleos por grupo	60

Gráfico 3. Fração da área de fibras de reticulina por grupo	65
-------------------------------------------------------------------	----

RESUMO

Caffaro LAM. Efeitos da estimulação elétrica nervosa transcutânea na angiogênese e proliferação celular do carcinoma 4T1 de glândulas mamárias em camundongas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Diante dos efeitos vasculares e terapêuticos da TENS associados à escassez de estudos sobre sua aplicação prática em pacientes oncológicos, é necessária a realização de estudos pré-clínicos que avaliem a segurança oncológica da TENS. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS) na angiogênese, proliferação celular, na deposição de fibras de reticulina do carcinoma 4T1 de glândula mamária de camundongas. Camundongas Balb/c (N=30) foram divididas em três grupos e submetidos à inoculação de células 4T1 e tratados por 20 minutos durante 10 dias: grupo de alta frequência (GA) e grupo de baixa frequência (GB) foram tratados com 100 Hz e 10 Hz respectivamente; e o grupo sham (GS) com os cabos desconectados. Os demais parâmetros da TENS foram: duração do pulso - 200 microssegundos (μ s) e intensidade sensorial. A intensidade foi reajustada em 1,0 mA a cada cinco minutos nos grupos GA e GB para evitar a habituação da corrente. Os animais foram mortos por injeção de xilazina e quetamina seguidos da permanência em câmara de CO₂. Os tumores foram extirpados para a confecção de lâminas de Hematoxilina e Eosina (HE), imunohistoquímica com CD31 e reticulina. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que não houveram diferenças entre os grupos para a área fracionada de vasos sanguíneos ($p=0,612$). O teste de One-Way ANOVA não evidenciou diferença significativa entre os grupos para a área fracionada dos núcleos celulares ($p=0,152$). Para a área fracionada de fibras de reticulina o teste post-hoc de Turkey de comparações múltiplas não detectou diferença entre GA vs. GB ($p=0,708$) e GB vs. GS ($p=0,195$), porém, houve diferença entre GA vs. GS ($p=0,042$). Conclui-se que a TENS não promoveu angiogênese, não influenciou a proliferação celular e, quando utilizada em alta frequência inibiu a deposição de fibras de reticulina.

Palavras-chave: Camundongos. Estimulação elétrica nervosa transcutânea. Fisioterapia. Modalidades de fisioterapia. Neoplasias. Neoplasias da mama.

ABSTRACT

Caffaro LAM. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on angiogenesis and cell proliferation of 4T1 carcinoma in mammalian glands in mice [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

In view of vascular and therapeutic effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) associated with the scarcity of studies on its practical application in cancer patients, it is necessary to carry out preclinical studies to assess the oncological safety of TENS. The aim of this study is to evaluate TENS effects on angiogenesis, cell proliferation and deposition of reticulin fibers in 4T1 carcinoma of mammary gland on mice. Balb/c mice (N=30) were divided into three groups and submitted to 4T1 cell inoculation and treated for 20 minutes during 10 days: high frequency group (HF) and low frequency group (LF) were treated with 100 Hz and 10 Hz respectively; and the sham group (GS) with the cables disconnected. The other TENS parameters were: pulse duration - 200 microseconds (μ s) and sensory intensity. The intensity was readjusted by 1.0 mA every five minutes in HF and LF groups to avoid current habituation. The animals were killed by injection of xylazine and ketamine followed by CO₂ chamber permanence. The tumors were excised for preparation of Hematoxylin and Eosin (HE), immunohistochemistry with CD31 and reticulin slides. The Kruskal-Wallis test showed that there were no differences between groups for the fraction area of blood vessels ($p=0.612$). The One-Way ANOVA test showed no significant difference between groups for fraction area of cell nuclei ($p=0.152$). For the fraction area of reticulin fibers, Turkey's post-hoc test of multiple comparisons did not detect difference between GA vs. GB ($p=0.708$) and GB vs. GS ($p=0.195$), however, there was a difference between GA vs. GS ($p=0.042$). It is concluded that TENS did not promote angiogenesis, did not influence cell proliferation and, when used at high frequency, its inhibited the deposition of reticulin fibers.

Keywords: Mice. Transcutaneous electric nerve stimulation. Physical therapy speciality. Physical therapy modalities. Neoplasms. Breast neoplasms.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	15
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Microambiente tumoral (TME)	18
2.1.1 Progressão tumoral.....	18
2.1.2 Vascularização tumoral.....	20
2.1.3 Fase avascular e troca angiogênica	20
2.1.4 Angiogênese tumoral.....	21
2.1.5 Fase vascular	21
2.2 Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS).....	24
2.2.1 Efeitos da TENS na reparação tecidual	25
2.2.2 Efeitos vasculares e parametrização	27
2.2.2.1 Influência no fluxo sanguíneo e temperatura.....	27
2.2.2.2 Influência na angiogênese	28
2.2.3 Mecanismos de ação relacionados à vascularização	29
2.2.3.1 Sistema Nervoso Autônomo (SNA)	30
2.2.3.2 Reflexo axonal.....	30
2.2.3.3 Bomba muscular	31
2.2.4 Efeito de correntes elétricas terapêuticas no metabolismo.....	32
2.2.5 Efeitos das correntes bifásicas em tumores.....	32
2.2.6 Aplicações na Fisioterapia Oncológica	33
2.3 Histologia e imunohistoquímica	34
2.3.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE).....	34
2.3.2 Imunohistoquímica indireta por CD31	35
2.3.3 Impregnação argêntica para reticulina	35
3.0 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4.0 MÉTODOS.....	38
4.1 Aspectos Éticos	38
4.2 Desenho de estudo.....	38
4.3 Animais	38

4.4 Experimento <i>in vitro</i> : Cultura de células 4T1	39
4.5 Experimento <i>in vivo</i> : Inoculação das células 4T1 e análise do crescimento tumoral	39
4.6 Procedimentos experimentais	40
4.7 Protocolo experimental: Grupos de tratamento	43
4.8 Eutanásia e armazenamento de material biológico	44
4.9 Imunohistoquímica indireta para CD31	44
4.10 Impregnação argêntica para reticulina	45
4.11 Pré-processamento, processamento e análise de imagens	46
4.12 Análise estatística	46
5.0 RESULTADOS	48
5.1 Angiogênese	48
5.1.1 Pré-processamento	48
5.1.2 Processamento	49
5.1.3 Análise	51
5.2 Proliferação celular	53
5.2.1 Pré-processamento	53
5.2.2 Processamento	54
5.2.3 Análise	56
5.3 Fibras de reticulina	60
5.3.1 Pré-processamento	60
5.3.2 Processamento	61
5.3.3 Análise	63
6.0 DISCUSSÃO	66
7.0 CONCLUSÕES	74
8.0 REFERÊNCIAS	75
ANEXO 1	90
ANEXO 2	91
ANEXO 3	92
ANEXO 4	93

1.0 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama é o câncer mais frequente nas mulheres e em 2020 acometeu 2.3 milhões delas, levando à morte 685 mil (WHO, 2021).

Pacientes que são submetidos ao tratamento cirúrgico para o câncer de mama podem apresentar quadro clínico inicial de dor e diminuição de amplitude de movimento (ADM) do membro superior. Se estas disfunções não forem tratadas, o paciente pode evoluir para complicações tardias como disfunções miofaciais, capsulite adesiva, disfunções nervosas e dor persistente (De Groef et al., 2015).

Junto deste quadro, os pacientes ainda podem desenvolver linfedema relacionado ao câncer de mama (LRCM), o qual tem uma incidência de 14 a 40% (Rockson, 2018) e é de origem multifatorial (McLaughlin et al., 2020). O linfedema pode causar efeitos negativos como uma diminuição na atividade física, alterações sensoriais, estresse psicológico, fadiga e redução na qualidade de vida (Merchant e Chen, 2015).

Previamente a dor pós-mastectomia não era uma complicação frequente, porém, atualmente é estimado que de 20 a 50% dos pacientes tenham este sintoma (Tait et al., 2018). Reis et al. (2018) aponta que aproximadamente metade dos pacientes pós-cirúrgicos de câncer de mama recebem um tratamento pós-operatório indevido, possivelmente como consequência de uma avaliação inadequada da intensidade da dor destes pacientes.

O trabalho de Okamoto et al. (2018) mostra que a dor pós-operatória intensa é um fator de risco para a cronificação da dor nestes pacientes. Seus resultados evidenciam que pacientes que relataram dores severas no primeiro dia pós-operatório tiveram um pior prognóstico, cursando com dores por mais de seis meses, quando comparados com o grupo de pacientes que declarou dores leves no primeiro dia pós-operatório, o que corrobora com Tait et al.

(2018), que apontam que a presença de dor aguda pós-operatória é um fator de risco forte para a presença de dor pós-mastectomia tardia.

Diante deste quadro, a fisioterapia dispõe de uma série de recursos não farmacológicos que podem ser utilizados para o manejo da dor, dentre eles existem os agentes físicos como o calor superficial, diatermia por ondas curtas, crioterapia, estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), ultrassom terapêutico, corrente interferencial, terapia por laser de baixa intensidade, entre outros (Cheville e Basford, 2014).

Dentre estes agentes físicos, a TENS é um dos recursos de eletroterapia mais utilizados na prática clínica da fisioterapia. Segundo o estudo de Springer et al. (2015), 88,4% dos fisioterapeutas fazem uso da TENS, sendo que 47,8% a utilizam diariamente.

A aplicação da TENS no pós-operatório de pacientes de câncer de mama pode trazer benefícios como a diminuição da incidência de necrose tecidual na ferida pós-operatória (Atalay e Yilmaz, 2009), a redução da dor pós-mastectomia (Erden et al., 2022), a diminuição da dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (Püsküllüoglu et al., 2022), a redução da dor intercostobraquial e da disestesia em pacientes com síndrome pós-mastectomia (Silva et al., 2014; Mendonça et al., 2017).

Porém a utilização da TENS em pacientes oncológicos é polêmica. Sua aplicação é comumente realizada em locais distantes do tumor primário (Tonezzer et al., 2012; 2017) e se realizada sobre os tumores, a aplicação só ocorre em pacientes em cuidados paliativos (Nakano et al., 2019) ou com dores advindas de metástase óssea (Searle et al., 2009; Sampaio et al., 2016).

Um dos fatores que contribui para as dúvidas da utilização da TENS em paciente oncológicos está relacionado ao aumento da angiogênese promovida pela utilização deste recurso, evidenciada nos estudos de Liebano et al. (2008), Machado et al. (2016) e Machado et al. (2017).

A aplicação local de agentes eletrofísicos tem sido contraindicada no tratamento de pacientes oncológicos (Robertson et al., 2009; Rennie, 2011; Johnson, 2021). Segundo Rennie (2011), apenas a crioterapia é tida como

segura para aplicação local em tumores malignos, enquanto que os demais agentes físicos são contraindicados em aplicação local pela escassez de estudos sobre seus efeitos neste tecido.

Segundo Rennie (2011), a aplicação da estimulação elétrica sobre um tecido maligno poderia promover o aumento da síntese de DNA e da atividade mitótica, levando ao crescimento tumoral e favorecendo o aparecimento de metástases.

O aumento da taxa metabólica é relacionado ao aumento da temperatura tecidual de acordo com a lei de Van't Hoff, em que o acréscimo de temperatura de 4°C acarreta em aumento de 50% do metabolismo (Robertson et al., 2009); porém, os estudos de Cramp et al. (2000) e Cramp et al. (2002) mostraram, em seus resultados, que a TENS não aumentou a temperatura tecidual em humanos saudáveis em nenhum dos grupos estudados.

Wang et al. (2018) aplicaram TENS sobre câncer cervical em camundongos e seus resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo ativo para o crescimento tumoral, apoptose, proliferação e angiogênese.

Portanto, diante dos efeitos vasculares e terapêuticos da TENS, associados à escassez de estudos sobre sua aplicação prática em pacientes oncológicos, é necessária a realização de estudos pré-clínicos que avaliem a segurança oncológica da TENS.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microambiente tumoral (TME)

Recentemente a abordagem relacionada ao câncer mudou drasticamente e este não tem sido visto apenas como um conjunto de células tumorais, e sim como um microambiente tumoral (TME) complexo, em que outras células não tumorais são recrutadas para promover um ambiente tumoral auto-suficiente (Peltanova et al., 2019). Dentre as células estromais que formam o TME estão os mastócitos, fibroblastos associados ao câncer, plaquetas, neutrófilos, macrófagos, células T reguladoras, células supressoras derivadas de mielóides e células matadoras naturais (Peltanova et al., 2019).

Estas subpopulações celulares secretam citocinas, fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular (MEC) e quimiocinas para se comunicarem entre si e entre as células tumorais (Peltanova et al., 2019). Outros constituintes não celulares no TME são os restos metabólicos, exossomos, microvesículas, co-fatores, enzimas, componentes relacionados à MEC, moléculas sinalizadoras e secreções endócrinas e exócrinas (Peltanova et al., 2019).

2.1.1 Progressão tumoral

Células inflamatórias e tumorais interagem de forma propícia para a progressão tumoral. Com o crescimento tumoral ocorre a presença de hipóxia e necrose, causando assim o recrutamento de células imunes (Lorusso e Rüegg, 2008).

Durante a progressão tumoral, os fibroblastos são convertidos pelo fator de necrose tumoral- β 1 (TNF- β 1) em fibroblastos ativos ou fibroblastos

relacionados ao câncer (CAF). Os CAFs são responsáveis pela liberação de moléculas imunes modulatórias e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Sflomos e Briskin, 2017).

As células imunológicas presentes no TME, quando recrutadas pelas células tumorigênicas, podem auxiliar na remoção de tecidos, na formação de novos vasos sanguíneos e no aumento da proliferação celular. Esse processo foi dividido em três etapas: a primeira envolve o recrutamento de células imunológicas (por meio de proteína quimiotática interleucina-8 (IL-8) e monócitos-1 (MCP-1)), que é induzido pela produção de citocinas. A segunda etapa é a cooptação, que ocorre devido à secreção de citocinas como a interleucina-6 (IL-6), o TNF- α e o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), que regulam a diferenciação das células imunológicas e promovem o desenvolvimento tumoral. Na terceira etapa, as células imunológicas diferenciadas geram hormônios, fatores de crescimento e citocinas que promovem a tolerância do tumor ao sistema imunológico e o seu desenvolvimento (Onuchic e Chammas, 2010).

Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são dominantes em relação à população de leucócitos no TME e, relacionados à proliferação, invasão e metástase das células tumorais, também atuam na supressão de células T, angiogênese e progressão tumoral (Onuchic e Chammas, 2010; Sflomos e Briskin, 2017). Estudos recentes correlacionam os níveis de infiltração dos TAM com um prognóstico ruim de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (Peltanova et al., 2019).

Os adipócitos também têm papel importante na progressão tumoral por meio da secreção de hormônios como o estradiol (E2) e a prolactina aumentando a proliferação e sobrevivência do câncer de mama. Junto disto, estudos *in vitro* apontam que a liberação de IL-6 por adipócitos deixam as células tumorais mais invasivas e aumentam o potencial metastático e, também estudos em *in vitro* e *in vivo* mostram a liberação de TNF- α por adipócitos e seus efeitos deletérios, promovendo acréscimo do número de células-tronco e metástase (Sflomos e Briskin, 2017).

2.1.2 Vascularização tumoral

Vasos sanguíneos tumorais apresentam características que diferem das de vasos de tecidos saudáveis: são usualmente descritos como imaturos, suas paredes são mal desenvolvidas, por vezes com descontinuidades e com uma má comunicação entre pericitos e células endoteliais (Tozer et al., 2005). Estas características promovem uma maior permeabilidade vascular de macromoléculas (o que gera hemorragias) e, conseqüentemente, um aumento da pressão intersticial, que é aumentada pela drenagem linfática inadequada do TME (Carmeliet et al., 2005; Tozer et al., 2005; Moreira et al., 2007).

Também são evidenciados poros mais dilatados e com grande variabilidade de tamanho, vasos sanguíneos de formatos irregulares e tortuosos, pequena quantidade de células musculares lisas (causando baixa resposta para terapias medicamentosas vasoativas) e grande quantidade de “fins cegos” (gerando estase) (Carmeliet, 2005; Tozer et al., 2005; Moreira et al., 2007).

Importante destacar que estes vasos sanguíneos possuem uma rede caótica sem organização hierárquica entre vênulas, arteríolas e capilares sanguíneos: o que acarreta em fluxo sanguíneo desordenado e conseqüentemente, uma grande quantidade de sangue desoxigenado e área de hipóxia tumoral, sendo que as áreas periféricas têm um aporte sanguíneo maior (Tozer et al., 2005; Moreira et al., 2007; Nagy et al., 2009).

2.1.3 Fase avascular e troca angiogênica

Durante a fase avascular, os tumores são considerados inativos e apresentam um fenótipo avascular, sendo nutridos por difusão. Neste período, há um equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, permitindo o

aumento do volume tumoral até atingir 1-2 mm³ sem suporte vascular (ou quando possuem cerca de 10⁶ células malignas), ou até aproximadamente 2-3 mm³ de volume (Hoeben et al., 2004; Carmeliet, 2005).

A essa fase segue-se o fenômeno da troca angiogênica, na qual o tumor, que anteriormente apresentava um fenótipo avascular, passa a ter um fenótipo vascular. Isso ocorre devido a um desequilíbrio entre fatores estimulantes e inibidores (Hoeben et al., 2004; Carmeliet, 2005).

2.1.4 Angiogênese tumoral

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio da vascularização pré-existente. Colunas de células endoteliais adjacentes ficam em contato entre si formando cordões que posteriormente vão desenvolver tubos com lumens (Wang et al., 2008).

A angiogênese tumoral é um processo relativamente cru e de grande importância para o crescimento, progressão e metástase tumoral, sendo o resultado do desbalanço da secreção de citocinas, em especial o fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A). A expressão do VEGF-A induz a formação de vasos sanguíneos tumorais, sendo estes os “vasos mãe”, os capilares, as proliferações microvasculares glomerulóides, as más formações vasculares, as artérias alimentadoras e as veias drenadoras (Wang et al., 2008; Nagy et al., 2009). As características anatômicas e cinéticas destes vasos sanguíneos são semelhantes independentemente dos tecidos em que eles brotam (Nagy et al., 2009).

2.1.5 Fase vascular

Durante a fase vascular, o VEGF desempenha um papel importante como mediador da angiogênese tumoral e desencadeia uma série de eventos

que, a partir da formação de capilares sanguíneos, proporciona aos tumores acesso a oxigênio e nutrientes, resultando no aumento do volume tumoral e em metástase subsequente (Hoeben et al., 2004; Carmeliet, 2005).

A expressão do gene VEGF é regulada por inúmeros fatores, como os fatores de crescimento que se seguem: 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 componente que desempenha papel na indução de VEGF é a hipóxia, que parece ser onipresente durante o processo de crescimento tumoral (Carmeliet, 2005).

Cria-se um ciclo de hipóxia, VEGF e crescimento tumoral no qual o crescimento tumoral, durante a fase avascular, aumenta a distância entre partes do tumor e os vasos sanguíneos, o que causa hipóxia; que, por sua vez, impede a degradação do fator-1 α induzido por hipóxia (HIF-1 α), permitindo a dimerização e ligação com o promotor do gene VEGF, o que estimula a produção de VEGF; e, provoca aumento da permeabilidade vascular e da angiogênese. Assim, o tumor torna-se de fenótipo vascular e, a partir da vascularização tumoral, recebe oxigênio e nutrientes para crescer e metastizar (Carmeliet, 2005).

A vascularização tumoral também contribui para este ciclo, uma vez que a desorganização da arquitetura vascular do tumor, pode levar a áreas de hipóxia, o que estimula a liberação de VEGF e perpetua a desorganização vascular (Carmeliet, 2005).

De acordo com Nagy et al. (2009), os tumores são “feridas que não cicatrizam”, pois em tecidos lesionados normais, o VEGF-A reduz sua expressão conforme a hipóxia diminui, resultado da angiogênese, que supre estas regiões de hipóxia. Nos tumores existe a expressão exagerada de VEGF-A uma vez que esta é induzida não só pela hipóxia, mas também pela oncogênese, pela perda de genes supressores tumorais, por hormônios, dentre outros fatores (Nagy et al., 2009).

Vale ressaltar que o HIF-1 α estimula a liberação de citocinas e de proteínas como a lisil oxidase (LOX); esta, por sua vez, tem um papel relevante no processo de metástase em câncer de mama do tipo ER⁻ e também é um mediador importante para a metástase óssea a partir da ativação de osteoclastos formando um nicho pré-metastático, com um microambiente favorável para a angiogênese e metástase (Sflomos e Briskin, 2017). Sendo assim, o HIF-1 α não está limitado apenas ao crescimento tumoral local.

2.1.6 Células 4T1

Fred Miller e colaboradores isolaram as células 4T1 de um câncer de mama espontâneo de um camundongo Balb/cfC3H no Karmanos Cancer Institute, sendo estas, uma de quatro subpopulações do tumor 410.4 (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 2001; DuPré et al., 2007; Tao et al., 2008; Yoshimura et al., 2013).

Estas células apresentam vantagens no seu uso para pesquisa, uma vez que têm grande potencial para o surgimento de metástases, que se localizam em diversas regiões, como linfonodos, sangue, cérebro, osso, pulmões e fígado, sendo que estes dois últimos ocorrem oito dias pós-inoculação. (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 2001; DuPré et al., 2007; Tao et al., 2008; Yoshimura et al., 2013).

Outra vantagem do carcinoma 4T1 é que este possui características semelhantes às do estágio avançado do câncer de mama em humanos, uma vez que pode gerar metástases nos mesmos sítios que o câncer de mama em humanos e há o surgimento de hipercalemia. Assim este modelo experimental é comumente utilizado uma vez que sua progressão é semelhante ao quadro clínico em humanos (Li et al., 2014; Sayers et al., 2014; de Almeida et al., 2019).

O carcinoma 4T1 é um câncer singênico imunocompetente triplo negativo (déficit na expressão de receptores de estrogênio, progesterona e fator de crescimento epidérmico humano 2) com alto poder de metastização (Steenbrugge et al., 2019; Malekian et al., 2020). Diversos pesquisadores têm estudado o modelo experimental do carcinoma 4T1 a fim de entender seu microambiente e suas interações com diferentes substâncias para aperfeiçoá-lo (DuPré et al., 2007; de Almeida et al., 2019; Atiya et al., 2019; Avila et al., 2019).

Pesquisas recentes mostram os efeitos do Bisfenol A na resposta imune humoral do carcinoma 4T1 (Avila et al., 2019); a influência do RGD na capacidade de aderência das células 4T1 na MEC (Mohamedi et al., 2019); a inibição da proliferação, migração e invasão celular do carcinoma 4T1 a partir do uso da Taxifolina (Li et al., 2019) e da inibição da proliferação celular e metástase do carcinoma 4T1 a partir de nano reguladores (Zhang et al., 2019).

2.2 Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS)

A TENS consiste na aplicação de eletrodos (geralmente auto-adesivos) sobre a superfície intacta da pele, emitindo uma estimulação elétrica pulsada, que atravessa o tecido tegumentar, o que estimula nervos periféricos (Johnson et al., 2015; Gibson et al., 2017). Inicialmente foi utilizada para o controle de condições dolorosas agudas e crônicas, porém, esta tem sido usada para o manejo de outras condições como a neuropatia periférica (Gibson et al., 2017).

A intensidade, duração e frequência da TENS podem ser modificadas. A TENS usualmente é dividida em TENS de baixa frequência e TENS de alta frequência, sendo que a primeira consiste em uma aplicação de 10 Hz ou menos e a última em uma aplicação de 50 Hz ou mais (Gibson et al., 2017).

A TENS de baixa frequência é comumente aplicada com intensidades altas, ou seja, geram contrações musculares; enquanto a TENS de alta

frequência é usualmente utilizada com intensidades mais baixas (Gibson et al., 2017).

2.2.1 Efeitos da TENS na reparação tecidual

Estudos em modelo animal têm mostrado efeitos positivos da TENS na modulação da reparação tecidual, a partir da averiguação da redução de área de necrose em retalhos cutâneos (Liebano et al., 2003; 2006; 2008) e da estimulação da angiogênese em feridas excisionais (Koca Kutlu et al., 2013; Machado et al., 2016; 2017).

Liebano et al. (2006) e Liebano et al. (2008), submeteram ratos à TENS com 5; 10; 15 e 20 mA de intensidade para posteriormente avaliarem a área de necrose e a viabilidade do retalho cutâneo. Foi utilizada uma frequência de 80 Hz (Liebano et al., 2006) e de 2 Hz (Liebano et al., 2008). Os resultados destes estudos indicam que apenas o grupo de 15 mA, no qual eram evidenciadas leves contrações musculares, apresentou uma menor área de necrose quando comparado aos demais grupos (Liebano et al., 2006; 2008).

Importante destacar que nos estudos de Liebano et al. (2003; 2006; 2008) não são todos os grupos tratados que apresentam redução da área de necrose; e, de acordo com os resultados do trabalho de Folha et al. (2015), a TENS *burst*, aplicada por 30 minutos, ao longo de seis dias, com frequência portadora de 100 Hz, frequência de burst de 2 Hz, duração de pulso de 200 μ s e intensidade de 90% do limiar motor inibiu a produção de colágeno tipo I e tipo III, mostrou um mau alinhamento de fibras colágenas e ainda não apresentou efeitos na vascularização e quantidade de mastócitos em lesão tendínea em modelo animal, embora outros estudos tenham observado resultados divergentes da aplicação da TENS para esta lesão (Folha et al., 2015).

Koca Kutlu et al. (2013) avaliaram os efeitos da TENS e de medicamentos de uso tópico na reparação tecidual de feridas incisionais em

modelo animal. Seus resultados mostram que a TENS com frequência de 2 Hz, aplicada por 15 minutos, promoveu aumento da expressão do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), PDGF-A e EGF quando comparada com o grupo lesionado não tratado. Também houve maior retração da ferida no grupo de TENS em relação aos demais.

Do Carmo Almeida et al. (2018) realizaram uma revisão sistemática com meta-análise com o objetivo de analisar os efeitos da TENS nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue de adultos e de avaliar como a parametrização da TENS afetaria este desfecho. Os autores incluíram seis estudos e, na avaliação de risco de viés para avaliação de ensaios clínicos da Cochrane Manual of Systematic Reviews nenhum dos estudos apresentou risco de viés alto.

De todos os trabalhos abordados por Do Carmo Almeida et al. (2018), apenas o estudo de Ngai et al. (2010) não mostrou diferenças nos níveis de IL-8 e TNF- α , os demais trabalhos apontaram diminuição dos níveis de IL-1; IL-6 e TNF- α quando comparados aos respectivos grupos controle. Importante destacar que as reduções destes marcadores ocorreram tanto em pacientes pós-cirúrgicos quanto em portadores de doenças crônicas.

Os estudos inseridos por Do Carmo Almeida et al. (2018) mostram uma parametrização incompleta da TENS. Apenas Ngai et al. (2010) e Fiorelli et al. (2012) reportaram a frequência e duração de pulso da TENS, sendo estas de 80 Hz, 250 μ s com intensidade “forte, porém confortável” (Fiorelli et al., 2012) e de 2 Hz, 200 μ s com intensidade não reportada (Ngai et al., 2010).

Estes resultados divergentes entre Ngai et al. (2010) e Fiorelli et al. (2012) podem indicar efeitos diferentes da TENS sobre citocinas pró-inflamatórias quando utilizada com modalidades distintas; onde a TENS convencional promoveu diminuição e a TENS acupuntura não alterou os níveis destas (Do Carmo Almeida et al., 2018).

Estas diferenças devem ser analisadas com cautela. Do Carmo Almeida et al. (2018) discutem que um possível mecanismo de ação da TENS, que poderia ter gerado esta queda nos níveis de citocinas pró-inflamatórias,

seria a ativação do Sistema Nervoso Autônomo Parasimpático (SNAP); mas vale destacar que a maioria dos trabalhos que avaliaram os efeitos da TENS nas citocinas pró-inflamatórias utilizaram agulhas como condutor, exceto Fiorelli et al. (2012) que foram os únicos autores que usaram eletrodos (Do Carmo Almeida et al., 2018) e, estudos sugerem que o uso de técnicas que utilizam agulhas, como acupuntura (Li et al., 2013) e agulhamento seco (Sillevis et al., 2019), podem causar alterações no Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

2.2.2 Efeitos vasculares e parametrização

Diversos autores evidenciaram efeitos fisiológicos da TENS, tais como diferenças na temperatura tecidual local e distal (Owens et al., 1979; Abram et al., 1980; Casale, 1985; Indergrand e Morgan, 1994; Scudds et al., 1995) e no fluxo sanguíneo em humanos saudáveis (Casale, 1985; Indergrand e Morgan, 1994; Cramp et al., 2000; 2002; Sherry et al., 2001; Sandberg et al., 2007).

2.2.2.1 Influência no fluxo sanguíneo e temperatura

Os trabalhos de Owens et al. (1979) e Abram et al. (1980) mostraram que a TENS aumentou a temperatura tecidual do tecido tegumentar em humanos em ensaios clínicos não controlados. Owens et al. (1979) não relataram a intensidade e realizaram a aplicação em nervo ulnar, enquanto a intensidade utilizada por Abram et al. (1980) foi motora em ponto doloroso.

Casale (1985), Indergrand e Morgan (1994) e Scudds et al. (1995) observaram diminuição da temperatura em indivíduos saudáveis após aplicação de TENS, sendo que no grupo de baixa frequência de Scudds et al. (1995), esta queda foi menor. Casale (1985) evidenciou queda do fluxo

sanguíneo enquanto Indergrand e Morgan (1994) relataram que não houve alteração do fluxo sanguíneo distal.

Cramp et al. (2000) e Cramp et al. (2002) realizaram ensaios clínicos controlados que avaliaram os efeitos da TENS, na temperatura tecidual e no fluxo sanguíneo, em voluntários saudáveis, quando aplicada sobre o nervo mediano. Ao comparar diferentes frequências portadoras, foi evidenciado que a TENS à 4 Hz promoveu aumento de fluxo sanguíneo (Cramp et al., 2000), porém os autores não relataram a intensidade utilizada. Ao comparar diferentes intensidades, a TENS promoveu aumento de fluxo sanguíneo apenas no grupo de intensidade motora à 4 Hz (Cramp et al., 2002). Não houve alteração da temperatura tecidual durante e após a aplicação da TENS (Cramp et al., 2000; 2002).

Sherry et al. (2001) observaram resultados semelhantes aos de Cramp et al. (2000) e Cramp et al. (2002), ao aplicar TENS-Burst à 85 Hz sobre os nervos tibial e fibular em humanos saudáveis. Apenas a TENS aplicada com intensidade 25% acima do limiar motor promoveu aumento de fluxo sanguíneo. Não foram evidenciadas alterações de temperatura.

Sandberg et al. (2007), realizaram a aplicação de TENS de baixa frequência (2 Hz) com intensidade motora, TENS de alta frequência (80 Hz) com intensidade sensorial e TENS subliminar (menor intensidade que o aparelho pode promover sem estímulo sensorial – 0,5 mA). Foi utilizada uma duração de pulso de 180 μ s e a aplicação foi realizada por 15 minutos. Os autores evidenciaram aumento do fluxo sanguíneo (estatisticamente significativo) nas fibras descendentes do músculo trapézio no grupo de intensidade motora, porém não foram observadas alterações de fluxo sanguíneo nos demais grupos; e, também não houve aumento de fluxo sanguíneo no tecido tegumentar em nenhum dos grupos avaliados.

2.2.2.2 Influência na angiogênese

Bevilacqua et al. (2007) aplicou TENS por 10 minutos seguida de um intervalo de 30 minutos para, posteriormente ser realizada uma estimulação elétrica de frequência modulada (FREMS) na face anterior do antebraço de voluntários e, foi evidenciado que a TENS não promoveu aumento do VEGF, seja em indivíduos saudáveis como em indivíduos que cursavam com diabetes tipo 2.

As análises para avaliar a expressão de VEGF foram feitas na pré-aplicação de TENS, no intervalo entre as aplicações de TENS e FREMS e após a aplicação de FREMS.

A FREMS promoveu aumento de VEGF no plasma sanguíneo dos voluntários. Os autores não descreveram os parâmetros utilizados para TENS, o que implica em um importante viés; uma vez que, de acordo com Liebano e Machado (2014), a expressão de VEGF, a partir da aplicação de correntes elétricas terapêuticas deve ser parâmetro-dependente.

Machado et al. (2016) e Machado et al. (2017) aplicaram TENS com 5 e 80 Hz de frequência, com duração de pulso de 200 μ s, intensidade de 15 mA (motora), por 60 minutos em ratos submetidos a feridas excisionais agudas, durante três dias. Embora as análises utilizadas nos estudos tenham sido diferentes, o objetivo destas era o mesmo, ver os efeitos da TENS na reparação tecidual a partir de desfechos relacionados à angiogênese.

Machado et al. (2016) mostraram que a TENS de 80 Hz inibiu a angiogênese e a produção de miofibroblastos, enquanto a TENS de 5 Hz estimulou a angiogênese; porém, no trabalho de Machado et al. (2017), a TENS promoveu a angiogênese em ambos os grupos.

2.2.3 Mecanismos de ação relacionados à vascularização

Estudos que avaliam os efeitos da TENS na temperatura tecidual, fluxo sanguíneo e reparação tecidual comumente justificam seus resultados a partir de diferentes possíveis mecanismos de ação desta sobre a vascularização

(Abraam et al., 1976; Owens et al., 1979; Abram et al., 1980; Indergrand e Morgan, 1994; Scudds et al., 1995; Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2000; 2002; Liebano et al., 2006; 2007; Machado et al., 2016; 2017).

2.2.3.1 Sistema Nervoso Autônomo (SNA)

Diversos pesquisadores que avaliam os efeitos da TENS sobre fluxo sanguíneo e temperatura local justificam seus resultados a partir da inibição ou estimulação no SNA (Abraam et al., 1976; Owens et al., 1979; Abram et al., 1980; Scudds et al., 1995; Cramp et al., 2000).

Diferentes autores mostram, em seus resultados, que a eletroestimulação não tem influência no sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) a partir da avaliação indireta deste, ou seja, da conductibilidade e temperatura da pele, do tamanho das pupilas, da frequência cardíaca e da pressão arterial (Ebersold et al., 1977; Reeves et al., 2004).

Por outro lado, Okuyucu et al. (2017) aplicaram a TENS na mão de voluntários saudáveis e avaliaram a resposta sudomotora destes. Seus resultados indicam que a TENS inibiu o SNAS a partir da diminuição da resposta sudomotora. A aplicação da TENS não é bem descrita neste estudo, os autores relatam utilizar frequência alta e baixa, porém não dizem qual sua taxa de repetição. Os autores também não dão maiores informações sobre as características físicas da corrente utilizada.

Os resultados de Okuyucu et al. (2017) podem não representar uma inibição do SNAS ou estimulação do SNAP, uma vez que os autores apenas avaliaram a resposta sudomotora e esta pode ser deflagrada a partir do reflexo axonal (Yaprak, 2008). O SNAS pode ter um papel importante no fluxo sanguíneo, onde sua inibição acarreta em um aumento do fluxo sanguíneo a partir de vasodilatação cutânea (Cramp et al., 2000).

2.2.3.2 Reflexo axonal

O trabalho de Khalil et al. (2001) evidenciou que a TENS de frequência 15 Hz propiciou liberação de substância P (SP); e, quando aplicada com 5 Hz de frequência promoveu a liberação de peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) em aplicação no nervo isquiático.

A TENS promove uma estimulação antidrômica a partir da estimulação de fibras nervosas A-δ e C, o que acarreta na liberação de neuropeptídeos como o CGRP, SP e o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP); sendo estes vasodilatadores potentes e, por conta disto, têm sido relacionados a um aumento do fluxo sanguíneo local e consequente promoção da reparação tecidual (Liebano et al., 2006; 2008; Machado et al., 2016).

Este mecanismo de ação da TENS na reparação tecidual é o mais bem aceito por pesquisadores (Machado et al., 2016), sendo que diversos autores justificam o aumento de fluxo sanguíneo (Scudds et al., 1995) e a modulação da reparação tecidual tegumentar a partir do reflexo axonal (Liebano et al., 2006; 2008; Machado et al., 2016; 2017).

2.2.3.3 Bomba muscular

O mecanismo de bomba muscular ocorre a partir do acúmulo de substâncias vasodilatadoras locais e da vasodilatação induzida por fatores relaxantes advindos do endotélio; e, assim, acarreta no aumento do fluxo sanguíneo (Sherry et al., 2001).

Diversos autores mencionam este mecanismo para justificar o aumento de fluxo sanguíneo local em humanos submetidos à TENS em intensidade motora e, em sua maioria, com frequência baixa (Scudds et al., 1995; Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2002). Cramp et al. (2002) também teorizam que o aumento de fluxo sanguíneo pode ocorrer pela maior demanda metabólica muscular no grupo de intensidade motora.

Assim como a contração muscular pode acarretar em um aumento de fluxo sanguíneo, segundo Scudds et al. (1995), a ausência ou diminuição desta pode contribuir para a queda de temperatura de voluntários submetidos à TENS em repouso.

2.2.4 Efeito de correntes elétricas terapêuticas no metabolismo

Os efeitos da TENS no metabolismo local não são estudados de forma direta. De acordo com a lei de Van't Hoff um aumento de 4°C da temperatura tecidual está associado a um aumento de 50% do metabolismo (Robertson et al., 2009), mas a TENS é um recurso que provê uma corrente elétrica de intensidade em miliamperes (mA) (Robertson et al., 2009), não sendo uma fonte primária de calor.

Estudos que avaliaram os efeitos da TENS sobre a temperatura local trazem resultados divergentes como visto anteriormente (Owens et al., 1979; Abram et al., 1980; Scudds et al., 1995; Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2000; 2002), ainda que os mais recentes mostrem que não haja aumento desta (Cramp et al., 2000; 2002).

2.2.5 Efeitos das correntes bifásicas em tumores

No estudo de Linkov et al. (2012) foi realizada uma estimulação elétrica de 80 Hz, com duração de pulso de 700 μ s, por 30 minutos de aplicação, à uma intensidade motora sobre o carcinoma espinocelular, advindo da inoculação de 10^7 células SCC7, na lateral do tronco de camundongos C3H nudes (n=7), por oito dias não consecutivos. Não foram evidenciadas diferenças nas análises de crescimento tumoral, vascularização, proliferação e apoptose, entre o grupo ativo e o grupo controle.

Wang et al. (2018) aplicaram TENS sobre em câncer cervical (SiHa) em camundongos Balb/c nudes com uma frequência de 1/4/1 Hz, duração de pulso de 230/270/230 μ s, por 20 minutos, uma única vez. A intensidade utilizada foi de 20 mA de forma fixa, os autores não relataram se esta gerou contrações musculares ou não. Os resultados de Wang et al. (2018) mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo ativo para o crescimento tumoral, apoptose, proliferação e angiogênese.

2.2.6 Aplicações na Fisioterapia Oncológica

A revisão sistemática de Hurlow et al. (2015) mostra, em seus resultados, que a TENS pode ser um bom recurso para a diminuição da dor oncológica óssea; porém os autores incluíram apenas três estudos nesta revisão e, sendo assim, apontam para esta possibilidade terapêutica, mas os resultados são inconclusivos.

Amaral et al. (2019) também realizaram uma revisão sistemática, um pouco mais abrangente, a fim de averiguar os efeitos da TENS na dor oncológica; porém, obtiveram apenas quatro estudos e, portanto, os resultados também são inconclusivos.

Erden et al. (2022), em seu ensaio clínico, utilizaram TENS em pacientes pós-mastectomia radical modificada e foram obtidos resultados significantes na diminuição da dor destes quando associada ao sono, mobilização e ansiedade.

Püsküllüoğlu et al. (2022) apontam que a TENS pode ser um recurso seguro e de auto-manejo para pacientes oncológicos; porém, por hora, não há evidência forte o suficiente que suporte o uso desta para o manejo de sintomas de neuropatia periférica induzida por quimioterapia.

Fanan et al. (2022), em uma revisão integrativa da literatura encontraram apenas quatro estudos sobre uso da TENS em pacientes

oncológicos em cuidados paliativos. Os autores destacam os efeitos benéficos que a TENS pode promover, como a redução do quadro algico e a diminuição do uso de drogas analgésicas nesta população, porém destacam a necessidade de futuros estudos.

2.3 Histologia e imunohistoquímica

A coloração histológica é um procedimento comum para a realização de estudos forenses e diagnósticos. O processo de coloração histológica é composto por cinco estágios fundamentais, sendo estes a fixação, processamento, embebição, secção e coloração (Alturkistani et al., 2016).

A imunohistoquímica permite a observação de proteínas relacionadas a tecidos patológicos ou não a partir de reações específicas entre anticorpos e antígenos, posteriormente estes tecidos podem ser visualizados na análise de microscopia a partir de diferentes cores ou fluorescência (Wang et al., 2008).

2.3.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE)

A coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) é a mais utilizada em todo o mundo; atualmente, quase todos os tipos de tecidos biológicos são corados com HE. A coloração de HE é vantajosa, uma vez que é de rápida execução e não é custosa. Esta coloração provê uma imagem morfológica excelente para a visualização dos núcleos celulares e do citoplasma (Alwahaibi et al., 2012; Alturkistani et al., 2016).

A hematoxilina é tida como o corante mais importante utilizado na histologia, histopatologia e citologia. É usada para a visualização de núcleos (pigmentados de azul), ácidos nucleicos, fibras do tecido conjuntivo e componentes intracelulares, como mitocôndrias, cromatina, nucléolos,

centríolos e também em imunohistoquímica (Alwahaibi et al., 2012; Alturkistani et al., 2016; Mohandas et al., 2019).

A eosina é um corante sintético, formado pela reação entre o bromo e a fluoresceína. Ela é ácida e tem afinidade com o grupo β -amino da lisina e o grupo guanidina da arginina. Como a maior parte das proteínas possuem os dois aminoácidos supracitados, a eosina pode pigmentar a maior parte das estruturas teciduais, porém, isto não ocorre com o glicogênio e proteoglicanos da MEC e grânulos de mastócitos. (Mohandas et al., 2019).

2.3.2 Imunohistoquímica indireta por CD31

Existem diversos marcadores imunohistoquímicos para a identificação de células endoteliais, sendo o marcador CD31, ou molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1), um dos mais comumente utilizados para a análise do endotélio vascular (Wang et al., 2008; Pazzini et al., 2017).

O CD31 é encontrado em grandes quantidades na superfície de células endoteliais e é menos presente em plaquetas e leucócitos. Ele possui um papel importante em diferentes interações celulares, principalmente na adesão entre células endoteliais e leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos durante a inflamação; e, entre células endoteliais durante a angiogênese (Wang et al., 2008).

A coloração imunohistoquímica de microvasos para a avaliação da densidade vascular é associada ao grau de neovascularização intratumoral, potencial metastático e prognóstico de diferentes tumores sólidos em humanos (Wang et al., 2008). Portanto, a imuno-histoquímica, para a detecção de CD31, tem sido muito utilizada para a quantificação da angiogênese tumoral em modelos animais (Wang et al., 2008).

2.3.3 Impregnação argêntica para reticulina

As fibras reticulares ou fibras argirofílicas, formam uma rede extensa em alguns órgãos. Estas fibras não são visualizadas em microscopia de luz quando coradas em HE; para que estas sejam visualizadas é necessário que seja realizada a impregnação argêntica, e assim as fibras reticulares são coradas de preto (Ushuki, 2002).

As fibras reticulares formam uma rede delicada de fibras finas, presentes em poucas localizações, sendo subjacentes à lâmina basal de células epiteliais, na superfície de adipócitos, miócitos, células de Schwann e no retículo fibroso de tecidos linfáticos (Ushuki, 2002).

Estudos mostram que as fibras reticulares, diferentemente das fibras colágenas, são compostas por colágeno tipo III em associação com outros tipos de colágeno (como o colágeno tipo V), glicoproteínas e proteoglicanos. O arranjo reticular das fibrilas promove espaço para movimentos moleculares no fluído extracelular, para os tecidos linfáticos; este arranjo fornece uma estrutura de suporte (esquelético) para vasos e linfonodos (Ushuki, 2002).

O uso da impregnação argêntica para reticulina é importante dentro da oncologia em diagnósticos diferenciais uma vez que os tecidos tumorais apresentam uma estrutura diferente de tecidos não patológicos (Lucero et al., 2016; Torres et al., 2016).

O trabalho de Shehata et al. (2004) evidenciou que o TGF- β 1 desempenha um importante papel na indução da fibrose por deposição de fibras de reticulina na leucemia de células pilosas, sendo este um importante indicador de progressão tumoral.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação da TENS de alta e baixa frequência no carcinoma 4T1.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da aplicação da TENS de alta e baixa frequência na angiogênese do carcinoma 4T1, por meio da avaliação de imunohistoquímica com o anticorpo CD31.

Avaliar os efeitos da aplicação da TENS de alta e baixa frequência na proliferação celular do carcinoma 4T1, por meio da avaliação histológica com lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina.

Avaliar os efeitos da aplicação da TENS de alta e baixa frequência na área de fibras de reticulina carcinoma 4T1, por meio da avaliação de lâminas de reticulina.

4.0 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) (Anexos 1; 2 e 3). Os animais são provenientes do Biotério Central da FMUSP, em São Paulo; 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 Desenho de estudo

O presente trabalho é um estudo pré-clínico em modelo animal, controlado e aleatorizado. O estudo segue a ferramenta de avaliação de risco de viés para estudos em modelo animal SYRCLE (Hooijmans et al., 2014), sendo esta recomendada por Ma et al. (2020).

4.3 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 foram divididos em três grupos (n=10) e ficaram em caixas com cinco animais cada. As caixas foram alocadas na mesma prateleira do mesmo quarto, uma ao lado da outra, no Centro de Medicina Nuclear da FMUSP em ambiente controlado a 20°C +/-

2°C, ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*. O refinamento ambiental se deu a partir da socialização harmônica entre os animais dentro de uma mesma caixa e o uso de rolos de papel higiênico (Baumans e Van Loo, 2013).

O cálculo amostral foi realizado a partir do trabalho de Eckelman et al. (2007) e Arifin e Zahiruddin (2017). A aleatorização foi feita em *cluster* via www.random.org. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Centro de Medicina Nuclear da FMUSP.

4.4 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) (Yang et al., 2013), em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. 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) (Yang et al., 2013) e transferidas para novas garrafas.

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

As células tumorais foram inoculadas com 50 µL de uma suspensão contendo 5x10⁴ 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. A técnica responsável/cuidadora era cega em relação ao tratamento dado aos animais.

4.6 Procedimentos experimentais

O tratamento com a TENS iniciou-se 12 dias após a inoculação das células, com aparecimento de tumor palpável (Linkov et al., 2012), a fim de tratar tumores com um volume superior a 3 mm³, 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 a sexta sessão (Linkov et al., 2012), a fim de reproduzir a prática clínica (Farcic et al., 2018) (Figura 1).

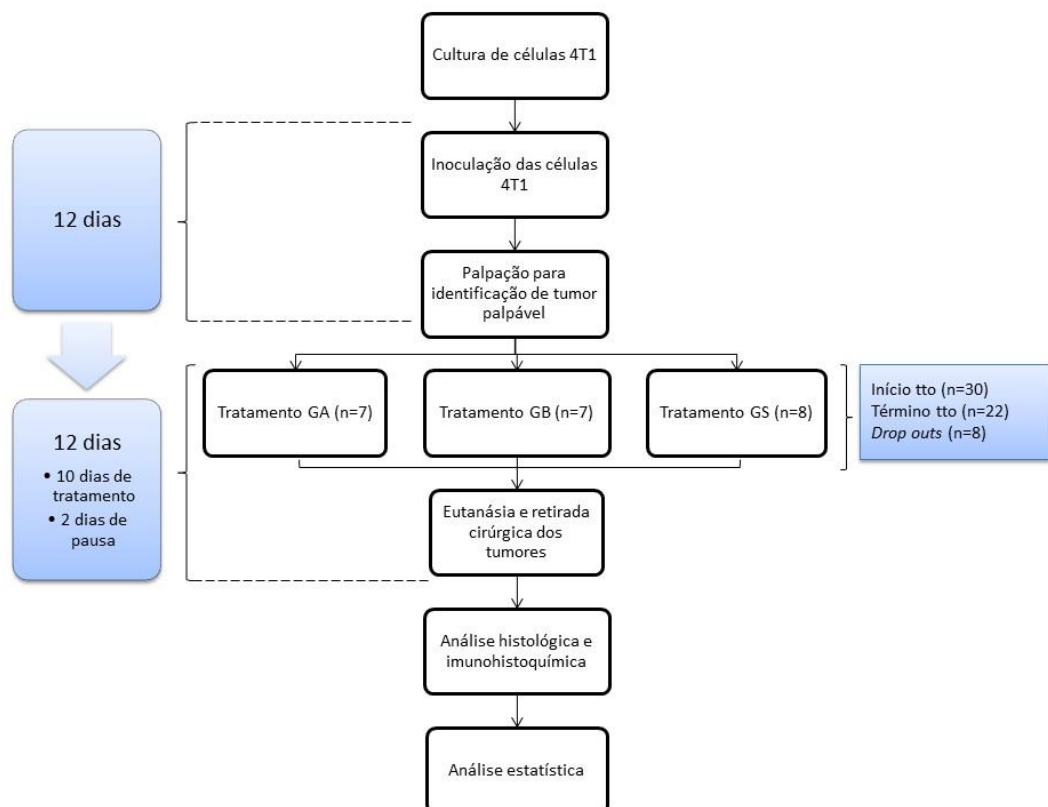


Figura 1. Fluxograma do protocolo de estudo. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo *sham*; tto - Tratamento.

A realização da TENS foi efetuada sempre pelo mesmo pesquisador e durante o mesmo período do dia. Animais que apresentaram ruptura importante da epiderme ao longo do experimento não receberam o tratamento, a fim de realizar a estimulação elétrica apenas de fibras A β em todos os animais, uma vez que lesões na epiderme podem alterar a impedância desta e a passagem da corrente em tecido lesionado pode estimular fibras A δ antes de estimular as fibras nervosas A α (Liebano et al., 2006; Robertson et al., 2009).

Foi realizada uma TENS convencional de pulso bifásico e simétrico por meio do equipamento Fes VIF, modelo 995-4, número de série 07x150, da QUARK® produtos médicos Indústria Brasileira, previamente calibrado (Figura 2).



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

Foram contruídos eletrodos de borracha siliconada carbonada de 1 cm² de área de superfície para a eletroestimulação dos animais a partir de eletrodos da QUARK® (Figura 3).



Figura 3. Eletrodo de silicone carbonado com 1 cm² de área de superfície.

Os eletrodos foram acoplados com gel hidrossolúvel e fixados com fita curativa hipoalergênica Micropore® (Nextcare – 3M) sob o tumor e imediatamente ao lado deste, na região abdominal (Figura 4).

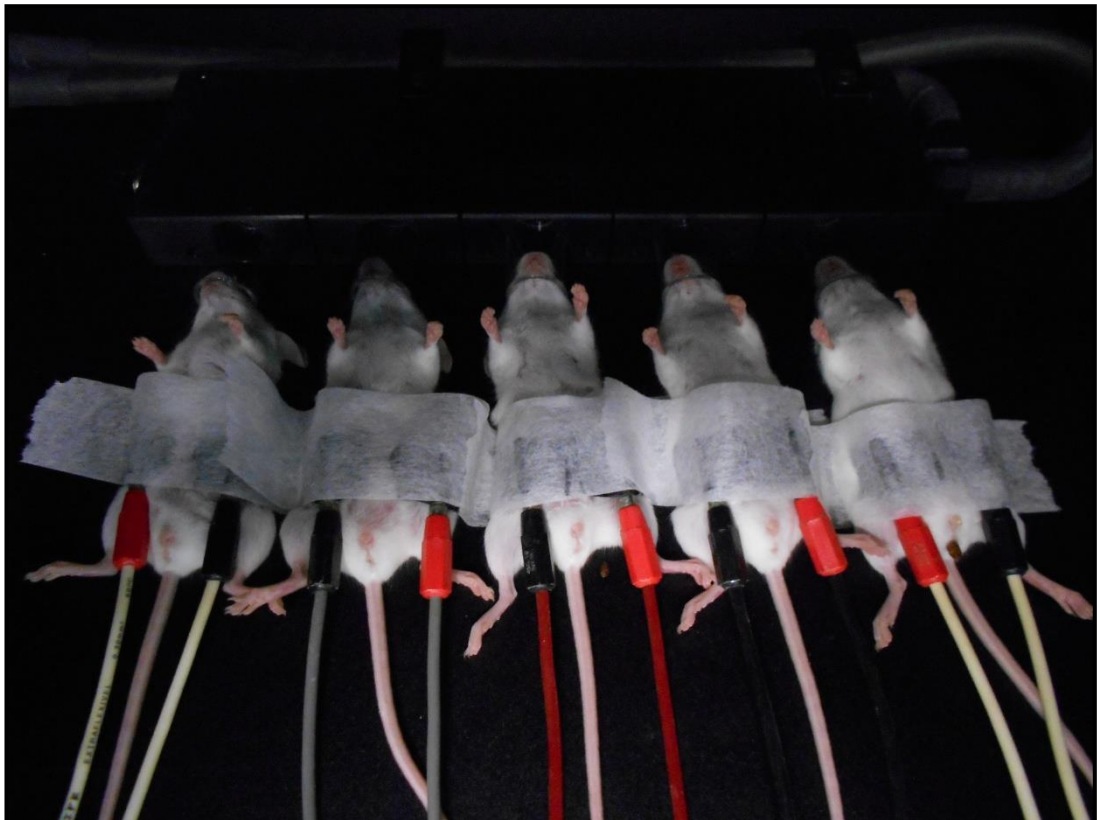


Figura 4. Fixação dos eletrodos com fita curativa hipoalergênica em região abdominal.

4.7 Protocolo experimental: Grupos de tratamento

Para realizar uma estimulação com intensidade sensorial máxima foi realizado um experimento prévio no qual quatro animais foram eletroestimulados na região abdominal até que fossem evidenciadas contrações musculares. Os parâmetros utilizados foram de 100 Hz de frequência portadora e 200 μ s de duração de pulso. Dos animais eletroestimulados, três apresentaram contração muscular com 4 mA, sendo estabelecido que a intensidade sensorial inicial máxima seria de 3,0 mA.

Para que não houvesse o fenômeno de acomodação sensorial, foi realizado um acréscimo de 1,0 mA a cada cinco minutos; porém, caso fosse evidenciada contração muscular após este, manter-se-ia a intensidade prévia.

Os grupos de animais foram tratados em ordem aleatória. 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 de Alta Frequência (GA): Foi tratado com frequência de 100 Hz, duração de pulso de 200 µs e intensidade sensorial inicial de 3,0 mA.
- Grupo de Baixa Frequência (GB): Foi tratado com frequência de 10 Hz, duração de pulso de 200 µs e intensidade sensorial inicial de 3,0 mA.
- Grupo Sham (GS): Os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos que os grupos supracitados, incluindo a inalação de isoflurano e fixação de eletrodos ao longo de 20 minutos, porém, os cabos do aparelho de TENS permaneceram desconectados.

Os animais foram tratados com diferentes frequências portadoras baseadas nos diferentes resultados de estudos prévios ao se utilizar frequências baixas e altas de TENS (Cramp et al., 2000; Liebano et al., 2008).

4.8 Eutanásia e armazenamento de material biológico

Todos os animais foram mortos 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 CO₂ (Linkov et al., 2012; Farcic et al., 2018) no mesmo período do dia. Os tumores foram extirpados e imersos em formol tamponado (3,7% em PBS) por pelo menos 18 horas; a seguir foi realizada lavagem com água destilada, uma vez por minuto, em temperatura ambiente, para a remoção total do formol; e, o material foi mantido em etanol 70% até o preparo dos cortes, em região central do tumor, para análise histológica.

4.9 Imunohistoquímica indireta para CD31

Foi utilizado o anticorpo monoclonal da Cell Signaling Technology®: anti-CD31 (PECAM-1; clone D8V9 XP®, cell signal #77699) que reconhece a proteína PECAM-1 expressa por células endoteliais.

Para a reação, os cortes histológicos foram desparafinados com xilol e hidratados usando concentrações graduadas de etanol à água destilada. Na recuperação antigênica pelo calor, as lâminas histológicas foram mergulhadas no tampão Tris buffer (0,5 M, pH 10) e levadas a um forno microondas por 15 minutos, em potência de 80%.

Seguindo bloqueio da atividade da peroxidase endógena (3% H₂O₂:metanol) e pré-incubação com soro normal de cabra a 10%, o anticorpo primário (anti-CD31 diluição: 1/20), diluído em 1x TBS/ 1% BSA, foi aplicado sobre os cortes por 12 horas a 4°C.

Após incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora a 37°C, a detecção colorimétrica foi realizada por meio do kit 3,3'-diaminobenzidina-DAB (DAKO, K3468) por 2 minutos em temperatura ambiente. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 1 minuto; e, a montagem das lâminas, processada com ERV-MOUNT (EasyPath, EP-MOUNT 1500). Entre cada etapa, as lâminas foram enxaguadas com as soluções de lavagem, 1x TBS/ 0,025% Triton X-100 e 1x TBS/ 0,1% Tween-20, por 5 minutos (x2-3, temperatura ambiente).

Para tal reação, o próprio tecido tumoral foi utilizado como controle positivo das marcações, e controle negativo sem incubação com os anticorpos primários. Foram realizados cortes histológicos tumorais centrais para cada lâmina submetida à reação imunohistoquímica.

Foi montada uma lâmina histológica por animal. O material foi observado em microscópio de luz com aumento total de 20 vezes, as imagens foram adquiridas utilizando o microscópio EVOS® FL Auto Imaging System no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

4.10 Impregnação argêntica para reticulina

A marcação histoquímica para demonstrar fibras reticulares argirofílicas foi realizada por meio de kit, seguindo metodologia padronizada (Kit EasyPath, Reticulina; Erviegas, cód. EP-12- 20021). As fibras reticulares foram visualizadas em negro por microscopia de luz com aumento total de 20 vezes; as imagens foram adquiridas utilizando o microscópio EVOS® FL Auto Imaging System no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

Foram tiradas cinco fotos aleatórias da área de tecido viável das lâminas de HE incubadas com CD31, lâminas de HE e lâminas de reticulina. Foi calculada a área de vasos sanguíneos, dos núcleos celulares e das fibras de reticulina.

4.11 Pré-processamento, processamento e análise de imagens

As imagens foram analisadas no software ImageJ 2.9.0/1.53t. Foi realizado o pré-processamento destas a partir do melhoramento de imagem; seguido do processamento por segmentação; e, por fim a análise destas por meio da área fracionada (Anexo 4). O protocolo utilizado foi baseado no trabalho de Nichelle et al. (2020).

4.12 Análise estatística

Foi utilizado o programa Jamovi 2.3.21 com um poder de 80%, nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos dados dos grupos; para verificar se há diferenças entre os grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, para dados de distribuição não-normal, e, para dados de distribuição normal, foi utilizado o teste One-Way ANOVA (Gosselin, 2019). Para calcular o tamanho de efeito foi utilizado o *Epsilon-squared* (ϵ^2), quando performado o teste

Kruskal-Wallis, e diferença das médias F, para o teste One-Way ANOVA. Os gráficos utilizados foram feitos a partir da recomendação de In e Lee (2017).

5.0 RESULTADOS

Todas as lâminas referentes aos 22 animais (após aplicados os critérios de exclusão) foram utilizadas nestas análises.

5.1 Angiogênese

5.1.1 Pré-processamento

Para se calcular a área de vasos sanguíneos, foi utilizado o pré-processamento por deconvolução em H&E DAB, sendo selecionado o canal 3 (Figura 5A). Após isto, foi realizado o melhoramento de imagem, sendo ajustado o brilho e contraste de cada imagem individualmente, a fim de se obter o maior contraste possível entre o objeto de avaliação e o plano de fundo. Para tal, foi colocado o valor mínimo à esquerda do histograma (Figura 5B), seguido da diminuição do valor máximo, a fim de se excluir o plano de fundo; porém, o valor máximo não seria baixo a ponto de esmaecer o objeto de estudo (Figura 5C) e, posteriormente, foi aumentado o contraste ao máximo, para diminuir a interferência do plano de fundo (Figura 5D).

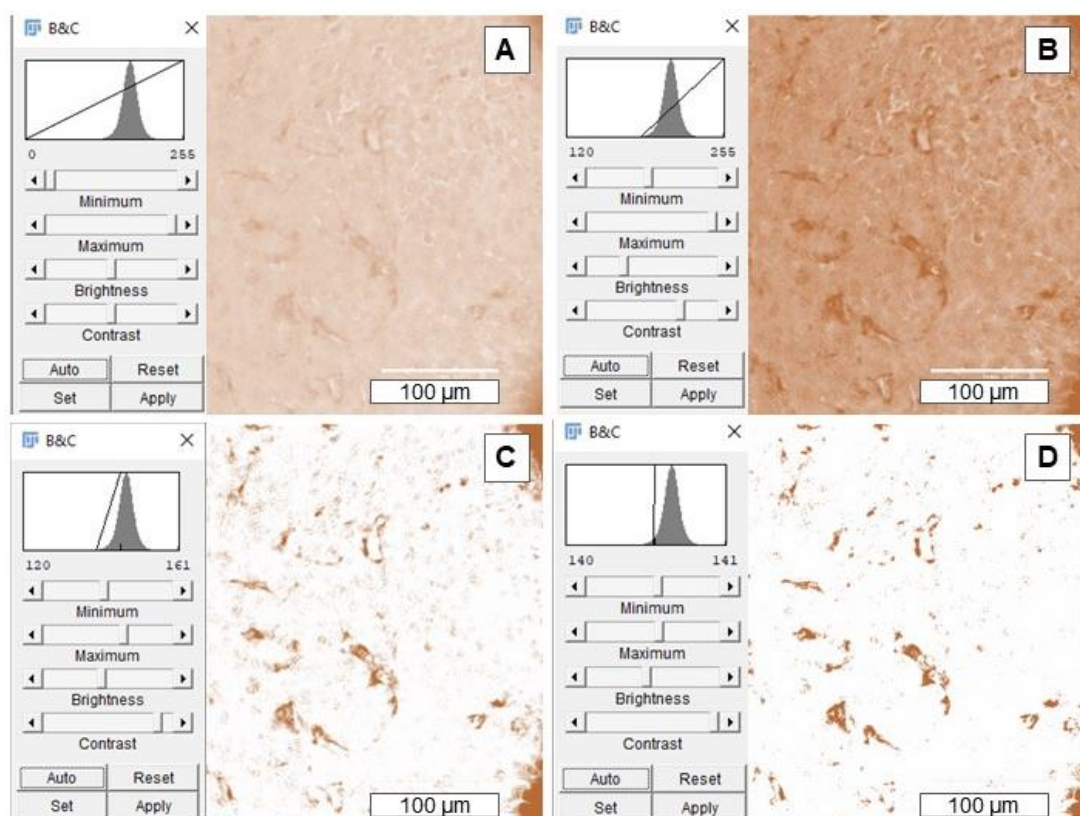


Figura 5. Pré-processamento das imagens de imunohistoquímica. Legenda: A – Deconvolução H&E DAB canal 3; B – Ajuste mínimo de brilho; C – Ajuste máximo de brilho; D – Ajuste máximo de contraste.

5.1.2 Processamento

O processamento das imagens se deu pela segmentação destas por *auto local threshold*. A seleção destes foi baseada na literatura junto à análise qualitativa (Figura 6).

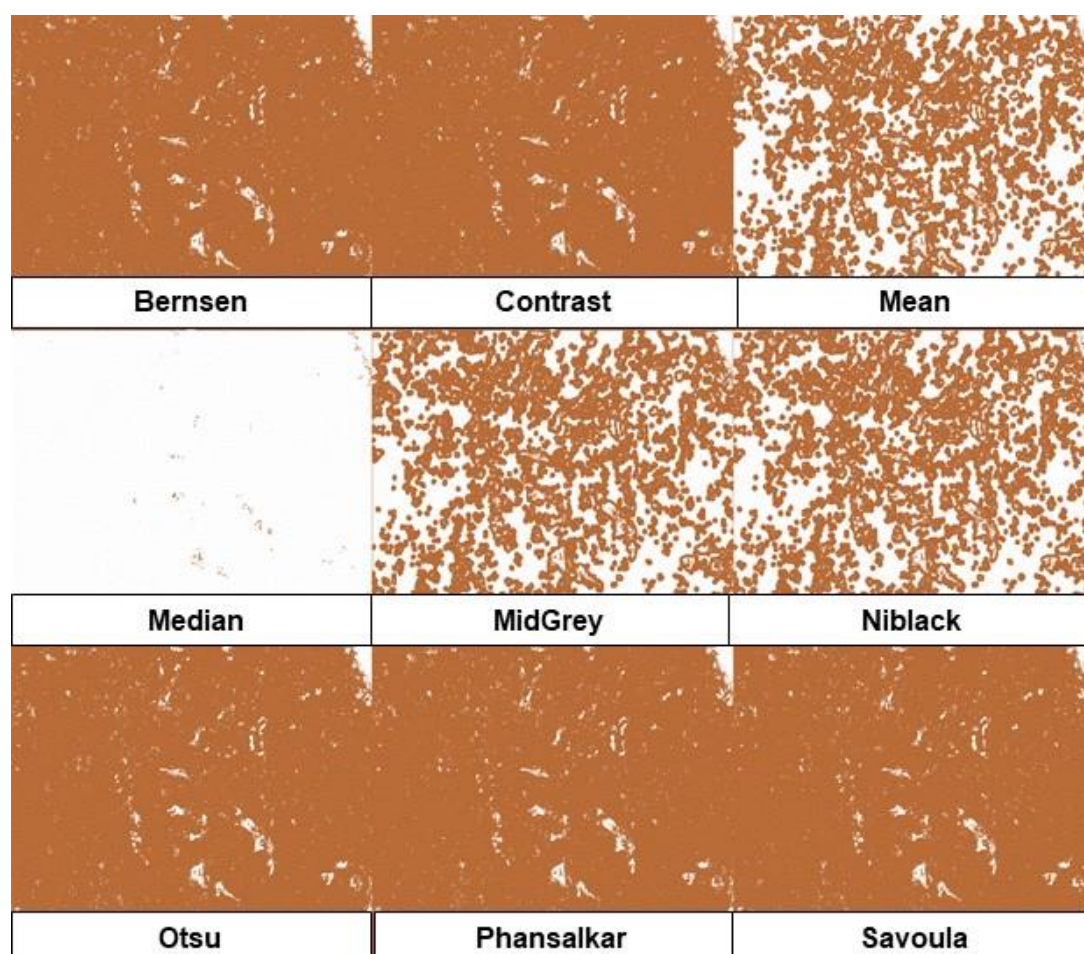


Figura 6. Análise de *auto local thresholds* para imunohistoquímica. As áreas em branco correspondem ao objeto de análise.

Foi determinado o uso do *auto local threshold* denominado como Otsu (Figura 7A). Foram utilizados os valores padrões do *software* (*radius* = 15; *parameter 1* = 0; *parameter 2* = 0). O valor de *radius* utilizado foi de 15, onde ao se comparar o valor 3 com 15, ambos apresentaram resultado semelhante (Figuras 7B e 7C).

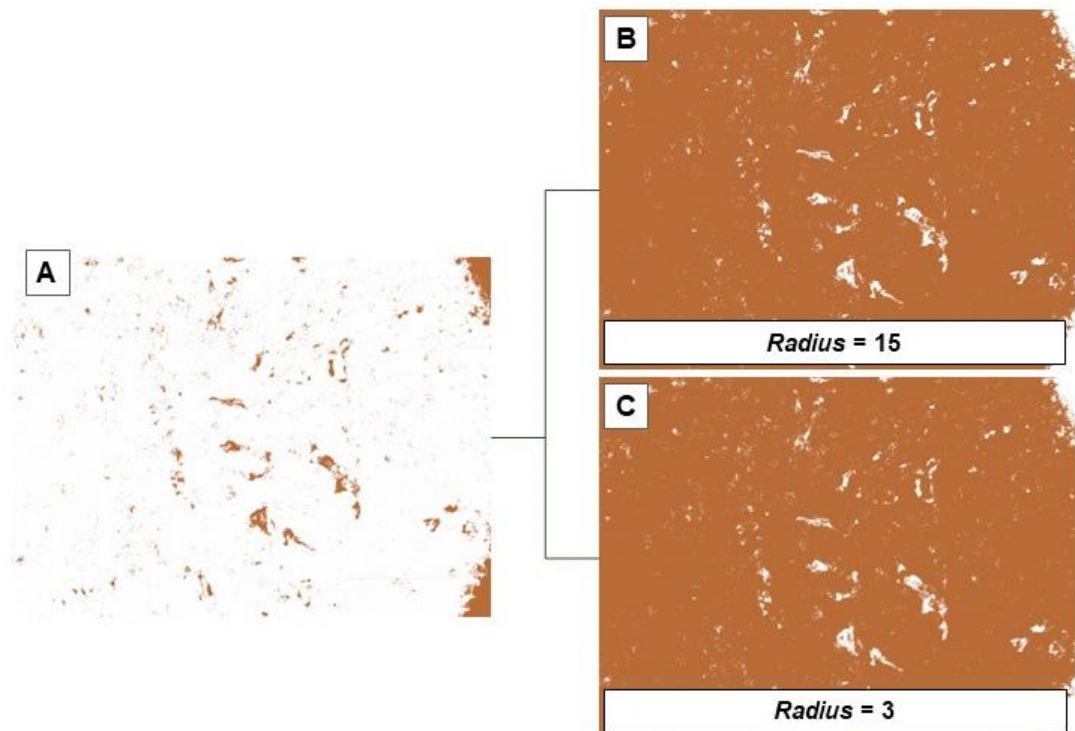


Figura 7. Teste de *radius* para imunohistoquímica. As áreas em branco correspondem ao objeto de análise. Legenda: A – Imagem pré-processada; B – Imagem segmentada com *radius* = 15; C – Imagem segmentada com *radius* = 3.

5.1.3 Análise

A área fracionada dos vasos sanguíneos foi calculada pelo *software* ImageJ.

O teste Shapiro-Wilk mostrou uma distribuição não-normal em GA ($p=0,049$). O teste de Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferenças entre os grupos para a área fracionada de vasos sanguíneos ($p=0,612$; $\varepsilon^2=0,0467$) (Figuras 8, Gráfico 1).

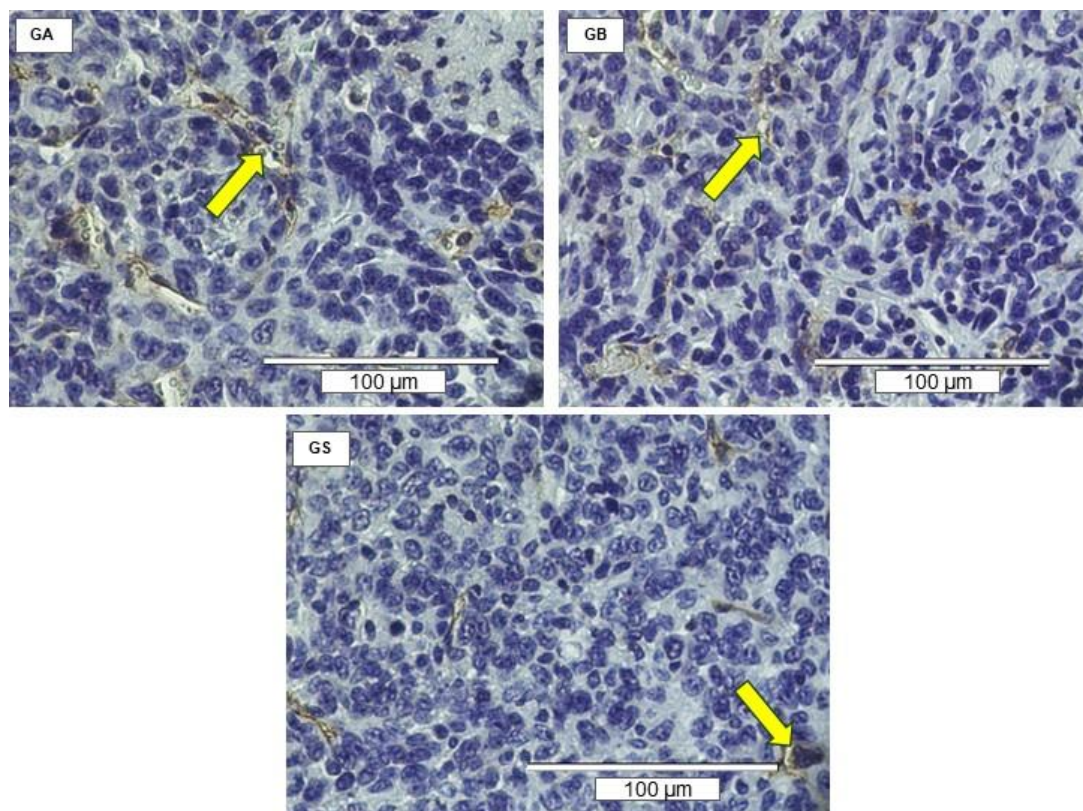


Figura 8. Fração da área de vasos sanguíneos por grupo. Os vasos sanguíneos são evidenciados pela coloração amarronzada como o indicado pela seta amarela. As células dentro destes, de aspecto translúcido, são as hemácias. Os vasos sanguíneos evidenciados se apresentam colabados. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo *Sham*.

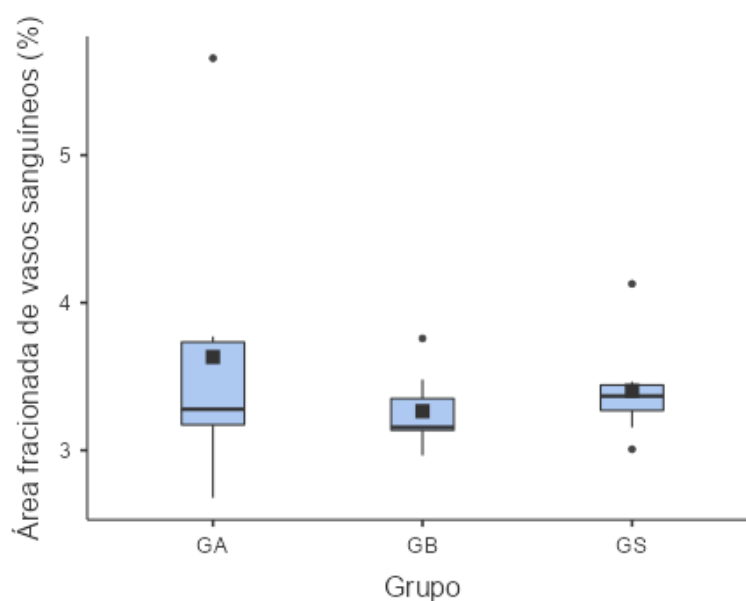


Gráfico 1. Fração da área de vasos sanguíneos por grupo. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo *Sham*; ■ - média; • - outlier.

5.2 Proliferação celular

5.2.1 Pré-processamento

Para se calcular a área dos núcleos celulares, bem como a quantidade destes, foi utilizado o pré-processamento por melhoramento de imagem, a partir do balanço de cores. Foram balanceadas as cores azul e vermelha de cada imagem individualmente, a fim de se destacar os núcleos do citoplasma e do interstício celular. Foi destacada a metade esquerda do histograma das cores supramencionadas (Figura 9).

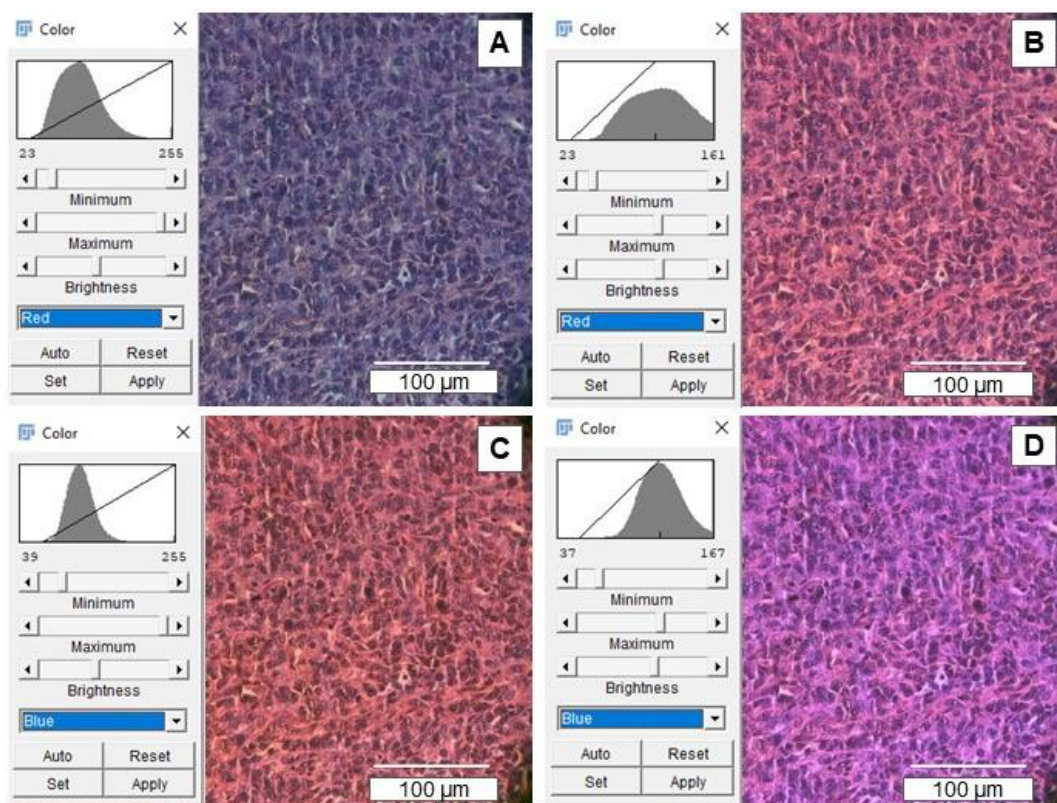


Figura 9. Balanceamento de cores. Legenda: A – Ajuste mínimo do comprimento de onda da cor vermelha; B – Ajuste máximo do comprimento de onda da cor vermelha; C – Ajuste mínimo do comprimento de onda da cor azul; D – Ajuste máximo do comprimento de onda da cor azul.

As etapas a seguir foram realizadas baseadas no trabalho de Nichelle et al. (2020). Foi feita a dissociação entre os canais das cores primárias e, desta forma, foi selecionando o canal azul (Figura 10A). Para se obter o maior contraste possível entre o objeto de avaliação e o plano de fundo foi utilizado o melhoramento de contraste automático, com um histograma equalizado e saturação de pixels padrão em 0,35% (Figura 10B). Em seguida, foi aplicada a função *despeckle* para a redução de ruído na imagem (Figura 10C).

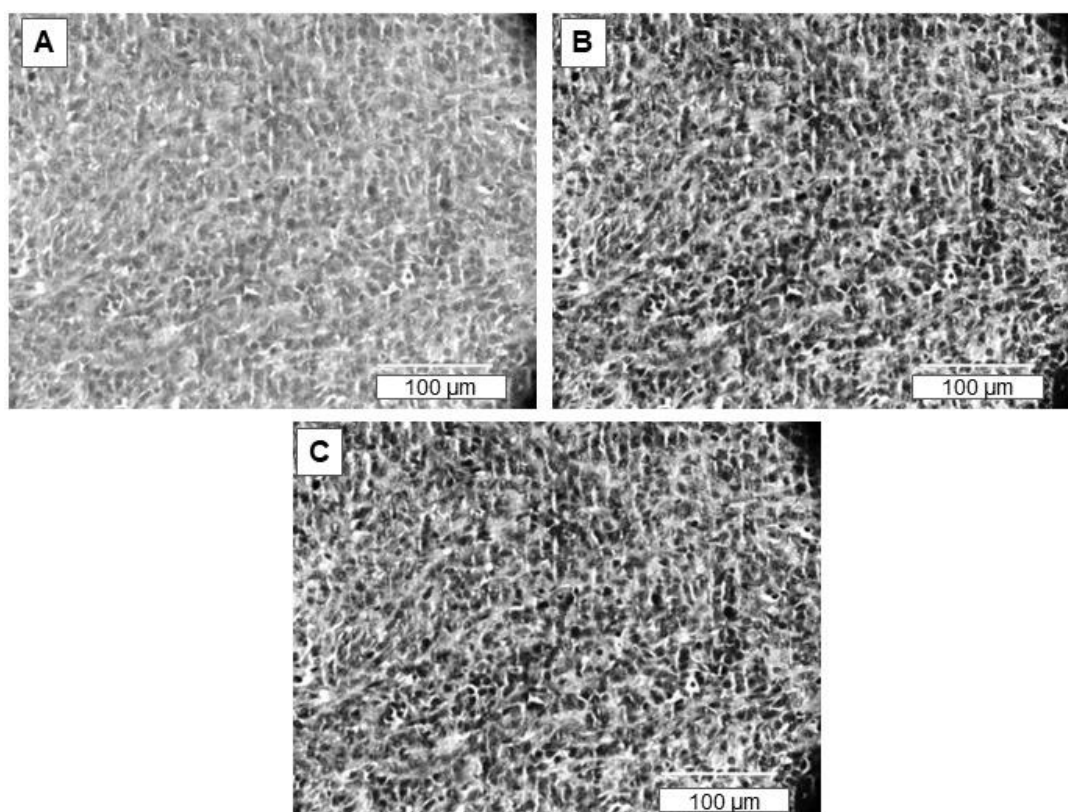


Figura 10. Pré-processamento das imagens de HE. Legenda: A – Canal azul da imagem previamente balanceada; B – Melhoramento de contraste; C – Redução de ruído.

5.2.2 Processamento

O processamento das imagens se deu pela segmentação destas por *auto local threshold*. A seleção destes foi baseada na literatura junto à análise qualitativa (Figura 11).

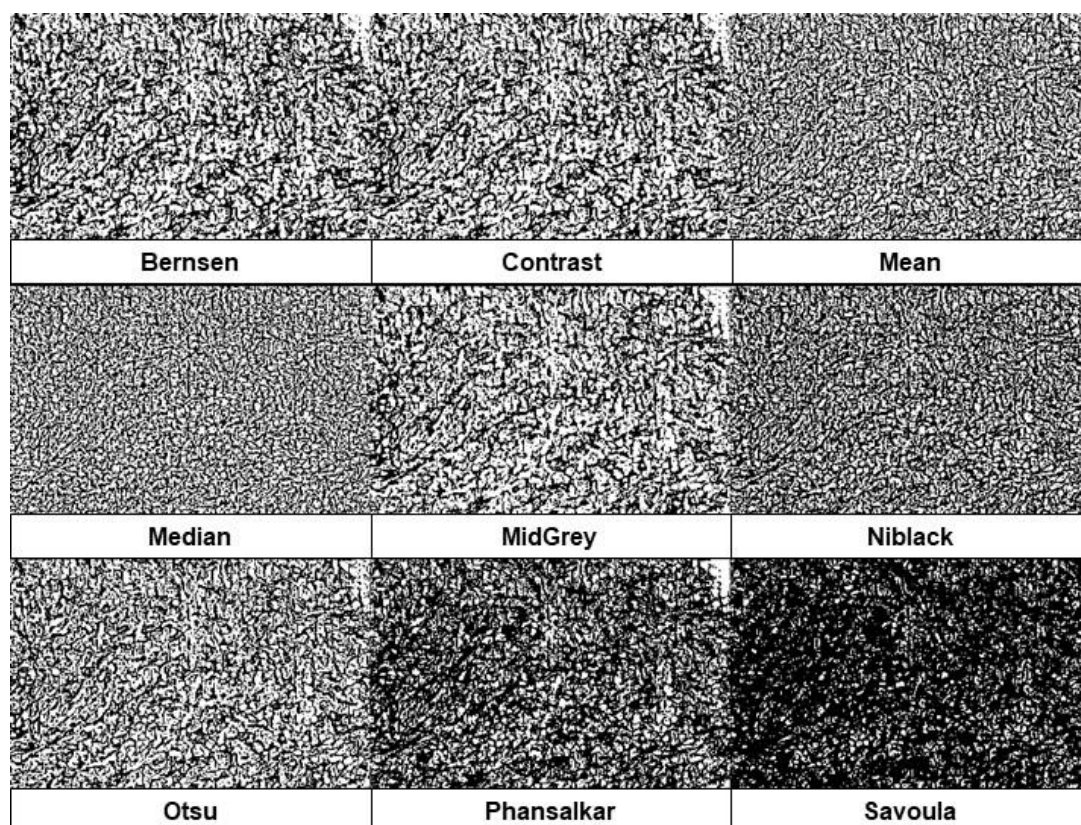


Figura 11. Análise de *auto local thresholds* para imagens de HE. As áreas em branco correspondem ao objeto de análise.

Foi determinado o uso do *auto local threshold* denominado como Savoula (Figura 12A). Foram utilizados os valores padrões do *software* (*radius* = 15; *parameter 1* = 0; *parameter 2* = 0). O valor de *radius* foi de 15, onde ao se comparar o valor 3 com 15, o último foi mais preciso, como visto em Nichelle et al. (2020) (Figura 12B e 12C).

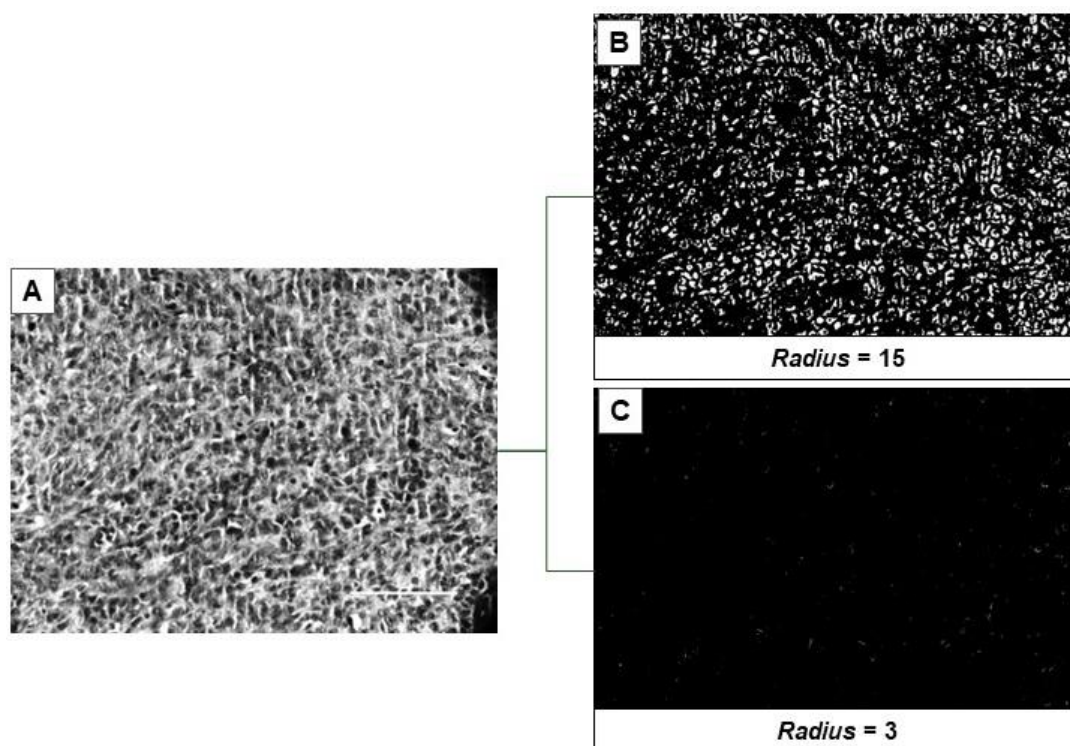


Figura 12. Teste de *radius* para HE. As áreas em branco correspondem ao objeto de análise. Legenda: A – Imagem pré-processada; B – Imagem segmentada com *radius* = 15; C – Imagem segmentada com *radius* = 3.

5.2.3 Análise

A área fracionada dos núcleos celulares foi computada pelo *software* ImageJ.

Para realizar a análise de partículas, foram estabelecidas faixas para área e para circularidade de todos os grupos avaliados. Ao estabelecer uma caracterização da área e da circularidade das diferentes áreas de necrose e de tecido viável, a análise final poderia ser realizada de forma direcionada ao tecido viável, uma vez que as células do infiltrado inflamatório têm tamanhos e formas diferentes do tecido viável.

Foram calculadas a área e a circularidade de cinco células da área de necrose tecidual dentro do tecido viável e do tecido viável de dois animais por grupo, totalizando seis animais (30 células para região).

Os valores foram computados no *software* Jamovi e foi evidenciado grande desvio padrão e intersecção dos valores entre cada região, tanto para a área dos núcleos quanto para a circularidade destes (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação de área e circularidade dos núcleos celulares por região do tecido neoplásico viável

Estatística descritiva	Região	Área (pixel²)	Circularidade
Média	Necrose	293	0,718
	Tecido viável	404	0,775
Mediana	Necrose	241	0,724
	Tecido viável	376	0,800
Desvio padrão	Necrose	207	0,0974
	Tecido viável	131	0,0795
Mínimo	Necrose	94	0,477
	Tecido viável	163	0,598
Máximo	Necrose	967	0,887
	Tecido viável	771	0,913
Shapiro-Wilk p	Necrose	< ,001	0,610
	Tecido viável	0,366	0,318

A partir desses resultados foram realizados testes com 0; 100 e 241 pixels² de valor mínimo de área com circularidade de 0-1 (Figura 13).

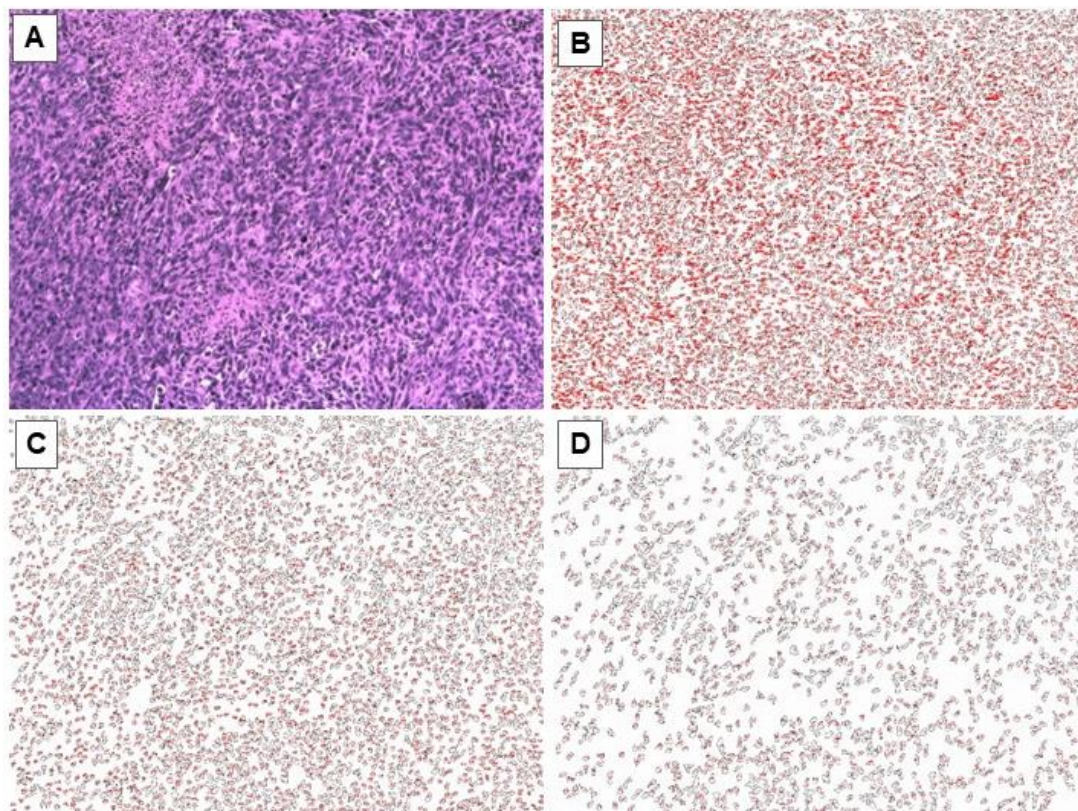


Figura 13. Análise de diferentes valores mínimos de área nuclear. Legenda: A – Imagem original de lâmina de HE; B – Imagem analisada sem valor mínimo de área de partícula; C – Imagem analisada com valor mínimo de área de partícula de 100 pixels²; D - Imagem analisada com valor mínimo de área de partícula de 241 pixels².

Após análise qualitativa, foi estabelecido que seria utilizada a faixa de 100-10.000 pixels² para área e de 0-1 para circularidade.

O teste Shapiro-Wilk mostrou uma distribuição normal em todos os grupos para fração de área de núcleos celulares ($p > 0,05$). O teste de One-Way ANOVA não evidenciou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,152$ e $F = 2,08$) e o teste de Lavene evidenciou homogeneidade das variâncias ($p = 0,176$) (Figura 14 e Gráfico 2).

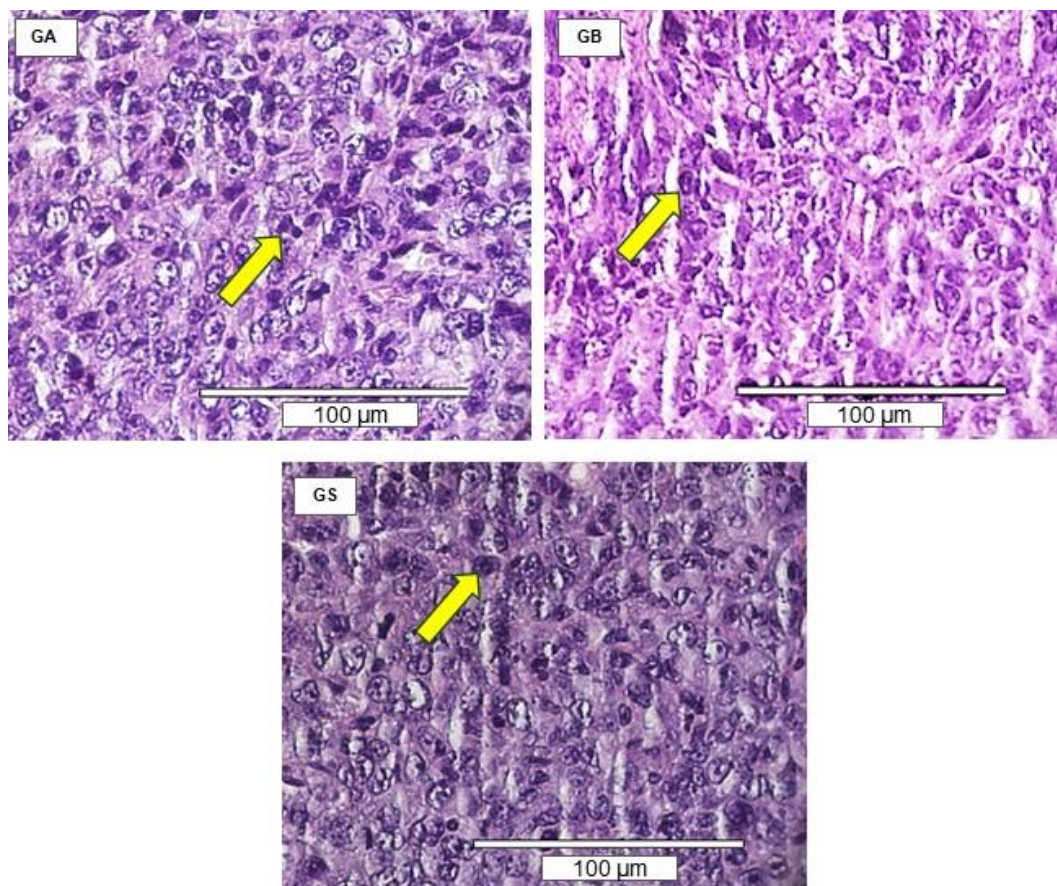


Figura 14. Lâminas de Hematoxilina e Eosina. Os núcleos são visualizados com coloração roxa escura como o evidenciado pela seta amarela. A análise se deu a partir da área ocupada pelos núcleos em relação à imagem completa. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo *Sham*.

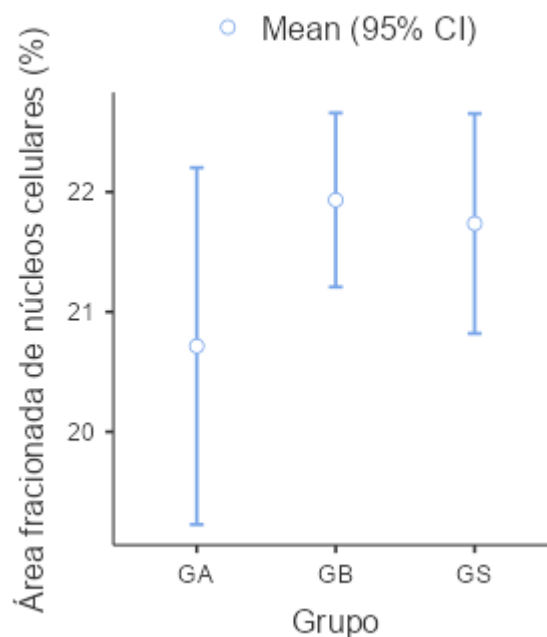


Gráfico 2. Fração de área de núcleos por grupo para lâminas de HE. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo *Sham*; CI – Intervalo de confiança.

5.3 Fibras de reticulina

5.3.1 Pré-processamento

Para se calcular a área das fibras de reticulina, foi utilizado o pré-processamento por deconvolução em Masson Trichrome, sendo selecionado o canal 1 (Figura 15A). Após isto, foi realizado o melhoramento de imagem, sendo ajustado o brilho e contraste de cada imagem individualmente, a fim de se obter o maior contraste possível entre o objeto de avaliação e o plano de fundo. Para tal, foi colocado o valor mínimo à esquerda do histograma (Figura 15B), seguido da diminuição do valor máximo, a fim de se excluir o plano de fundo; porém, o valor máximo não seria baixo a ponto de esmaecer o objeto de estudo (Figura 15C) e, posteriormente, foi aumentado o contraste ao máximo, para diminuir a interferência do plano de fundo (Figura 15D).

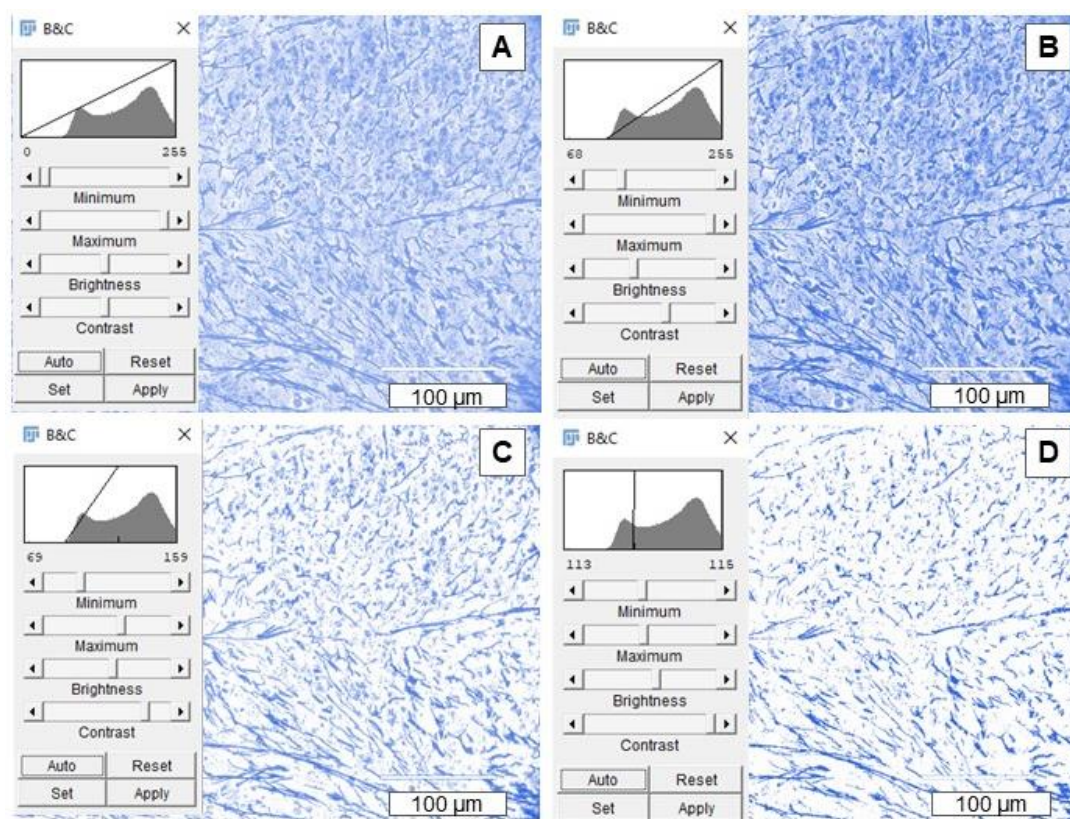


Figura 15. Pré-processamento das imagens de fibras de reticulina. Legenda: A – Deconvolução Masson Trichrome no canal 1; B – Ajuste mínimo de brilho; C – Ajuste máximo de brilho; D – Ajuste máximo de contraste.

5.3.2 Processamento

O processamento das imagens se deu pela segmentação destas por *auto local threshold*. A seleção destes foi baseada na literatura junto à análise qualitativa (Figura 16).

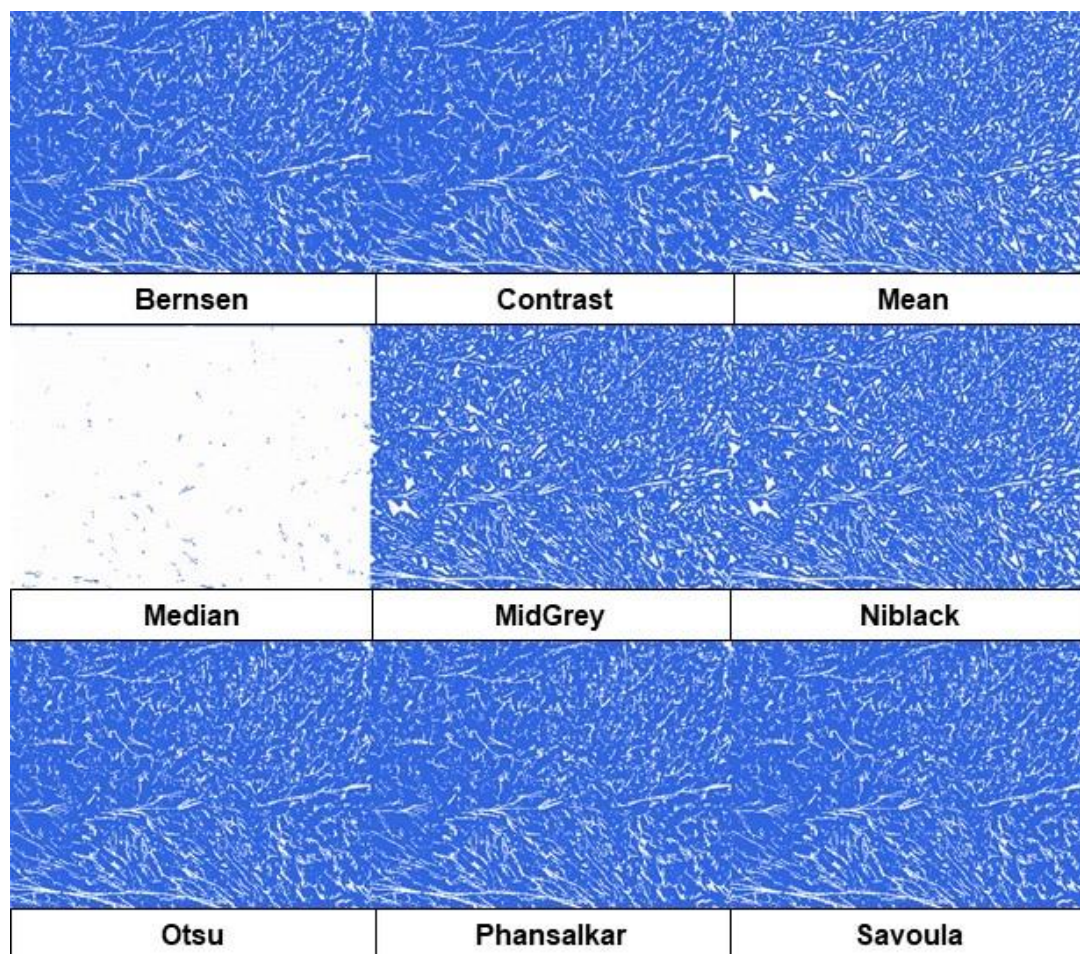


Figura 16. Análise de *auto local thresholds* para imagens de reticulina. As áreas em branco correspondem ao o objeto de análise.

Foi determinado o uso do *auto local threshold* denominado como Otsu (Figura 17A). Foram utilizados os valores padrões do software ($radius = 15$; $parameter\ 1 = 0$; $parameter\ 2 = 0$). O valor de *radius* utilizado foi de 15, onde ao se comparar o valor 3 com 15, ambos apresentaram resultado semelhante (Figuras 17B e 17C).

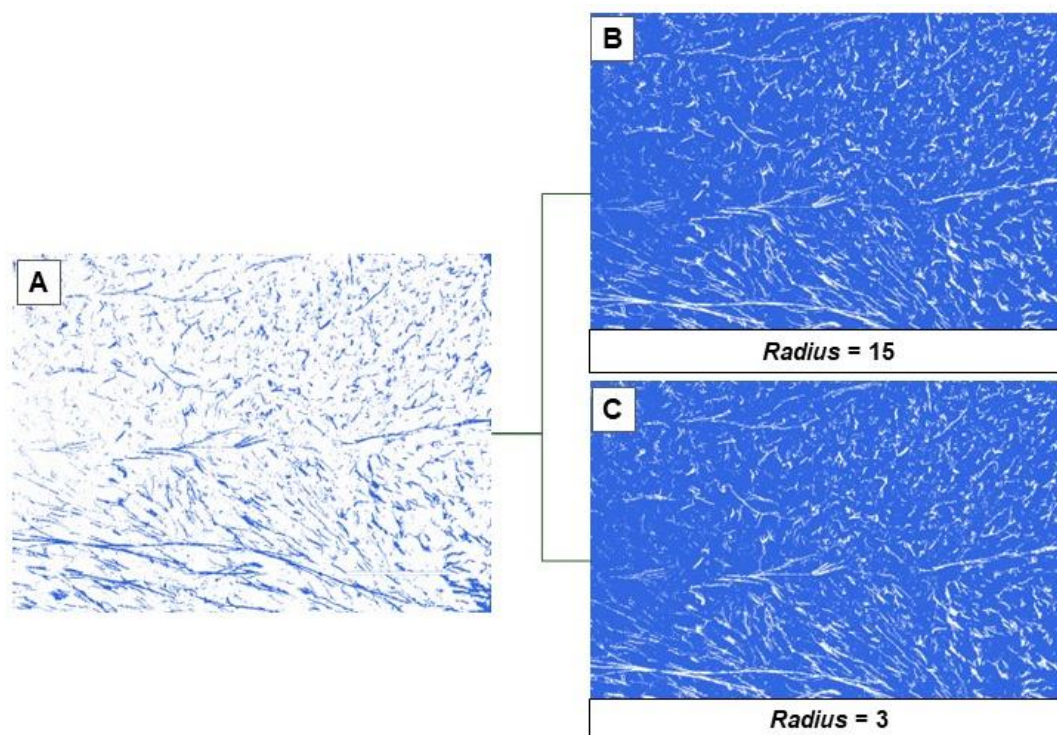


Figura 17. Teste de *radius* para fibras de reticulina. As áreas em branco correspondem ao objeto de análise. Legenda: A – Imagem pré-processada; B – Imagem segmentada com *radius* = 15; C – Imagem segmentada com *radius* = 3.

5.3.3 Análise

A área fracionada das fibras de reticulina foi calculada pelo *software* ImageJ.

O teste Shapiro-Wilk mostrou uma distribuição normal em todos os grupos ($p > 0,05$). O teste One-Way ANOVA evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,045$; $F = 3,67$) e o teste de Laveine mostrou homogeneidade entre as variâncias ($p = 0,720$). O teste *post-hoc* de Turkey de comparações múltiplas não detectou diferença entre GA vs. GB ($p = 0,708$; diferença de médias = -1,26%) e GB vs. GS ($p = 0,195$; diferença de médias = -2,76%) porém, houve diferença entre GA vs. GS ($p = 0,042$; diferença de médias = -4,02%) (Figura 18, Gráfico 4).

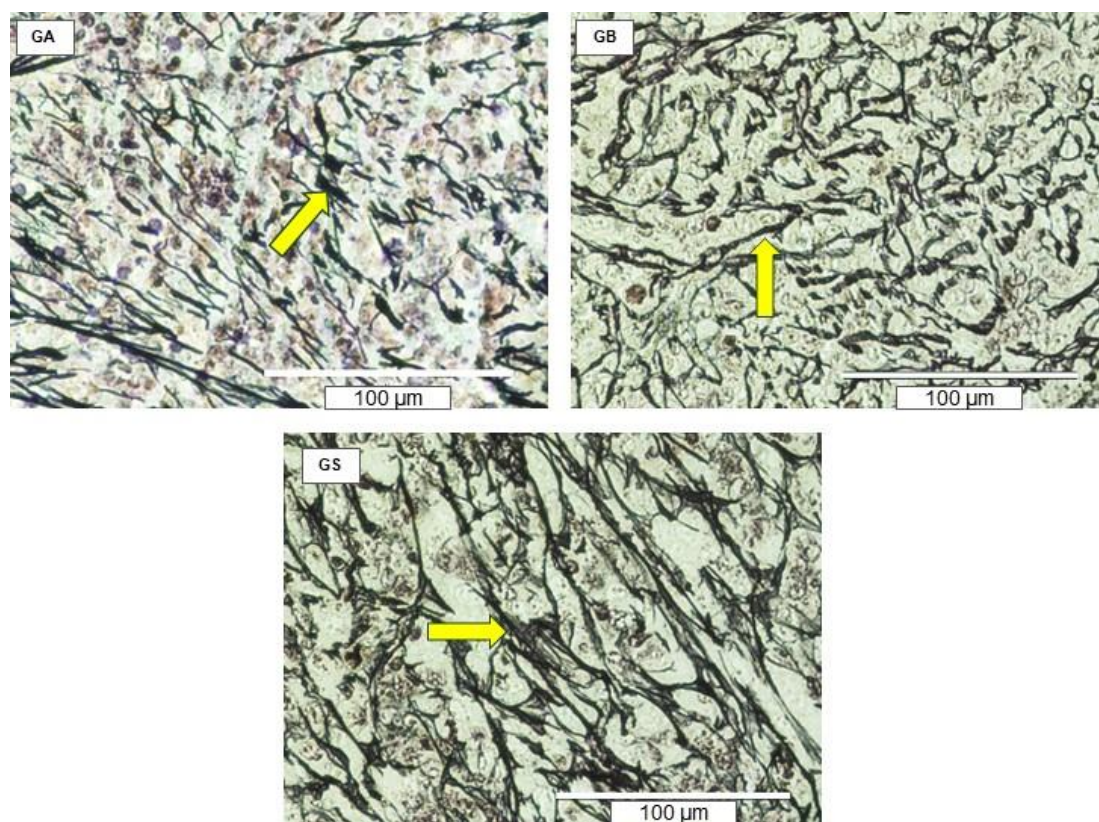


Figura 18. Fibras de reticulina. As fibras de reticulina se apresentam com aspecto preto como o indicado pela seta amarela. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo Sham.

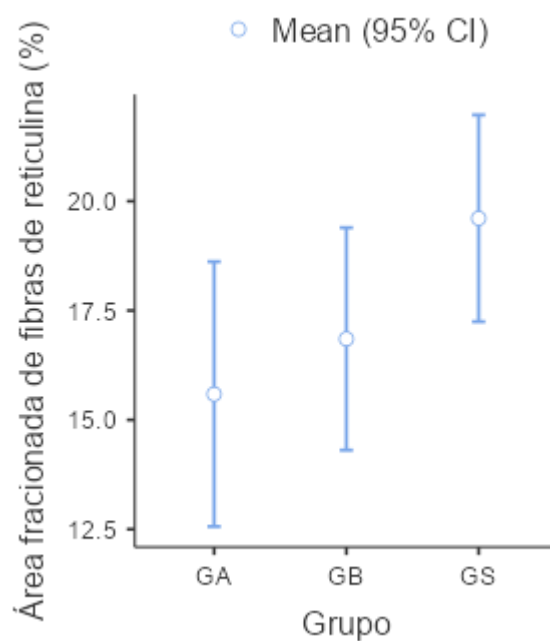


Gráfico 3. Fração da área de fibras de reticulina por grupo. Legenda: GA - Grupo de alta frequência; GB - Grupo de baixa frequência; GS - Grupo *Sham*; CI – Intervalo de confiança.

6.0 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a TENS, de baixa e alta frequência e com intensidade sensorial, não influenciou na angiogênese, nem na proliferação celular; e, acarretou em inibição das fibras de reticulina do carcinoma de mama 4T1, quando utilizada a alta frequência.

O carcinoma 4T1 tem como vantagens ser de fácil manuseio *in vitro* e *in vivo* e, deter características próximas ao câncer de mama em seres humanos, tais como o fato das metástases serem advindas do tumor primário e estas ocorrerem nos mesmos sítios quando comparados aos humanos (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 2001).

Existem poucos trabalhos que avaliaram a influência da eletroestimulação em tumores (Jarm et al., 2003; Janigro et al., 2006; Linkov et al., 2012; Wang et al., 2018). Os resultados deste estudo corroboram com os trabalhos de Linkov et al. (2012) e Wang et al. (2018), em que correntes elétricas terapêuticas foram aplicadas sobre tumores e não houve influência destas na angiogênese e proliferação celular em tecidos tumorais.

Por outro lado, Machado et al., (2016) mostraram que a TENS modulou a angiogênese e a reparação tecidual em ratos com lesões tegumentares excisionais agudas não tumorais. Os grupos experimentais ativos apresentaram aumento de densidade vascular nas fases iniciais da reparação, imediatamente pós-lesão; enquanto que, no 14º dia tinham uma densidade vascular inferior à do grupo controle. Portanto, se levarmos em conta que o microambiente tumoral é um ambiente de inflamação crônica (Onuchic e Chammas, 2011), não seria esperado que a TENS promovesse angiogênese.

No que diz respeito à celularidade, a revisão narrativa de Love et al. (2018) mostra os efeitos de diferentes correntes elétricas na proliferação celular e apoptose nas mais variadas células (cancerígenas ou não). Os resultados, tanto para proliferação celular quanto para apoptose, são

inconclusivos, pois a estimulação elétrica pode inibir, estimular ou não alterar estas. Os autores recomendam que sejam realizados estudos para definir parâmetros ótimos para estes desfechos bem como para testar procedimentos mais eficazes, o que indica a importância de realizarmos estudos pré-clínicos que avaliem este desfecho.

Linkov et al. (2012) utilizaram uma corrente pulsada, bifásica e simétrica, assim como no presente estudo; porém, Linkov et al. (2012) realizaram uma NMES e, para isto, a intensidade utilizada foi motora, o que é uma importante diferença metodológica entre este trabalho e o presente estudo, uma vez que pesquisadores têm mostrado resultados distintos ao aplicar TENS com diferentes intensidades (Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2002; Liebano et al., 2006; 2008).

Wang et al. (2018) aplicaram TENS sobre um câncer cervical (SiHa) em camundongos Balb/c nudes; porém, não especificaram as características físicas da corrente, ou seja, o tipo de corrente, quais os números de fases, balanço e simetria.

A definição de TENS é muito abrangente. Segundo Jones e Jonhson (2009) é uma corrente elétrica terapêutica que estimula nervos abaixo do tecido tegumentar; porém, diversas características físicas das correntes elétricas terapêuticas acarretam em efeitos fisiológicos diferentes (Robertson et al., 2009), o que pode ser evidenciado ao comparar o presente estudo com o trabalho de Jarm et al. (2003), no qual houve redução do tamanho do tumor após aplicação de corrente direta.

Wang et al. (2018) descrevem a frequência da corrente como 1/4/1 Hz e a duração de pulso de 230/270/230 μ s, esta descrição pode indicar que a corrente utilizada foi modulada com variação de frequência e duração de pulso, mas isto não fica claro.

A intensidade utilizada por Wang et al. (2018) foi de 20 mA de forma fixa. Este método de manter a intensidade com valores pré-estabelecidos é recorrente em estudos experimentais com TENS (Liebano et al., 2006; Machado et al., 2016); porém, é importante que a(s) fibra(s) nervosa(s)

excitada(s) seja(m) especificada(s), pois estas geram respostas fisiológicas diferentes (Liebano et al., 2006; Robertson et al., 2009).

O trabalho de Liebano et al. (2006) mostrou que os animais tratados com 20 mA apresentaram fortes contrações musculares, portanto, é possível especular que os animais tratados por Wang et al. (2018) podem ter sido estimulados com intensidade motora e/ou dolorosa; porém, o ideal é que os autores mencionem isto, uma vez que a estimulação de diferentes fibras nervosas dependem da intensidade, duração de pulso, área de superfície do eletrodo e densidade de corrente (Liebano et al., 2006; Robertson et al., 2009).

Outro ponto importante a ser destacado do trabalho de Wang et al. (2018) é que o tratamento foi de um único dia, porém, a avaliação do crescimento tumoral foi realizada ao longo de 28 dias. Esta aplicação única difere da maioria dos estudos experimentais sobre TENS (Liebano et al., 2006; 2008; Machado et al., 2016; 2017), assim como da aplicação clínica deste recurso. Estas diferenças metodológicas entre o estudo de Wang et al. (2018) e o presente estudo, dificultam a comparação entre estes.

Apesar de diferentes autores mostrarem os efeitos da TENS sobre fluxo sanguíneo, temperatura tecidual e reparação tecidual, os resultados deste estudo indicam que a TENS não teve influência sobre estes eventos, ou não os promoveu de tal forma que levasse a angiogênese e proliferação celular do carcinoma 4T1 (Indergrand e Morgan, 1994; Scudds et al., 1995; Cramp et al., 2000; 2002; Sherry et al., 2001; Liebano et al., 2006; 2008; Machado et al., 2016; 2017).

Isto pode se dar pelo fato de o tratamento, no presente estudo, ter sido realizado com intensidade sensorial; sendo assim, não ocorreu o mecanismo de bomba muscular, que pode ser desencadeado pela estimulação elétrica de intensidade motora, produzindo substâncias que relaxariam o endotélio vascular, e aumentariam assim o fluxo sanguíneo (Scudds et al., 1995; Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2002). Porém a atividade física é indicada para pacientes oncológicos, pois estudos apontam que esta reduz o risco,

recorrência e mortalidade de pacientes acometidos por câncer de mama (Xu e Rogers, 2020).

A estimulação de intensidade sensorial também não deve ter gerado o reflexo axonal, uma vez que este é deflagrado pela estimulação de fibras nervosas A δ e fibras C (Scudds et al., 1995). O reflexo axonal acarreta na liberação de neuropeptídeos que são potentes vasodilatadores como o CGRP e a SP (Khalil et al., 2001; Liebano et al., 2006; 2008; Machado et al., 2016).

Uma forma de evitar a ocorrência do reflexo axonal, provocada por estímulos dolorosos intensos, e garantir que os animais fossem estimulados apenas com intensidade sensorial, foi excluir aqueles com lesões na epiderme; uma vez que isto pode acarretar em uma alteração da impedância e, assim, a passagem da corrente em tecido lesionado pode ativar fibras A δ antes de estimular as fibras nervosas A α (Liebano et al., 2006; Robertson et al., 2009).

Estudos que avaliam os efeitos da TENS no fluxo sanguíneo mostram que este é aumentado ao se utilizar frequências baixas (Cramp et al., 2000; 2002) e intensidades motoras (Sherry et al., 2001; Cramp et al., 2002; Sandberg et al., 2007). Estes resultados corroboram com o presente estudo, indicando que a TENS de alta frequência e intensidade sensorial é mais segura ao se estimular um tumor diretamente.

Caso a TENS não promova aumento do fluxo sanguíneo, a nutrição das células tumorais não deve ser aumentada, seja de forma direta ou indireta (aumento da temperatura tecidual) (Scudds et al., 1995). Se a temperatura tecidual não for aumentada, é possível que não ocorra aumento do metabolismo local, uma vez que a lei de Van't Hoff indica que, a cada 4°C adicionais, há um acréscimo de 50% do metabolismo (Robertson et al., 2009); e, assim, não haverá influência sobre a atividade mitótica das células tumorais (Rennie, 2011) por este mecanismo.

O presente estudo evidenciou que a TENS de alta frequência promoveu uma inibição na deposição das fibras de reticulina. Este resultado pode ser interessante para o tratamento de pacientes oncológicos uma vez que

Shehata et al. (2004) mostraram que uma maior deposição dessas fibras podem ser um fator prognóstico importante para o crescimento tumoral induzido pelo TGF- β 1. Junto disto, o trabalho de Wang et al. (2015) evidenciou uma inibição do TGF- β 1 e do colágeno tipo III após estimulação elétrica de baixa intensidade no ramo auricular do nervo vago bem como uma diminuição da deposição de colágeno tipo III.

O fato da TENS de alta frequência ter inibido a formação de fibras de reticulina pode se dar pela inibição da proliferação de colágeno tipo III, como o visto nos resultados de Folha et al. (2015) ao aplicar TENS em tendões; uma vez que as fibras de reticulina são formadas pela associação de colágeno tipo III e outros tipos de colágeno como o tipo V (Ushuki, 2002).

Folha et al. (2015) justificam em seus resultados, a partir da lei de Arndt-Schultz, que a TENS pode ter sido utilizada em uma quantidade de energia excessiva a ponto de causar bioinibição do colágeno tipo I e III, sendo usada uma intensidade correspondente à 90% do limiar motor, portanto, uma intensidade sensorial.

É possível que esta bioinibição tenha ocorrido na deposição de colágeno tipo III e, conseqüentemente, na formação das fibras de reticulina do carcinoma 4T1, pois a intensidade utilizada estava próxima ao limiar motor e ainda, a densidade de corrente usada variou de 3 a 6 mA/cm² uma vez que os eletrodos tinham 1 cm² de área.

A inibição destas fibras não apresentou relação com a angiogênese e tampouco com a proliferação celular, o que pode indicar que, apesar de haver diferença estatisticamente significativa entre GA e GS, com um tamanho de efeito absoluto de -4,02%, isto parece não ser o suficiente para gerar maiores repercussões no microambiente tumoral e, possivelmente, não seja clinicamente relevante.

A TENS não trazendo malefícios para o paciente oncológico, poderia auxiliar no tratamento destes para o manejo da dor (Amaral et al., 2019), diminuição da dor pós-operatória junto à melhora funcional (Erden et al., 2022) e modulação da reparação tecidual pós-mastectomia (Atalay e Yilmaz, 2009;

Thakral et al., 2014), podendo ser um importante recurso na reabilitação destes.

Estima-se que de 20% a 50% dos pacientes pós-cirúrgicos de câncer de mama cursem com dor (Tait et al., 2018) e, a dor pós-operatória intensa é um fator de risco para a cronificação da dor desta população (Okamoto et al., 2018; Tait et al., 2018). A dor associada ao paciente sobrevivente de câncer de mama é um causador de estresse e, quando este não é manejado adequadamente tem impacto na qualidade de vida e sobrevida destes pacientes (Lin et al., 2023).

Ainda compondo este quadro, o paciente pode apresentar LRCM e, com isso, ter uma sintomatologia de dor, encurtamento, sensação de peso, déficit de mobilidade e disfunção de membros superiores (Zhang et al., 2021). O LRCM também pode causar repercussões negativas nos pacientes acometidos, como um menor engajamento nas atividades de vida diárias e gerar impactos negativos na manutenção das atividades ocupacionais do indivíduo (Zhang et al., 2021).

McLaughlin et al. (2017) recomendam a atividade física para estes pacientes uma vez que exercícios resistidos podem aumentar a força, diminuir a quantidade e intensidade de exacerbações do LRCM e exercícios aeróbicos são tidos como seguros para esta população.

Os parâmetros utilizados para a TENS nesta pesquisa foram baseados em estudos prévios. São eles: a duração 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 período de tratamento (Sato et al., 2012; Farcic et al., 2018). O método utilizado para a intensidade aplicada se baseou no trabalho de Yokoyama et al. (2012), onde a intensidade foi pré-estabelecida e foram realizados acréscimos para evitar a acomodação sensorial, a cada cinco minutos.

As frequências de 10 e 100 Hz foram utilizadas por estas serem tidas como frequências baixa e alta respectivamente (Gibson et al., 2017); uma vez que são evidenciados diferentes resultados sobre o fluxo sanguíneo e a

modulação da reparação tecidual entre grupos de estudo de baixa e alta frequência (Scudds et al., 1995; Cramp et al., 2000; Machado et al., 2016; 2017).

Uma limitação deste estudo é o fato de a estimulação elétrica ter sido feita apenas com intensidade sensorial, não avaliando os impactos dos mecanismos de ação relacionados às intensidades motora e dolorosa sobre o tumor e, também, não foram avaliados os efeitos da TENS com frequências baixíssimas como 2 e 4 Hz para este tecido.

Este estudo foi o primeiro a avaliar a influência da TENS na angiogênese, proliferação celular e fibras de reticulina do carcinoma de mama 4T1, o que abre novas possibilidades para futuras pesquisas.

O método desenvolvido para avaliar a proliferação celular a partir do uso de lâminas de HE, pode auxiliar em futuras pesquisas, uma vez que o uso destas lâminas é recorrente e acessível (Alwahaibi et al., 2012; Chan, 2014; Alturkistani et al., 2016). Junto disto, a análise foi automatizada por meio de macros (Anexo 3) para o *software* ImageJ, que é amplamente utilizado (Schindelin et al., 2015) e, desta forma, diminui a sobrecarga de pesquisadores.

Pontos fortes a serem destacados consistem no uso racional da intensidade sensorial juntamente à exclusão de animais com lesões na epiderme para que não haja eletroestimulação dolorosa (Liebano et al., 2006); o período de tratamento longo para este tipo de lesão (Linkov et al., 2012; Wang et al., 2018); e o uso de lâminas de reticulina, que podem desempenhar um importante papel na progressão tumoral, o que não foi visto por estudos de desenho semelhante a este (Linkov et al., 2012; Wang et al., 2018).

Sugerimos que sejam estudados temas relativos aos efeitos da TENS no microambiente tumoral, como na expressão de VEGF, de diferentes marcadores inflamatórios (em especial citocinas pró-inflamatórias) e proliferação de células tumorais com marcadores específicos como o Ki-67.

Futuros estudos devem ser realizados a fim de elucidar o uso da TENS sobre tumores em animais que estejam sob quimioterapia, em diversos tipos de carcinomas e com diferentes parâmetros (principalmente com frequências baixas e intensidade motora); e também, os efeitos da TENS na disseminação de células tumorais e, conseqüentemente, em metástases.

7.0 CONCLUSÕES

A TENS programada para emitir os parâmetros de duração de pulso de 200 μ s, 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 promoveu angiogênese e não teve efeitos na proliferação celular; porém, quando utilizada em alta frequência inibiu a formação de fibras de reticulina em pequena quantidade no carcinoma 4T1.

8.0 REFERÊNCIAS

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

Do Carmo Almeida TC, Dos Santos Figueiredo FW, Filho VCB, De Abreu LC, Fonseca FLA, Adami F. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on proinflammatory cytokines: systematic review and meta-analysis. *Mediators Inflamm* 2018;2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1094352>

de Almeida AS, Rigo FK, Prá SDTD, Milioli AM, Dalenogare DP, Pereira GC, Ritter CS, Peres DS, Antoniazzi CTD, Stein C, Moresco RN, Oliveira SM, Trevisan G. Characterization of cancer-induced nociception in a murine model of breast carcinoma. *Cell Mol Neurobiol* 2019; 39(5):605-17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00666-8>.

Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological stains: a literature review and case study. *Global J Health Sci* 2016;8(3):72-9. DOI: 10.5539/gjhs.v8n3p72.

Alwahaibi NY, Al-Himali S, Kumar JS. Capability of hematoxylin and eosin stain to demonstrate hemosiderin in bone marrow trephine biopsy. *J Cytol Histol* 2012;3(3). DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7099.1000144>.

Amaral RG, Sandes SSL, Lima LV, Araújo FM, Andrade LN, Carvalho AA, de Santana JM. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation in Patients with Cancer Related Pain: A Systematic Review. *Saudi J Biomed Res* 2019;4(7):270-8. DOI: 10.1002/14651858.CD006276.pub3.

Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci* 2017;24(5):101–5. DOI: <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>.

Atiya HI, Dvorkin-Gheva A, Hassell H, Patel S, Parker RL, Hartstone-Rose A, Hodge J, Fan D, Ramsdell AF. Intraductal adaptation of the 4T1 Mouse model of breast cancer reveals effects of the epithelial microenvironment on

tumor progression and metastasis. *Anticancer Res* 2019;39(5):2277-87. DOI: 10.21873/anticancer.13344.

Atalay C, Yilmaz KB. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on postmastectomy skin flap necrosis. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117(3):611–4. DOI: 10.1007/s10549-009-0335-z.

Avila RH, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Morales-Montor J, Ostoa-Saloma P. Neonatal bisphenol A exposure affects the IgM humoral immune response to 4T1 breast carcinoma cells in mice. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16(10):1784. DOI:10.3390/ijerph16101784.

Baumans V, Van Loo PLP. How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. *Vet J* 2013;195(1):24-32. DOI:10.1016/j.tvjl.2012.09.023.

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. DOI: 10.1007/BF03349242.

Caffaro, Leonardo Affonso Massabki. Influência da estimulação elétrica nervosa transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017 [citado 2023-03-16].
doi:10.11606/D.5.2017.tde-06062017-083836.

Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005;69(3):4-10. DOI: 10.1159/000088478.

Casale R, Gibellini R, Bozzi M, Bonelli S. Changes in sympathetic activity during high frequency TENS. *Acupunct Electrother Res* 1985;10:169–75. DOI: 10.3727/036012985816714496.

Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.* 2014;22(1):12-32. DOI: 10.1177/1066896913517939.

- Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303-6. DOI:10.4103/0976-500X.119726.
- Cheville AL, Basford JR. Role of rehabilitation medicine and physical agents in the treatment of cancer-associated pain. *J Clin Onco* 2014;32(16):1691-702. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.6680.
- 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(2):150-7. DOI: 10.1046/j.1365-2281.2000.00240.x.
- 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(1):5-9. DOI: 10.1053/apmr.2002.27478.
- 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(5):351-60. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x.
- Ebersold MJ, Laws Jr ER, Albers JW. Measurements of autonomic function before, during and after transcutaneous stimulation in patients with 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(2):229-32. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2007.01.005.
- Erden S, Yurtseven Ş, Demir SG, Arslan S, Arslan UE, Dalcı K. Effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Mastectomy Pain, Patient Satisfaction, and Patient Outcomes. *J Perianesth Nurs* 2022;37(4):485–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jopan.2021.08.017>.

Fanan JMV; Venâncio SA; Ferreira ASM; Barichello E. Estimulação Nervosa Elétrica Transcutânea na dor de pacientes oncológicos em cuidados paliativos: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development* 2022;11(17):e271111739190. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n5-337>.

Farcic TS, Baldan CS, Machado AFP, Caffaro LAM, Masson IFB, Casarotto RA. Collagen fibers in the healing process of rat Achilles tendon rupture using different times of ultrasound therapy. *Adv Wound Care* 2018;7(4):114-20. DOI: 10.1089/wound.2017.0748.

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;16(9):142. DOI:10.1186/1476-511X-9-142.

Ferguson CJ. An Effect Size Primer: A Guide for Clinicians and Researchers. *Professional Psychology Research and Practice* 2009;40(5):532–8. DOI: 10.1037/a0015808.

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. DOI: 10.1093/ejcts/ezr108.

Folha R de AC, Pinfildi CE, Liebano RE, Rampazo ÉP, Pereira RN, Ferreira LM. Can transcutaneous electrical nerve stimulation improve achilles tendon healing in rats? *Braz J Phys Ther* 2015;19(6):433–40. DOI: <https://doi.org/10.1590/bjpt-rbf.2014.0107>.

Fontes-Pereira AJ, Teixeira RC, de Oliveira AJB, Pontes RWF, de Barros RSM, Negrão JNC. Efeito do ultrassom terapêutico de baixa intensidade em fratura induzida em tíbia de ratos. *Acta Ortop Bras* 2013;21(1):18-22.

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. DOI: 10.1590/1414-431x20143767.
- Ghandi N, Das GM. Metabolic reprogramming in breast cancer and its therapeutic implications. *Cells* 2019;8(2):89. DOI:10.3390/cells8020089.
- Gibson W, Wand BM, O'Connell NE. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;9(9):CD011976. DOI: 10.1002/14651858.CD011976.pub2.
- Gosselin RD. Guidelines on statistics for researchers using laboratory animals: the essentials. *Lab Anim* 2019; 53(1):28–42. DOI: <https://doi.org/10.1177/0023677218783223>.
- 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. DOI. 10.1016/j.apmr.2015.01.006.
- 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. DOI: 10.1124/pr.56.4.3.
- Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 2014;14(1):1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
- Hurlow A, Bennett MI, Robb KA, Johnson MI, Simpson KH, Oxberry SG. Transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) for cancer pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;3:CD006276. DOI: 10.1002/14651858.CD006276.pub3.
- In J, Lee S. Statistical data presentation. *Korean J Anesthesiol*. 2017;70(3):267–76. DOI: 10.4097/kjae.2017.70.3.267.
- 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. DOI: 10.1093/ptj/74.4.361.

Johnson MI, Paley CA, Howe TE, Sluka KA. Transcutaneous electrical nerve stimulation for acute pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;2015(6):CD006142. DOI: 10.1002/14651858.CD006142.pub3.

Jones I, Johnson MI. Transcutaneous electrical nerve stimulation. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2009;9(4):130-5. DOI: <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkp021>.

Khalil Z, Merhi M, Livett BG. Differential involvement of conotoxin-sensitive mechanisms in neurogenic vasodilatation responses: effects of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56(8):356-63. DOI: 10.1093/gerona/56.8.b356.

Koca Kutlu A, Çeçen D, Gürgen SG, Sayn O, Çetin F. A comparison study of growth factor expression following treatment with transcutaneous electrical nerve stimulation, saline solution, Povidone-iodine, and lavender oil in wounds healing. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:361832. DOI: 10.1155/2013/361832.

Li QQ, Shi GX, Xu Q, Wang J, Liu CZ, Wang LP. Acupuncture effect and central autonomic regulation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:267959. DOI:10.1155/2013/267959.

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. DOI: 10.1186/1471-2407-14-329.

Liebano RE, Ablá 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. DOI: 10.1590/s0102-86502006000300003.

Liebano RE, Ablá 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. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00332.x.

Liebano RE, Machado AFP. Vascular Endothelial Growth Factor Release Following Electrical Stimulation in Human Subjects. *Adv Wound Care* 2014;3(2):98-103. DOI: 10.1089/wound.2013.0427.

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. DOI: 10.1002/hed.21935.

Li J, Hu L, Zhou T, Gong X, Jiang R, Li H, Kuang G, Wan J, Li H. Taxifolin inhibits breast cancer cells proliferation, migration and invasion by promoting mesenchymal to epithelial transition via β -catenin signaling. *Life Sci* 2019;232:116617. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116617.

Lin Y, Wu C, He C, Yan J, Chen Y, Gao L, Liu R, Cao B. Effectiveness of three exercise programs and intensive follow-up in improving quality of life, pain, and lymphedema among breast cancer survivors: a randomized, controlled 6-month trial. *Support Care Cancer* 2022;(1):9. DOI: 10.1007/s00520-022-07494-5.

Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008;130(6):1091-103. DOI: 10.1007/s00418-008-0530-8.

Love MR, Palee S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of electrical stimulation on cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol* 2018;233(3):1860-76. DOI: 10.1002/jcp.25975.

Lucero HA, Patterson S, Matsuura S, Ravid K. Quantitative histological image analyses of reticulin fibers in a myelofibrotic mouse. *J Biol Methods* 2016;3(4):e60. DOI: 10.14440/jbm.2016.152.

Ma LL, Wang YY, Yang ZH, Huang D, Weng H, Zeng XT. Methodological quality (risk of bias) assessment tools for primary and secondary medical studies: What are they and which is better? *Mil Med Res* 2020;14(1):1-9. DOI: 10.1186/s40779-020-00238-8.

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.

Machado AFP, Liebano RE, Furtado F, Hochman B, Ferreira LM. Effect of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation on angiogenesis and myofibroblast proliferation in acute excisional wounds in rat skin. *Adv Skin Wound Care* 2016;29(8):357-63. DOI: 10.1097/01.ASW.0000488721.83423.f3.

Machado AFP, Silva FL, Neves MAI, Nonato FL, Tacani PM, Liebano RE. Effect of high- and low- frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on angiogenesis and wound contraction in acute excisional wounds in rat skin. *Fisioter Mov* 2017;30(4):671-80. DOI: <https://doi.org/10.1590/1980-5918.030.004.AO02>.

Malekian S, Rahmati M, Sari S, Kazemimanesh M, Kheirbakhsh R, Muhammadnejad A, Amanpour S. Expression of diverse angiogenesis factor in different stages of the 4T1 tumor as a mouse model of triple-negative breast cancer. *Adv Pharm Bull* 2020;10(2):323–8. DOI: 10.34172/apb.2020.039.

McLaughlin SA, Brunelle CL, Taghian A. Breast cancer-related lymphedema: Risk factors, screening, management, and the impact of locoregional treatment. *J Clin Oncology* 2020;38(20):2341–50. DOI: 10.1200/JCO.19.02896.

McLaughlin SA, DeSnyder SM, Klimberg S, Alatraste M, Boccardo F, Smith ML, Staley AC, Thiruchelvam PTR, Hutchison NA, Mendez J, MacNeill F, Vicini F, Rockson SG, Feldman SM. Considerations for Clinicians in the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Breast Cancer-Related Lymphedema, Recommendations from an Expert Panel: Part 2: Preventive and Therapeutic Options. *Ann Surg Oncol* 2017;24(10):2827-35. DOI: 10.1245/s10434-017-5964-6.

Mendonça ACR, Rett MT, Garcez PA, Aquino MJV, Lima LV, DeSantana JM. TENS effects on dysesthesia and quality of life after breast cancer surgery

with axilectomy: randomized controlled trial. *Fisioter Mov* 2017;30(1). DOI: 10.1590/1980-5918.030.S01.AO28.

Merchant SJ, Chen SL. Prevention and management of lymphedema after breast cancer treatment. *Breast J*, 2015;21(3): 276–284. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbj.12391>.

Mohamedi Y, Fontanila T, Cobo T, Veja JA, Cobo JL, Pérez-Basterrechea M, Cobo J, Obaya AJ, Cal S. Antitumor potential of fibulin-5 in breast cancer cells depends on its RGD cell adhesion motif. *Cell Physiol Biochem* 2019;53(1):87-100. DOI: 10.33594/000000123.

Mohandas R, Ramani P, Sherlin HJ, Gheena S, Ramasubramanian A, Don KR, Jayaraj G, Santhanam A. Organic stains used in histopathology – a systematic review. *Drug Invention Today* 2019;11(2):426-32.

Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition - a critical review. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7(2):223-45. DOI: 10.2174/187152007780058687.

Nagy JA, Chang S-H, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British J Cancer* 2009;100(6):865-9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604929.

Nakano J, Ishii K, Fukushima T, Ishii S, Ueno K, Matsuura E, Hashizume K, Morishita S, Tanaka K, Kusuba Y. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on physical symptoms in advanced cancer patients receiving palliative care. *Int J Rehabil Res* 2020;43(1): 62–8. DOI:10.1097/MRR.0000000000000386.

Ngai SPC, Jones AYM, Hui-Chan CWY, Ko FWS, Hui DSC. Effect of 4 weeks of Acu-TENS on functional capacity and β -endorphin level in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: A randomized controlled trial. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;173(1):29–36. DOI: 10.1016/j.resp.2010.06.005.

Nichele L, Persichetti V, Lucidi M, Cincotti G. Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting. *OSA Continuum* 2020;3(6):1417-27. DOI: <https://doi.org/10.1364/OSAC.393971>.

Okamoto A, Yamasaki M, Yokota I, Mori M, Matsuda M, Yamaguchi Y, Yamakita S, Ueno H, Sawa T, Taguchi T, Hosokawa T, Amaya F. Classification of acute pain trajectory after breast cancer surgery identifies patients at risk for persistent pain: a prospective observational study. *J Pain Res* 2018;11:2197–206. DOI: 10.2147/JPR.S171680.

Okuyucu EE, Turhanoglu AD, Guntel M, Yilmazer S, Savaş N, Mansuroğlu A. Does transcutaneous nerve stimulation have effect on sympathetic skin response? *J Clin Neurosci* 2018;47:160-162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.08.033>.

Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med* 2010;89(1):21-31. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i1p21-31>.

Owens S, Atkinson ER, Lees DE. Thermographic evidence of reduced sympathetic tone with transcutaneous nerve stimulation. *Anesthesiology* 1979;50(1):62-5. DOI: 10.1097/00000542-197901000-00018.

Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer* 2019;18(1):63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0983-5>.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen O, Rawle F, Peynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T and Wurbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020;17(16):3617-24. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989; 8(2):98–101.

Pazzini JM, Serafim EL, Gärtner F, Amorim I, Faria F, Rêma A, Moraes PC, De Nardi AB. Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. *Pesq Vet Bras* 2017;37(12):1519-25. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001200026>.

Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protoc Immunol* 2000;39(1): DOI: 10.1002/0471142735.im2002s39.

random.org [Internet]. Dublin: Randomness and Integrity Services Ltd.; c2018-2021 [citado em 2021 Abril 16]. Disponível em: <https://www.random.org/>.

Püsküllüoğlu M, Tomaszewski KA, Grela-Wojewoda A, Pacholczak-Madej R, Ebner F. Effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Pain and Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Cancer Patients: A Systematic Review. *Medicina (Kaunas)* 2022;58(2):284. DOI: 10.3390/medicina58020284.

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(2):150-61. 10.1111/j.1526-4637.2004.04027.x.

Reis AD, Pereira PTVT, Diniz RR, Filha JGLC, dos Santos AM, Ramallo BT, Alves Filho FA, Navarro F, Garcia JBS. Effect of exercise on pain and functional capacity in breast cancer patients. *Health Qual Life Outcomes* 2018;16(1):58. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12955-018-0882-2>.

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. DOI: 10.3138/ptc.62.5.

Rockson SG. Lymphedema after Breast Cancer Treatment. *New Engl J Med* 2018;379(20):1937–44. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1803290>.

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. DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2008.03.022.

Robertson V, Ward A, Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. 4ª Ed. São Paulo: Elsevier, 2009.

Sandberg ML, Sandberg MK, Dahl J. Blood Flow Changes in the Trapezius muscle and overlying skin following transcutaneous electrical nerve stimulation. *Phys Ther* 2007;87(8):1047–55. DOI: 10.2522/ptj.20060178.

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. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160020>.

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.

Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*. 2015;82(7-8):518-29. DOI: 10.1002/mrd.22489.

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. DOI: 10.1093/ptj/75.7.621.

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. DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2008.03.017.

Sflomos G, Brisken C. Breast Cancer Microenvironment and the Metastatic Process. In: Veronesi U, Goldhirsch A, Veronesi P, Gentilini OD, Leonardi MC, editors. *Breast Cancer Innovations in Research and Management*. Gewerbestrasse: Springer; 2017. p . 39-48.

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.

Sillevis R, Van Duijn J, Shamus E, Hard M. Time effect for in-situ dry needling on the autonomic nervous system, a pilot study. *Physiother Theory Pract*. 2019;17:1-9. DOI: 10.1080/09593985.2019.1644691.

Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF- β 1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J Clin Invest* 2004;113(5):676–85. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci200419540>.

Silva JG, Santana CG, Inocência 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. DOI: 10.1589/jpts.26.349

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.

Steenbrugge J, Vander Elst N, Demeyere K, De Wever O, Sanders NN, Van Den Broeck W, Dirix L, Van Laere S, Meyer E. Comparative Profiling of Metastatic 4T1- vs. Non-metastatic Py230-Based Mammary Tumors in an Intraductal Model for Triple-Negative Breast Cancer. *Front Immunol* 2019; 10:2928. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02928.

Tait RC, Zoberi K, Ferguson M, Levenhagen K, Luebbert RA, Rowland K, Salsich GB, Herndon C. Persistent Post-Mastectomy Pain: Risk Factors and Current Approaches to Treatment. *J Pain*, 2018;19(12):1367–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.06.002>.

Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 2008;9(8):228. DOI:10.1186/1471-2407-8-228.

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

Tonezzer T, Caffaro LAM, Menon KRS, Brandini da Silva FC, Moran de Brito CM, Sarri AJ, Casarotto RA. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on chemotherapy-induced peripheral neuropathy symptoms (CIPN): a preliminary case-control study. *J Phys Ther Sci* 2017;29(4):685-92. DOI: 10.1589/jpts.29.685.

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. DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2012v58n1.630>.

Torres KMT, Kazlouskaya V, Parikh K, Elston DM. Reticulin immunostaining revisited. *Indian Dermatol Online J* 2016;7(1):17-9. DOI: 10.4103/2229-5178.174312.

Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nature Rev Cancer* 2005;5(6):423-35. DOI: 10.1038/nrc1628.

Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Citol* 2002;65(2):109-26. DOI: 10.1679/aohc.65.109.

Xu Y, Rogers CJ. Physical Activity and Breast Cancer Prevention: Possible Role of Immune Mediators. *Front Nutr* 2020;7:557997. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.557997>.

Wang D, Stockard CR, Harkins L, Lott P, Salih C, Yuan K, Buchsbaum D, Hashim A, Zayzafoon M, Hardy R, Hameed O, Grizzle W, Siegal GP. Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts. *Biotech Histochem* 2008;83(3-4):179-89. DOI: 10.1080/10520290802451085.

Wang S, Sun X, Cheng W, Zhang J, Wang J. Pilot in vitro and in vivo study on a mouse model to evaluate the safety of transcutaneous low-frequency electrical nerve stimulation on cervical cancer patients. *Int Urogynecol J* 2018;30(1):71-80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00192-018-3625-3>.

World Health Organization. Breast cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Published 2021. Accessed June 2, 2021.

Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Mouse models for tumor metastasis. *Methods Mol Biol* 2012;928:221-8. DOI: 10.1007/978-1-62703-008-3_17.

Yaprak M. The axon reflex. *Neuroanatomy* 2008;7:17–9.

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. DOI: 10.1016/j.physio.2014.06.008.

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.

Zhang X, Oliveri JM, Paskett ED. Features, Predictors, and Treatment of Breast Cancer-related Lymphedema. *Curr Breast Cancer Rep* 2020;12(4):244-54. DOI: 10.1007/s12609-020-00381-0.

Zhang H, Zhang X, Ren Y, Cao F, Hou L, Zhang Z. An in situ microenvironmental nano-regulator to inhibit the proliferation and metastasis of 4T1 tumor. *Theranostics* 2019;9(12):3580-94. DOI: 10.7150/thno.33141.

ANEXO 1

**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

ANEXO 2

ADENDO PARA ANÁLISE DE MATERIAL COLETADO

Ao Dr. Eduardo Pompeu, coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA),

Solicito adendo relativo ao material coletado, referência **040/15** intitulado como: **“Influência da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos”**, aprovado em 25/03/2015.

Anteriormente foram realizadas análises de crescimento tumoral por meio de paquímetro digital e de área de necrose por meio da microscopia com lâminas de Hematoxilina e Eosina (HE).

As novas análises propostas são relacionadas ao crescimento tumoral, mantendo assim o título da pesquisa, sendo estas: análise de celularidade por meio de lâminas de HE, análise de tecido fibrótico por meio de lâminas de reticulina e análise de vasos sanguíneos (imunohistoquímica) por meio de lâminas de HE + CD31.

Para tal, solicito prorrogação de prazo até Maio de 2023.



Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto



Pesquisador Executante: Leonardo Affonso Massabki Caffaro

São Paulo, 20 de Maio de 2019.

ANEXO 3



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 29.05.19, **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 040/15 intitulado “**Influência da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea no crescimento de carcinoma 4T1 em glândula mamária de camundongos**” apresentado pelo Departamento de Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

- Prorrogação de prazo do projeto para Maio de 2023

Pesquisador Responsável: **Raquel Aparecida Casarotto**

CEUA-FMUSP, 29 de Maio de 2019

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

ANEXO 4

A. Análise de área fracionada de impregnação por CD31 no software ImageJ para imuno-histoquímica

- *Image > Color > Colour Deconvolution*
 - H&E DAB
 - Colour_3
- *Analyze > Set Measurements*
 - Area
 - Area fraction
- *Image > Adjust > Brightness/Contrast*
 - Ajuste manual de mínimo, máximo e contraste
 - Apply
- *Image > Adjust > Auto Local Threshold*
 - Otsu
 - 15 radius
 - Parameter 1 = 0
 - Parameter 2 = 0
- *Analyze > Measure*

a. Macro após ajuste de brilho e contraste

```
run("Auto Local Threshold", "method=Otsu radius=15 parameter_1=0  
parameter_2=0");
```

```
run("Measure");
```

```
close();
```

B. Análise de contagem de núcleos celulares e área fracionada de núcleos celulares no software ImageJ para lâminas de HE

- *Image > Adjust > Color Balance*
 - 50% esquerdo do histograma de cor vermelha e azul
- *Analyze > Set Measures*
 - *Area*
 - *Fraction area*
 - *Shape description*
- *Image > Type > RGB Stack*
- *Image > Color > Arrange Channels*
 - *New channel order. 3*
- *Process > Enhance Contrast*
 - *Saturated pixels: 0.35%*
 - *Equalize histogram*
- *Process > Noise > Despeckle*
- *Image > Adjust > Auto Local Threshold*
 - *Savoula*
 - *15 radius*
 - *Parameter 1 = 0*
 - *Parameter 2 = 0*
- *Process > Binary > Watershed*
- *Analyze > Analyze Particles*

- *Size (pixel²): 100-10.000*
- *Circularity: (0.00-1.00)*
- *Show: Outlines*
 - *Display results*
 - *Summarize*
 - *Add to Manager*

a. Macro após ajuste de balanço de cor:

```
run("RGB Stack");
run("Arrange Channels...", "new=3");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.35 equalize");
run("Despeckle");
run("Auto Local Threshold", "method=Sauvola radius=15 parameter_1=0
parameter_2=0");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=100-10000 show=Outlines display
summarize add");
```

C. Análise de área fracionada de impregnação argêntica para fibras de reticulina no software ImageJ para lâminas de reticulina

- *Image > Color > Colour Deconvolution*
 - *Masson Trichrome*
 - *Colour_1*
- *Analyze > Set Measurements*
 - *Area*

- *Area fraction*
- *Image > Adjust > Brightness/Contrast*
 - Ajuste manual de mínimo, máximo e contraste
 - *Apply*
- *Image > Adjust > Auto Local Threshold*
 - Otsu
 - *15 radius*
 - *Parameter 1 = 0*
 - *Parameter 2 = 0*
- *Analyze > Measure*

a. Macro após ajuste de brilho e contraste

```
run("Auto Local Threshold", "method=Otsu radius=15 parameter_1=0  
parameter_2=0");  
  
run("Measure");  
  
close();
```