

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS EM GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO

LILIANA PAULA GONÇALVES SOUSA

ORIENTADOR:

Dr. Joaquim José Garcia Pereira  
Henriques

COORIENTADOR:

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

2021



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS EM GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO

LILIANA PAULA GONÇALVES SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Ana Mafalda Gonçalves  
Xavier Félix Lourenço Martins

VOGAIS:

Doutor Frederico Nuno Castanheira  
Aires da Silva

Dr. Joaquim José Garcia Pereira  
Henriques

ORIENTADOR(A):

Dr. Joaquim José Garcia Pereira  
Henriques

COORIENTADOR(A):

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

2021

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Liliana Paula Gonçalves Sousa

Título da Tese ou Dissertação: Eletroquimioterapia como tratamento de carcinoma de células escamosas em gatos: estudo retrospectivo

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, \_15\_ de \_Setembro\_ de 2021\_

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Liliana Paula Gonçalves Sousa

*À memória de meu pai,  
Guilherme Dias de Sousa.*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família. À minha irmã, Nancy, pela cumplicidade e pela confiança cega nas minhas capacidades, à minha mãe, Paula, e à minha tia, Lúcia, por me terem proporcionado a oportunidade de frequentar e concluir este curso. Quero de forma muito sentida agradecer pelo apoio e compreensão durante estes últimos anos, particularmente árduos.

Ao Dr. Joaquim Henriques, sem o qual este trabalho não teria sido possível. Muito obrigada por ter aceitado ser meu orientador, pela disponibilidade para me ajudar na escolha do tema, por me ter facultado os meios necessários à realização do trabalho e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do meu estágio curricular.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Jorge Correia, um agradecimento especial por toda a sua disponibilidade, pelo encorajamento, fundamental em períodos de hesitação, pelo apoio prestado e pela incessante amabilidade.

A todos os elementos da equipa do Hospital Veterinário Berna, os quais tive o privilégio de acompanhar ao longo de 6 meses, e que, direta ou indiretamente, contribuíram grandemente para a minha formação profissional. Fico eternamente grata à Dra. Patrícia Duarte, Dra. Inês Fonseca e Dra. Ana Rita Serras pela simpatia, inspiração e transmissão de conhecimentos e competências no domínio da prática clínica. Um especial agradecimento ao Dr. Ricardo Felisberto pela ajuda na recolha e registo de dados úteis à realização desta dissertação.

Aos meus amigos de faculdade que se tornaram na minha segunda família longe dos confortos de casa: Sara, Mariana, Pon, Clarisse, João e Mestre. Muito obrigada pelo bem-querer e pelo sentimento de pertença, por me terem multiplicado os momentos de alegria e amenizado os mais penosos neste longo caminho. E aos restantes amigos Botelho, Maria Isabel, Gomes, Gonçalo e Esmeralda por todos os bons momentos partilhados. Agradeço a todos pelas lembranças que hoje me fazem olhar para trás de peito cheio.

Aos meus amigos insulares, em especial à Sofia e ao Marco, pelo companheirismo nesta marcante aventura por Lisboa, e à Sara e Carolina, pelo carinho e pela força moral.

Agradeço ainda a todo o corpo docente da FMV-UL que me formou ao longo destes anos.

Por fim, à Professora Doutora Maria João Beja pelo carinho e ajuda inestimáveis.

# **ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO**

## **RESUMO**

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma das neoplasias malignas mais frequentes nos gatos, representando aproximadamente 15% das suas neoplasias cutâneas e 60-75% das neoplasias orais. A eletroquimioterapia (EQT) é uma modalidade de tratamento oncológico recente que associa a administração de agentes quimioterápicos, não permeáveis ou com baixa permeabilidade, com a aplicação localizada de pulsos elétricos permeabilizadores. Os curtos pulsos elétricos de alta tensão resultam num aumento substancial e transitório da permeabilidade das células neoplásicas (eletroporação) e a citotoxicidade do agente quimioterápico aumenta por várias ordens de magnitude. Recentemente a EQT tem vindo a ganhar popularidade na Oncologia Veterinária pela sua elevada eficácia associada a baixa toxicidade. Este estudo retrospectivo teve como objetivo a avaliação da eficácia da EQT com bleomicina como tratamento de CCE cutâneos e orais em gatos. Quinze gatos com CCE na região da cabeça (13 CCE cutâneos e 2 CCE orais) foram tratados com pelo menos uma sessão de EQT (entre dezembro de 2015 e novembro de 2016) no Hospital Veterinário Berna. A resposta ao tratamento foi classificada às quatro semanas após tratamento com base nos Critérios de Avaliação de Resposta em Neoplasias Sólidas (RECIST) e os efeitos adversos foram avaliados e determinados de acordo com a escala de toxicidade VCOG-CTCAE 2011. Verificou-se uma taxa de resposta objetiva global de 86%. Dos catorze gatos nos quais foi possível a classificação da resposta, oito (57%) apresentaram remissão completa, quatro (29%) remissão parcial e dois (14%) progressão da doença. O tratamento foi bem tolerado e os efeitos adversos observados foram maioritariamente ligeiros e transeuntes. Os resultados sugerem que a EQT é um tratamento eficaz de CCE em gatos, especialmente dos CCE cutâneos em estádios iniciais ou com lesões de diâmetro inferior a 3 cm.

**Palavras-chave:** Electroporação, quimioterapia, carcinoma, gato.

# **ELECTROCHEMOTHERAPY FOR THE TREATMENT OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN CATS: RETROSPECTIVE STUDY**

## **ABSTRACT**

Squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most common malignant tumours in cats, representing approximately 15% of its cutaneous tumours and 60-75% of oral tumours. Electrochemotherapy (ECT) is a recent cancer treatment modality that combines the administration of chemotherapeutic agents, non-permeable or with low permeability, with the localized application of permeabilizing electric pulses. Short high-voltage pulses result in a substantial and transient increased permeability of neoplastic cells (electroporation) and the cytotoxicity of the chemotherapeutic agent increases by several orders of magnitude. Recently, ECT has been gaining popularity in Veterinary Oncology due to its high effectiveness associated with low toxicity. This retrospective study aimed to evaluate the efficacy of ECT with bleomycin as a treatment for cutaneous and oral SCC in cats. Fifteen cats with SCC of the head region (13 cutaneous SCC and 2 oral SCC) were treated with at least one ECT session at Hospital Veterinário Berna, between December 2015 and November 2016. Response to treatment was assessed four weeks after completion of treatment based on the Solid Neoplasm Response Assessment Criteria (RECIST) and adverse effects were graded according to the VCOG-CTCAE 2011. The overall response rate was 86%. Of the fourteen cats in which it was possible to classify the response, eight (57%) showed complete remission, four (29%) partial remission, and two (14%) disease progression. ECT was well tolerated and the observed adverse effects were mostly mild and transient. The results suggest that ECT is an effective treatment of SCC in cats, especially cutaneous SCC in early stages or with lesions smaller than 3 cm in diameter.

**Keywords:** Electroporation, chemotherapy, carcinoma, cats.

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
I – DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
II – INTRODUÇÃO .....	3
1. A Oncologia em Veterinária .....	3
2. Neoplasias Cutâneas e Subcutâneas .....	3
3. Carcinoma de Células Escamosas Cutâneo .....	4
3.1. Carcinoma de células escamosas <i>in situ</i> .....	4
3.2. Carcinoma de Células Escamosas .....	5
3.2.1. Etiopatogenia .....	5
3.2.2. Apresentação Clínica, Diagnóstico e Prognóstico .....	6
3.3. Carcinoma de Células Escamosas Oral.....	7
3.4. Estadiamento de CCE Cutâneos e Oraís.....	8
3.5. Abordagens Terapêuticas.....	11
3.5.1. Cirurgia .....	11
3.5.2. Radioterapia.....	11
3.5.3. Terapia Fotodinâmica .....	12
3.5.4. Quimioterapia.....	12
3.5.5. Criocirurgia.....	13
3.5.6. Inibidores da Ciclooxygenase-2 .....	13
3.5.7. Inibidores de Recetores de Tirosina Quinases .....	13
3.5.8. Combinação de Tratamentos .....	13
4. Eletroquimioterapia .....	14

4.1. Fundamentos da Eletroquimioterapia .....	14
4.1.1. Eletropermeabilização.....	15
4.1.2. Efeitos Modificadores do Fluxo Sanguíneo .....	17
4.1.3. Resposta Imunitária .....	19
4.2. Protocolos de Eletroquimioterapia .....	19
4.2.4. Agentes Antineoplásicos.....	20
4.2.4.1. Bleomicina.....	21
4.3. A Eletroquimioterapia em Medicina Veterinária .....	21
5. A Eletroquimioterapia como Tratamento de CCE em Gatos.....	22
III – ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO.....	26
1. Objetivos.....	26
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1. Pacientes.....	26
2.2. Gerador de Pulsos Elétricos .....	28
2.3. Elétrodo.....	29
2.4. Procedimento do Tratamento .....	30
2.5. Classificação da Resposta .....	34
3. Resultados .....	36
4. Discussão .....	48
5. Conclusão.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	57
ANEXOS.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da configuração hipotética de um poro hidrofóbico (a) e hidrofílico (b) em secção transversal, de raio r (adaptado de Neu and Neu 2009). .....	16
Figura 2 – Exemplificação gráfica da potenciação do agente antineoplásico mediante o mecanismo de eletropermeabilização (adaptado de Miklavčič et al. 2012). .....	17
Figura 3 – Exemplificação gráfica dos efeitos modificadores do fluxo sanguíneo resultantes da eletropermeabilização (EP) e eletroquimioterapia (EQT) (adaptado de Jarm et al. 2010). .....	19
Figura 4 - Demonstração da medição de uma lesão de CCE do plano nasal com um paquímetro (paciente 13). .....	27
Figura 5 - Exemplar Exemplar do dispositivo gerador de pulsos ELECTROvet® S13 (LEROY biotech) com o respetivo pedal e elétrodo. ....	28
Figura 6 - Dispositivo gerador de pulsos elétricos utilizado, ELECTROvet® S13 (LEROY biotech). .....	28
Figura 7 - Elétrodo portátil utilizado com configuração em “L”. .....	29
Figura 8 - Representação esquemática das partes ativas do elétrodo utilizado com configuração em “L” e respetivas dimensões; vista lateral (a) e vista frontal (b). ..	30
Figura 9 - Representação esquemática das porções do elétrodo utilizado destinadas ao contacto com neoplasias de superfície lisa (vista frontal) e da respetiva distribuição de campo elétrico. O tracejado azul representa a área aproximada onde o campo elétrico local é suficiente para a EP. ....	30
Figura 10 - Bloqueios anestésicos do nervo maxilar (A) e do nervo infraorbitário (B). .....	31
Figura 11 - Gato sob anestesia geral, posicionado para iniciar o tratamento com EQT (paciente 4). .....	31
Figura 12 - Administração de pulsos elétricos permeabilizadores em gatos com CCE do plano nasal (pacientes 1, 3, 6 e 13, na devida ordem). .....	33
Figura 13 - Gato com tubo de esofagostomia colocado após EQT (paciente 12). .....	33
Figura 14 - Macho de 14 anos com formação de crosta sobre a lesão do plano nasal uma semana após a primeira sessão de EQT (paciente 4). .....	41
Figura 15 - Fêmea de 8 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira e única sessão de EQT (A e B) e às treze semanas após conclusão do tratamento (C e D) (paciente 2). .....	43

<b>Figura 16 - Macho de 10 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira sessão de EQT (A e B), às treze semanas depois da primeira sessão (C e D) e antes da segunda e última sessão (E) (paciente 7).</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura 17 - Fêmea de 4 anos com CCE cutâneo da pálpebra antes da segunda e última sessão de EQT (A) e uma semana após conclusão do tratamento (B) (paciente 8).</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura 18 - Macho de oito anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira sessão de EQT (A) e às duas (B), quatro (C) e doze semanas (D) posteriores (paciente 12).</b> .....	<b>45</b>
<b>Figura 19 - Macho de 15 anos com CCE oral da maxila à apresentação (A), recidiva dez semanas após a segunda sessão de EQT (B), presença de tecido necrótico uma semana após a terceira e última sessão (C) e quatro semanas após a conclusão do tratamento (D) (paciente 15).</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 20 - Macho de 5 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira (A) e segunda sessão de EQT (B) e duas semanas após conclusão do tratamento (C) (paciente 6).</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 21 - Macho de 14 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira (A e B) e segunda sessão de EQT (C e D) e às quatro semanas após conclusão do tratamento (E e F) (paciente 4).</b> .....	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento clínico (TNM) de neoplasias de origem epidérmica ou dérmica em cães e gatos (exceto linfoma e mastocitoma) (adaptado de Owen 1980)...	9
Tabela 2 - Estadiamento clínico (TNM) de neoplasias orais em cães e gatos (adaptado de Owen 1980).....	10
Tabela 3 - Resumo dos estudos de EQT realizados em gatos com CCE.....	24
Tabela 4 - Classificação da resposta ao tratamento com base nos Critérios de Avaliação de Resposta em Neoplasias Sólidas (RECIST) (adaptado de Eisenhauer et al. 2009).....	34
Tabela 5 - Classificação, em graus, da intensidade dos efeitos adversos de acordo com o Veterinary Cooperative Oncology Group (adaptado de VCOG-CTCAE 2011).....	35
Tabela 6 - Classificação, em graus, da intensidade dos efeitos adversos mais comuns no grupo de estudo de acordo com as categorias individuais estabelecidas pelo Veterinary Cooperative Oncology Group (adaptado de VCOG-CTCAE 2011).....	35
Tabela 7 - Resumo das características dos quinze gatos com CCE incluídos no estudo.....	38
Tabela 8 - Esquematização do tratamento dos animais incluídos no estudo, com especificações do agente e dos parâmetros físicos da EQT.....	39
Tabela 9 - Resumo das respostas ao tratamento com EQT nos quinze gatos com CCE.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**AINE** – Anti-inflamatório não esteroide

**CBIS** – Carcinoma Bowenoide *in situ*

**CCE** – Carcinoma de Células Escamosas

**COX-2** – Ciclooxygenase-2

**DE** – Doença estável

**DP** – Doença progressiva

**EP** – Eletropermeabilização

**EQT** – Eletroquimioterapia

**HVB** – Hospital Veterinário Berna

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAAF** – Punção aspirativa por agulha fina

**POP** – Procedimentos operacionais padrão

**QA** – Queratose actínica

**RC** – Remissão completa

**RCP** – Reação em cadeia da polimerase

**RECIST** – Critérios de Avaliação de Resposta em Neoplasias Sólidas

**RO** – Resposta objetiva

**RP** – Remissão parcial

**TFD** – Terapia fotodinâmica

**UV** – Ultravioleta

**VCOG-CTCAE** – *Veterinary Cooperative Oncology Group – Common Terminology*

*Criteria for Adverse Events*

## **I – DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR**

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária teve lugar no Hospital Veterinário Berna (HVB), unidade integrante do OneVet Group, em Lisboa, sob orientação do Dr. Joaquim Henriques. O estágio decorreu durante 6 meses, com início a 1 de fevereiro de 2016 e término a 31 de julho de 2016, tendo sido contabilizada uma carga horária total de aproximadamente 1040 horas.

No decorrer do estágio curricular o HVB possibilitou-me o contacto com diferentes áreas da Medicina de Animais de Companhia, tais como, a Medicina Interna, a Oncologia, a Cardiologia, a Neurologia, a Imagiologia, a Anestesiologia, a Cirurgia e a Patologia Clínica. As atividades desenvolvidas ao longo do estágio ocorreram num horário com turnos rotativos de 8 horas, à exceção dos turnos noturnos no Internamento e Serviço de Urgência, de 10 horas.

Tive a oportunidade de assistir a consultas de Medicina Preventiva, de Medicina Interna e de Medicina de Especialidade. Acompanhei e auxiliei a equipa de Médicos Veterinários na recolha de dados da anamnese, na execução de exames de estado geral e de exames específicos das especialidades (e. g., exame neurológico, exame oftálmico simples etc.), na administração de vacinas, na colheita de amostras biológicas e na realização de exames complementares de diagnóstico (radiografia, ecografia, ecocardiografia, eletrocardiograma e punção citológica).

Na área de Cirurgia, auxiliei o Médico Veterinário na preparação dos animais para o bloco operatório, nomeadamente na realização de análises pré-cirúrgicas, administração da pré-medicação e indução anestésica, preparação do campo cirúrgico e intubação endotraqueal, na monitorização anestésica e no recobro. Além disso, durante as cirurgias foi-me dada a oportunidade de desempenhar o papel de circulante, de ajudante de cirurgião e, sob supervisão, de cirurgiã principal (orquiectomias eletivas de gatos). As cirurgias assistidas incluíram ovariectomias e orquiectomias, tratamentos estomatológico-dentários, cirurgias de tecidos moles (resolução de dilatações gástricas, enterotomias para remoção de corpos estranhos etc.) e cirurgias oncológicas (exérese de tumores vários, cirurgia plástica reconstrutiva, biópsias e remoção linfonodos). Foram ainda observadas algumas cirurgias de mínima invasão (laparoscopia e toracoscopia).

Sendo o HVB um local de referência em Oncologia Veterinária, parte das atividades incidiram no acompanhamento de consultas da área, tendo sido possível assistir à preparação de agentes quimioterápicos e às sessões de quimioterapia. Foi-me também dada a oportunidade de acompanhar outras modalidades de tratamento oncológico levadas a efeito

no HVB, como a eletroquimioterapia (EQT). Durante o estágio assisti ao tratamento com EQT de 10 gatos com carcinoma das células escamosas (CCE) cutâneo e 1 gato com CCE oral.

No Internamento, foi prestada assistência à equipa multidisciplinar de serviço na monitorização dos animais hospitalizados. As atividades incluíram exame de estado geral (avaliação de parâmetros básicos, tais como, a cor das mucosas, o tempo de repleção capilar, a temperatura corporal, a frequência cardíaca e respiratória, o pulso, a pressão arterial e o doseamento de valores de glicémia), preparação e administração da terapêutica prescrita, cuidados de higiene e alimentação e passeio dos animais, a intervalos regulares. Quando necessário, e sob a supervisão do Médico Veterinário ou Enfermeiro assistente, foi-me dada a oportunidade de realizar colheitas de sangue e urina e cateterização venosa. Foi-me dada ainda a possibilidade de acompanhar e/ou executar vários outros procedimentos, como a limpeza de lesões e realização de pensos, a drenagem de líquido de derrames cavitários e a preparação de altas médicas.

Foram processadas e interpretadas análises clínicas, tais como hemograma (incluindo a elaboração de esfregaços sanguíneos e avaliação ao microscópio), bioquímicas e análise de urina. Foi ainda possível a realização, processamento e observação de citologias, assim como a preparação e envio de amostras para análise laboratorial.

Tive ainda a oportunidade de participar num plano de formação interno facultado pela equipa de Imagem, Dra. Inês Fonseca e Dra. Patrícia Duarte, de frequência semanal e durante aproximadamente dois meses – “Tertúlias Ecográficas” –, que visou a consolidação dos conhecimentos de ecografia/ecocardiografia.

A participação nos pequenos seminários semanais (*Journal Club*) e a consequente discussão de várias temáticas permitiu-me rever e adquirir conhecimentos de diferentes áreas da Medicina de Animais de Companhia. No decorrer do estágio fui responsável por uma apresentação com base no tema da EQT.

Parte dos dados recolhidos na presente dissertação foram apresentados numa comunicação, em póster (Anexo 1), no XIII CONGRESSO HOSPITAL VETERINÁRIO MONTENEGRO – PATOLOGIAS CARDIO-RESPIRATÓRIAS SEM SEGREDOS (2017), após revisão por pares, com o título:

Sousa, L.; Felisberto, R., Henriques, J. (2017) Eletroquimioterapia: estudo retrospectivo de 15 gatos com carcinoma das células escamosas. XIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro – Patologias Cardio-respiratórias Sem Segredos. Dias 18 e 19 de fevereiro, Santa Maria da Feira, Portugal.

## II – INTRODUÇÃO

### 1. A Oncologia em Veterinária

O cancro é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos animais de companhia (Withrow et al. 2013). A sua prevalência continua a aumentar, em grande parte como consequência do aumento da longevidade dos animais de companhia – propiciado pelos progressos na Medicina Veterinária nos cuidados preventivos, no controlo de outras doenças e nutrição (North and Banks 2009; Withrow et al. 2013). Embora não seja atualmente conhecida a verdadeira incidência ou prevalência de cancro em animais de companhia, num inquérito realizado pela *Morris Animal Foundation* a tutores de animais de companhia em 1998, mais de dois mil inquiridos afirmaram ser o cancro a principal doença causadora da morte em cães (47%) e gatos (32%) (Withrow et al. 2013).

Independentemente dos números exatos, o cancro é considerado a principal preocupação dos tutores no que concerne à saúde e qualidade de vida dos seus animais (Dobson 2011; Withrow et al. 2013). Para além disso, a oncologia em veterinária representa uma área complexa, tanto na prática clínica como na investigação, e assume um papel global na oncologia comparativa (Withrow et al. 2013).

### 2. Neoplasias Cutâneas e Subcutâneas

As neoplasias cutâneas são das neoplasias mais comuns na Medicina Veterinária (Goldschmidt and Goldschmidt 2017). Estas são frequentemente referenciadas pelos tutores ao médico veterinário, considerando a relativa facilidade com que são visualmente detetadas (Hauck 2013; Goldschmidt and Goldschmidt 2017).

A incidência global das neoplasias cutâneas e subcutâneas em cães e gatos é difícil de determinar devido à inconsistência dos dados relatados (Hauck 2013). Num estudo epidemiológico de neoplasias animais realizado entre 1963 e 1966 em *Alameda and Contra Costa Counties, California*, a taxa de incidência anual estimada de neoplasias cutâneas e do tecido conjuntivo foi de 150,4 para cada 100 000 cães e 51,7 para cada 100 000 gatos (Dorn et al. 1968; Hauck 2013).

Até à data, os dados sugerem que neoplasias cutâneas e subcutâneas correspondem às segundas neoplasias mais frequentes nos gatos, seguindo-se às neoplasias hematopoiéticas, e representam cerca de um quarto de todas as neoplasias que ocorrem na espécie (Brodey 1970; Bostock 1986; Miller et al. 1991; Goldschmidt and Goldschmidt 2017). Os quatro principais tipos de neoplasias cutâneas e subcutâneas em gatos são, consistentemente: carcinomas basocelulares, mastocitomas, carcinomas de células escamosas (CCE) e fibrossarcomas. Estes quatro constituem, em média, aproximadamente

70% de todas as neoplasias malignas cutâneas em felinos (Hauck 2013). À exceção dos carcinomas basocelulares, as neoplasias cutâneas malignas são substancialmente mais frequentes nos gatos que nos cães, com estudos que relatam percentagens que variam entre 69,7% e 82% (Miller et al. 1991; Hauck 2013).

### **3. Carcinoma de Células Escamosas Cutâneo**

#### **3.1. Carcinoma de células escamosas *in situ***

O CCE *in situ* é, por definição, um carcinoma que não penetrou na membrana basal do epitélio. Clinicamente, os CCE *in situ* podem apresentar-se sob a forma de erosões da epiderme, proliferações ou placas com crostas, e podem ser dolorosos à palpação (Hauck 2013).

A queratose actínica (QA) é a designação tipicamente utilizada para os CCE *in situ* consequentes da exposição à radiação ultravioleta (UV) (Hauck 2013). As lesões de QA surgem em pele pouco pigmentada e com escasso revestimento piloso. Estas ocorrem mais frequentemente nos pavilhões auriculares, plano nasal e pálpebras de gatos com pelagem branca (Gross et al., 2005). O carcinoma bowenoide *in situ* (CBIS), também designado de carcinoma das células escamosas multicêntrico *in situ* ou ainda doença de Bowen, não está relacionado com a exposição à luz solar. Este ocorre em qualquer área do corpo, independentemente da pigmentação cutânea e densidade do pelo (Vail and Withrow 2007; Hauck 2013), e, na maioria dos gatos, as lesões são observadas em múltiplas áreas (Goldschmidt and Goldschmidt 2017). Existe uma associação entre o CBIS e vírus do papiloma (Goldschmidt and Goldschmidt 2017). A relação causal entre a infeção pelo vírus do papiloma felino, sobretudo pelo vírus do papiloma felino tipo 2, e os CBIS em gatos foi sugerida em vários estudos mediante deteção de ADN viral por reação em cadeia da polimerase (RCP) e do aumento da expressão da proteína p16 por imunohistoquímica (Nespeca et al. 2006; Munday et al. 2007; Munday et al. 2008; Munday, French, et al. 2011; Munday and Aberdein 2012; Thomson et al. 2016; Vascellari et al. 2019).

A QA e o CBIS geralmente apresentam diferentes localizações, assim como características clínicas e histológicas específicas. Todavia, a distinção entre ambas é por vezes impossível, quer clínica ou histologicamente (Favrot et al. 2009; Hauck 2013). Uma vez não invasivos, os CCE *in situ* não estão associados a metástases, no entanto, estes podem progredir para CCE invasivos quando não tratados (Hauck 2013).

### **3.2. Carcinoma de Células Escamosas**

O CCE é uma neoplasia maligna das células epidérmicas, as quais demonstram diferenciação em células escamosas – queratinócitos (Hauck 2013; Goldschmidt and Goldschmidt 2017). O CCE é das neoplasias cutâneas malignas mais comuns em gatos, representando 15% das neoplasias cutâneas nesta espécie (Miller et al. 1991; Hauck 2013). O pico de incidência de CCE em gatos está compreendido entre os 9 e os 14 anos de idade (Miller et al. 1991; Goldschmidt and Goldschmidt 2017). São vários os fatores associados ao desenvolvimento de CCE, incluindo a exposição prolongada à radiação UV, a falta de pigmento da epiderme e a rarefação do pelo. Em consequência, a localização geográfica, o clima e a localização anatômica influenciam fortemente a incidência (Goldschmidt and Goldschmidt 2017).

#### **3.2.1. Etiopatogenia**

A maioria dos CCE cutâneos tem como causa a exposição crônica à radiação UV (Murphy 2013). Os seus fatores causais e mecanismos patogénicos são muito semelhantes aos da QA (Hauck 2013). A exposição solar crônica normalmente resulta na progressão de alterações actínicas para carcinoma *in situ*, e deste para carcinoma invasivo (Thomson 2007). Os CCE com esta etiologia são quase que exclusivamente observados na cabeça, sendo os gatos de pelagem branca, ou gatos com pelagem escura mas com áreas glabras, os que se encontram em maior risco (Dorn et al. 1971; Murphy 2013). O risco de desenvolver CCE em gatos brancos é treze vezes superior ao de gatos com pelagem de outras cores (Gross et al. 2005).

Em Medicina Veterinária, o papel do vírus do papiloma na patogénese destas lesões não é ainda totalmente conhecido (Munday 2014). Inicialmente, evidências de que vírus do papiloma felino pode causar CCE cutâneos em gatos incluíram a observação da possível progressão de CBIS induzidos por vírus do papiloma felino para CCE e, menos frequentemente, de alterações celulares causadas pelo vírus em citologias de CCE (Gross et al. 2005; Munday 2014).

No primeiro estudo da associação do vírus do papiloma felino com CCE cutâneos em gatos, o ADN viral foi amplificado, através da técnica de RCP com a utilização de *primers* consenso, em 4 de 22 amostras de CCE invasivos (Nespeca et al. 2006). Num estudo subsequente com emprego de *primers* específicos para o vírus do papiloma felino tipo 2, a amplificação de ADN viral foi significativamente mais frequente em CCE cutâneos (17/20) que em amostras de pele sem CCE (3/17) (Munday et al. 2008). Além destes, quando comparada a presença do vírus do papiloma entre CCE felinos expostos à radiação UV e CCE felinos abrigados da radiação UV num estudo com recurso a RCP, o ADN viral foi detetado com maior

frequência nos CCE abrigados da radiação UV (19/25 comparado com 19/45) (Munday, Gibson, et al. 2011).

Um dos principais meios pelos quais os genótipos oncogénicos do vírus do papiloma humano induzem transformação neoplásica envolve a degradação da proteína retinoblastoma (pRb) pela oncoproteína E7, o que subsequentemente resulta no aumento da proteína p16 (Parry et al. 1995; Boyer et al. 1996). Em gatos, verificou-se num primeiro estudo imunohistoquímico o aumento da expressão da proteína p16 em 39 de 70 CCE (Munday, Gibson, et al. 2011). Num estudo posterior, desta vez de placas virais, CBIS e CCE invasivos, a diminuição da expressão da pRb foi detetada em 26 de 45 amostras e o aumento da expressão da proteína p16 em 30 (Munday and Aberdein 2012). Em ambos, a sobreexpressão da proteína p16 foi significativamente mais frequente em CCE não expostos à radiação UV, e demonstrou estar associada à diminuição da expressão da pRb e presença de ADN viral (Munday, Gibson, et al. 2011; Munday and Aberdein 2012).

### **3.2.2. Apresentação Clínica, Diagnóstico e Prognóstico**

Considerando o papel da radiação UV e a barreira física que o pelo lhe constitui, os CCE cutâneos surgem normalmente em áreas pouco pigmentadas e com pilosidade rarefeita (Hauck 2013; Murphy 2013). Todavia, os CCE não relacionados com a exposição prolongada à luz solar podem ocorrer em qualquer parte do corpo (Gross et al. 2005). Os CCE cutâneos nos gatos costumam desenvolver-se ao nível da cabeça, nomeadamente nos pavilhões auriculares, pálpebras, plano nasal e regiões temporais (Vail and Withrow 2007; Goldschmidt and Goldschmidt 2017).

A apresentação clínica do CCE cutâneo pode ser muito variável (Hauck 2013). O CCE cutâneo pode manifestar-se como uma lesão proliferativa ou erosiva. A lesão proliferativa pode variar entre uma placa firme e vermelha e uma lesão tipo couve-flor, frequentemente ulcerativa. A lesão erosiva, por sua vez, inicia-se como uma lesão superficial com crosta e pode progredir para uma úlcera profunda, representando o tipo de lesão de CCE mais comum no gato (Vail and Withrow 2007). As lesões podem ser únicas ou múltiplas e variam em diâmetro entre vários milímetros a vários centímetros (Gross et al. 2005). Podem apresentar eritema, edema, descamação, ulceração ou crostas, e habitualmente sofrem uma progressão temporal em tamanho e profundidade (Gross et al. 2005; Goldschmidt and Goldschmidt 2017).

Nos gatos, o CCE cutâneo normalmente apresenta-se como uma lesão crateriforme insarável, avermelhada e com crosta (Murphy 2013). As lesões podem atingir o plano nasal, pavilhões auriculares e pálpebras de modo concomitante ou sequencial, e os CCE e CCE *in situ* podem coexistir (Gross et al. 2005; Blackwood 2011; Murphy 2013). Os CCE emergentes nos pavilhões auriculares exibem uma evidente transformação actínica – espessamento e

enrolamento das extremidades dos pavilhões auriculares – antes da formação de crostas e da erosão (Murphy 2013; Goldschmidt and Goldschmidt 2017). Os CCE das pálpebras estão habitualmente associados a conjuntivite purulenta e os CCE do plano nasal a epistáxis, espirros, ulceração ou tumefação (Goldschmidt and Goldschmidt 2017).

Os CCE cutâneos podem ser muito invasivos localmente, com uma perda gradual de tecido do pavilhão auricular ou nariz (Gross et al. 2005). Embora invasivos, estes são normalmente de crescimento lento e a sua maioria, em estágio inicial, não demonstra disseminação metastática. Se presentes, as metástases são mais frequentemente observadas nas neoplasias pouco diferenciadas ou em estádios avançados da doença (Gross et al. 2005; Vail and Withrow 2007; Goldschmidt and Goldschmidt 2017).

Os CCE completamente desenvolvidos são fáceis de diagnosticar, contudo, as alterações pré-neoplásicas podem ser subtis (Goldschmidt and Goldschmidt 2017). O único método que permite um diagnóstico definitivo é a biópsia – biópsia excisional ou incisional –, dado que a maioria das lesões são demasiado superficiais ou encontram-se demasiado inflamadas para que um diagnóstico fiável seja possível com punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (Thomson 2007; Murphy 2013). Em gatos, um elevado índice de suspeição de CCE cutâneo baseia-se normalmente na sua aparência e localização, e o tratamento é frequentemente iniciado sem um diagnóstico definitivo (Thomson 2007).

O prognóstico de CCE cutâneo em cães e gatos é dependente do estágio da doença. A resposta à terapêutica é superior nas lesões em T<sub>is</sub> e T<sub>1</sub> que naquelas cuja invasão é significativa (Vail and Withrow 2007). Outros fatores possivelmente preditivos incluem o grau histológico, a taxa de proliferação, a taxa apoptótica e a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (Vail and Withrow 2007).

### **3.3. Carcinoma de Células Escamosas Oral**

O CCE oral é a neoplasia oral mais comum em gatos, representando entre 70% a 80% de todas as neoplasias orais nesta espécie (Liptak and Withrow 2013). Não é conhecida a causa subjacente dos CCE orais felinos, porém, os potenciais fatores de risco descritos incluem a utilização de coleiras antipulgas, um elevado consumo de comida enlatada e a exposição ao fumo do tabaco (Liptak and Withrow 2013; Munday et al. 2017).

Os CCE orais surgem numa fase inicial como lesões em placa pálidas ou áreas sobre-elevadas e irregulares na mucosa oral. Dado que a maioria dos CCE orais nos animais domésticos se encontram num estágio avançado quando diagnosticados, estes geralmente apresentam-se como massas protuberantes ulceradas (Liptak and Withrow 2013; Munday et al. 2017). Os CCE orais felinos podem surgir na mandíbula, ossos maxilares, lábios e área sublingual ou lingual; e os sinais clínicos a estes associados podem incluir inapetência,

disfagia, halitose, sialorreia e corrimento oral sanguinolento (Liptak and Withrow 2013; Turek and Pellin 2016).

Os CCE orais exibem um comportamento localmente agressivo (Munday et al. 2017). A invasão óssea é frequentemente extensa no gato (Liptak and Withrow 2013). As metástases são raras, contudo, não é conhecida a verdadeira incidência uma vez que são poucos os gatos que têm a sua doença localmente controlada e que permitem a observação do potencial metastático a longo prazo (Liptak and Withrow 2013; Bilgic et al. 2015).

A citologia é útil na avaliação de lesões focais ulcerativas na cavidade oral e, ocasionalmente, a PAAF é suficiente para o diagnóstico de CCE oral (Turek and Pellin 2016; Munday et al. 2017). O diagnóstico citológico de CCE oral é apoiado por outros achados clínicos, como a evidência radiográfica de osteólise (Munday et al. 2017). A histologia normalmente possibilita um diagnóstico definitivo. A biópsia incisional é recomendada se o paciente se encontrar sob anestesia e aquando da colheita devem ser evitadas as áreas de inflamação grave, infeção secundária ou necrose (Bilgic et al. 2015; Munday et al. 2017).

Os CCE orais felinos estão associados a um mau prognóstico (Liptak and Withrow 2013).

### **3.4. Estadiamento de CCE Cutâneos e Oraís**

O sistema de estadiamento da Organização Mundial de Saúde (OMS), já vigente na Oncologia Humana, é conhecido pela sigla TNM (do inglês, *Tumor, Node and Metastasis*) e foi adaptado para o estadiamento de muitas das neoplasias em animais domésticos em 1980 (Owen 1980). Este sistema baseia-se na avaliação da dimensão do tumor primário (T), no envolvimento dos linfonodos regionais (N) e na ausência ou presença de metástases à distância (M). As tabelas 1 e 2 compreendem a descrição da aplicação do sistema de estadiamento TNM para neoplasias de origem epidérmica ou dérmica e para neoplasias orais em cães e gatos, respetivamente.

O estadiamento local consiste na avaliação da dimensão da neoplasia primária, com a medição do eixo maior, e da sua extensão (Owen 1980; Hauck 2013). Exames imagiológicos avançados podem ser necessários para uma avaliação precisa das dimensões, lesões infiltrativas ou não móveis (Hauck 2013). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética podem também ser muito úteis para a avaliação da invasão óssea e extensão da neoplasia na cavidade nasal, porção caudal da faringe e órbita. Estes exames revelam-se mais informativos e, quando disponíveis, são preferíveis às radiografias regionais (Liptak and Withrow 2013; Turek and Pellin 2016).

O estadiamento regional envolve a avaliação dos linfonodos regionais com recurso à palpação e citologia (Owen 1980; Hauck 2013). Todavia, a avaliação por palpação pode ser imprecisa uma vez que a dimensão dos linfonodos aparenta ser um fraco preditor de

metástases. Deste modo, o exame citológico por PAAF é fundamental e, caso os resultados citológicos sejam questionáveis, é recomendada a avaliação histopatológica (Hauck 2013; Liptak and Withrow 2013).

Tanto para CCE cutâneos como para CCE orais, a avaliação da metastização à distância deve considerar a realização de três projeções radiográficas (lateral direita, lateral esquerda e dorsoventral ou ventrodorsal) da cavidade torácica (Lascelles 2011; Hauck 2013; Liptak and Withrow 2013).

**Tabela 1 - Estadiamento clínico (TNM) de neoplasias de origem epidérmica ou dérmica em cães e gatos (exceto linfoma e mastocitoma) (adaptado de Owen 1980).**

---

**T: Neoplasia Primária**

- T<sub>0</sub>** Sem evidência de neoplasia
- T<sub>is</sub>** Carcinoma *in situ*
- T<sub>1</sub>** Neoplasia com eixo maior < 2 cm, superficial ou exofítico
- T<sub>2</sub>** Neoplasia com eixo maior 2-5 cm ou com invasão mínima, independentemente do tamanho
- T<sub>3</sub>** Neoplasia com eixo maior > 5 cm ou com invasão do tecido subcutâneo, independentemente do tamanho
- T<sub>4</sub>** Neoplasia com invasão de outras estruturas, como fáscia, músculo, osso ou cartilagem

As neoplasias simultâneas devem ser representadas pela categoria T mais avançada, com o número de neoplasias indicado entre parêntesis (p. ex. T<sub>2(5)</sub>). As neoplasias sucessivas devem ser classificadas de modo independente.

---

**N: Linfonodos Regionais**

- N<sub>0</sub>** Sem evidência de metástases em linfonodos regionais
- N<sub>1</sub>** Linfonodos ipsilaterais móveis
  - N<sub>1a</sub>** Sem evidência de metastização nos linfonodos
  - N<sub>1b</sub>** Com evidência de metastização nos linfonodos
- N<sub>2</sub>** Linfonodos contralaterais ou bilaterais móveis
  - N<sub>2a</sub>** Sem evidência de metastização nos linfonodos
  - N<sub>2b</sub>** Com evidência de metastização nos linfonodos
- N<sub>3</sub>** Linfonodos fixos

---

**M: Metástases à Distância**

- M<sub>0</sub>** Sem evidência de metástases à distância
  - M<sub>1</sub>** Com evidência de metástases à distância – especificar local(ais)
-

**Tabela 2 - Estadiamento clínico (TNM) de neoplasias orais em cães e gatos (adaptado de Owen 1980).**

<b>T: Neoplasia Primária</b>				
	<b>T<sub>0</sub></b>	Sem evidência de neoplasia		
	<b>T<sub>is</sub></b>	Carcinoma <i>in situ</i>		
	<b>T<sub>1</sub></b>	Neoplasia com eixo maior < 2 cm		
		<b>T<sub>1a</sub></b>	Sem evidência de invasão óssea	
		<b>T<sub>1b</sub></b>	Com evidência de invasão óssea	
	<b>T<sub>2</sub></b>	Neoplasia com eixo maior 2-4 cm		
		<b>T<sub>2a</sub></b>	Sem evidência de invasão óssea	
		<b>T<sub>2b</sub></b>	Com evidência de invasão óssea	
	<b>T<sub>3</sub></b>	Neoplasia com eixo maior > 4 cm		
		<b>T<sub>3a</sub></b>	Sem evidência de invasão óssea	
		<b>T<sub>3b</sub></b>	Com evidência de invasão óssea	
<b>N: Linfonodos Regionais</b>				
	<b>N<sub>0</sub></b>	Sem evidência de metástases em linfonodos regionais		
	<b>N<sub>1</sub></b>	Linfonodos ipsilaterais móveis		
		<b>N<sub>1a</sub></b>	Sem evidência de metastização nos linfonodos	
		<b>N<sub>1b</sub></b>	Com evidência de metastização nos linfonodos	
	<b>N<sub>2</sub></b>	Linfonodos contralaterais ou bilaterais móveis		
		<b>N<sub>2a</sub></b>	Sem evidência de metastização nos linfonodos	
		<b>N<sub>2b</sub></b>	Com evidência de metastização nos linfonodos	
	<b>N<sub>3</sub></b>	Linfonodos fixos		
<b>M: Metástases à Distância</b>				
	<b>M<sub>0</sub></b>	Sem evidência de metástases à distância		
	<b>M<sub>1</sub></b>	Com evidência de metástases à distância – especificar local(ais)		
Estadiamento final	<b>I</b>	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub> , N <sub>1a</sub> ou N <sub>2a</sub>	M <sub>0</sub>
	<b>II</b>	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub> , N <sub>1a</sub> ou N <sub>2a</sub>	M <sub>0</sub>
	<b>III</b>	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub> , N <sub>1a</sub> ou N <sub>2a</sub>	M <sub>0</sub>
		Qualquer T	N <sub>1b</sub>	
	<b>IV</b>	Qualquer T	Qualquer N <sub>2b</sub> ou N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
		Qualquer T	Qualquer N	M <sub>1</sub>

### **3.5. Abordagens Terapêuticas**

#### **3.5.1. Cirurgia**

A cirurgia é considerada o tratamento de primeira linha para os CCE cutâneos e orais (Hauck 2013; Turek and Pellin 2016).

Nos gatos, a excisão cirúrgica é o tratamento mais eficiente para os CCE cutâneos dos pavilhões auriculares e pálpebras, assim como para os CCE do plano nasal em estádios mais avançados (Ayres and Liptak 2012). As margens cirúrgicas recomendadas para os CCE felinos dos pavilhões auriculares são de 1 cm (Ayres and Liptak 2012). A excisão completa dos CCE das pálpebras requer 4 a 5 mm de margem limpa e a margem lateral mínima recomendada para os CCE felinos do plano nasal é de 5 mm desde a lesão macroscópica (Thomson 2007; Murphy 2013). Para as lesões nos estádios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, a ressecção completa do plano nasal é normalmente a única maneira de alcançar a margem necessária (Murphy 2013).

A ampla ressecção cirúrgica de CCE cutâneos resulta num controlo a longo prazo em cães e gatos, dada a baixa incidência de metástases (Hauck 2013). Nos gatos, a remoção de CCE *in situ*, juntamente com qualquer área susceptível não pigmentada, pode também impedir a subsequente progressão para CCE invasivos. (Jermyn and Lascelles 2011; Farese and Withrow 2013).

A cirurgia é muitas vezes inexecutável em CCE orais felinos devido à natureza altamente invasiva da neoplasia e ao seu estágio avançado no momento do diagnóstico (Bilgic et al. 2015). Para além destes, o tratamento cirúrgico dos CCE orais encara vários outros desafios, como a invasão óssea e a habitual localização sublingual (Turek and Pellin 2016).

As margens cirúrgicas desejáveis para os CCE orais felinos são idealmente superiores a 2 cm, devido às altas taxas de recidiva local (Liptak and Withrow 2013). Na literatura estão descritas elevadas taxas de recidiva nos gatos com CCE oral tratados com cirurgia (Bilgic et al. 2015).

#### **3.5.2. Radioterapia**

A radioterapia é utilizada alternativamente à cirurgia em carcinomas sem invasão óssea e pode também ser aplicada no pré-operatório para neoplasias em estágio avançado. É particularmente adequada ao tratamento de lesões cutâneas na face, incluindo os carcinomas das pálpebras, pavilhões auriculares e do plano nasal em gatos (Théon, 2010).

Em gatos, os CCE cutâneos do plano nasal podem ser eficazmente tratados com radioterapia, nomeadamente com radioterapia de feixe externo, plasioterapia e protonterapia

(Théon 2010; Hauck 2013). Os maiores e mais invasivos são frequentemente tratados com radioterapia de feixe externo, enquanto que a plesioterapia com estrôncio ( $^{90}\text{Sr}$ ) é a opção viável para as lesões pequenas e superficiais (LaRue and Gordon 2013; Gasymova et al. 2017). Na literatura, a radioterapia demonstrou ser bem tolerada pela maioria dos gatos no tratamento de CCE do plano nasal e foram descritos poucos efeitos agudos clinicamente aceitáveis (Goodfellow et al. 2006; Hammond et al. 2007; Gasymova et al. 2017).

O CCE oral felino é considerado relativamente radiorresistente. A radioterapia assume um papel paliativo na maioria dos gatos com CCE oral devido à natureza agressiva da neoplasia e à sua fraca resposta à radioterapia definitiva (Turek and Pellin 2016).

### **3.5.3. Terapia Fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tipo de tratamento oncológico que emprega meios físicos (laser) e químicos (agente fofossensibilizador) a fim de obter efeitos tumorocidas. As neoplasias superficiais, particularmente as da pele, são as mais adequadas a este tratamento (Helfand 2011). Em Medicina Veterinária, a TFD tem sido mais comumente utilizada no tratamento do CCE (Farese and Withrow 2013). Até então, estudos clínicos de TFD em gatos com CCE cutâneos relataram taxas de resposta completa de 70% a 100% (Roberts et al. 1991; Buchholz et al. 2007; Bexfield et al. 2008). Contudo as recidivas são comuns, provavelmente devido à inadequada exposição ao tratamento das células neoplásicas em maior profundidade (Bexfield et al. 2008; Helfand 2011).

### **3.5.4. Quimioterapia**

Existem poucos dados referentes à utilização da quimioterapia no tratamento de CCE cutâneos em gatos (Hauck 2013). Nestes, a bleomicina demonstrou atividade clínica de curta duração e a mitoxantrona por via intravenosa resultou numa baixa taxa de resposta (Hauck 2013; Murphy 2013). No que respeita a quimioterapia tópica, o imiquimod creme (5%) demonstrou ser eficaz no tratamento de CBIS em 12 gatos, dos quais 5 apresentaram resposta completa em pelo menos uma lesão (Gill et al. 2008).

O CCE oral felino é considerado resistente aos agentes de quimioterapia tradicionais (Liptak and Withrow 2013). Os vários agentes antineoplásicos utilizados no tratamento de CCE orais felinos, incluindo a carboplatina, doxorubicina, mitoxantrona e um análogo de cisplatina, administrados de modo isolado ou em combinação com outros agentes, demonstraram eficácia mínima ou nula (Mauldin et al. 1988; Fox et al. 2000; Kisseberth et al. 2008; Martinez-Ruzafa et al. 2009; Bilgic et al. 2015).

### **3.5.5. Criocirurgia**

A criocirurgia é uma opção de tratamento para CCE cutâneos superficiais (estádios T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>) no gato (Murphy 2013). Neoplasias com dimensões superiores a 0,5 cm estão associadas a taxas de recidiva maiores (Thomson 2007).

### **3.5.6. Inibidores da Ciclooxigenase-2**

Nos humanos existe sobre-expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) em QA e CCE cutâneos, e os inibidores da COX-2 são um tratamento eficaz da QA (Zhan and Zheng 2007). A COX-2 pode ser identificada por imunohistoquímica em CCE cutâneos de cães e gatos e em CCE orais felinos. São no entanto necessários mais estudos para melhor entender o potencial da aplicação dos inibidores de COX-2 nos CCE (Murphy 2013; Turek and Pellin 2016).

### **3.5.7. Inibidores de Recetores de Tirosina Quinases**

Embora melhor caracterizado em humanos, é atualmente reconhecido que a desregulação dos recetores tirosina quinases contribui para o desenvolvimento de várias neoplasias (Argyle 2013).

O toceranib é um inibidor de tirosina quinases aprovado para uso veterinário com ação antitumoral e antiangiogénica. O tratamento de CCE orais felinos com toceranib resultou numa taxa de resposta global de 56,6% e num tempo mediano de sobrevivência de 145 dias, tempo significativamente superior ao obtido pelo grupo controle não tratado (45 dias) (Wiles et al. 2016).

### **3.5.8. Combinação de Tratamentos**

Os CCE cutâneos e orais incompletamente excisados podem beneficiar de um melhor e prolongado controlo tumoral se submetidos a posterior radioterapia (Thomson 2007; Bilgic et al. 2015).

A combinação de radioterapia com quimioterapia demonstrou ser uma opção de tratamento para CCE felinos cutâneos e orais, com possibilidade de melhoria das taxas de resposta e tempos de sobrevivência (de Vos et al. 2004; Liptak and Withrow 2013). Num pequeno grupo de gatos com CCE do plano nasal em estádios avançados, a combinação de radioterapia superficial e carboplatina intralesional resultou em resposta completa em todos os gatos, por um período de 52 a 549 dias (de Vos et al. 2004). Num estudo posterior, o tratamento CCE felinos orais com a combinação de um protocolo de radioterapia e carboplatina resultou numa mediana do tempo de sobrevivência de 163 dias (Fidel et al. 2011).

Do mesmo modo, a combinação de radioterapia com agentes radiosensibilizadores pode aumentar as taxas de resposta em gatos com CCE orais (Liptak and Withrow 2013). Num relato da combinação de radioterapia com etanidazol por via intratumoral como tratamento de gatos com CCE orais, todos os gatos que concluíram o protocolo obtiveram resposta parcial (mediana da regressão do volume de 70%) e a mediana do tempo de sobrevivência foi de 116 dias (Evans et al. 1991).

#### **4. Eletroquimioterapia**

A eletroquimioterapia (EQT) é uma modalidade de tratamento oncológico relativamente recente que associa a administração de agentes quimioterápicos, não permeáveis ou com baixa permeabilidade, com a aplicação localizada de pulsos elétricos permeabilizadores (Spugnini et al. 2012; Spugnini et al. 2016). Esta estratégia instrumental melhora a eficácia dos fármacos antineoplásicos, em particular dos lipofóbicos, os quais frequentemente possuem um índice terapêutico estreito. Posto isto, a EQT assegura a eficácia anticancerígena enquanto a morbidade do paciente é reduzida (Spugnini et al. 2012).

Esta abordagem terapêutica alcançou a aplicação clínica aproximadamente vinte anos após o primeiro ensaio clínico (Belehradek et al. 1993; Mir 2014). Os procedimentos operacionais padrão (POP) para a EQT foram publicados pela primeira vez em 2006, por meio do projeto ESOPE (do inglês *European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy and Electrogenetherapy*), e os POP para a EQT de neoplasias e metástases cutâneas foram atualizados em 2018 (Marty et al. 2006; Mir et al. 2006; Gehl et al. 2018). Nesse entretanto foram também publicados, em 2016, os POP da EQT para o tratamento de neoplasias em cães e gatos (Tozon, Tratar, et al. 2016).

##### **4.1. Fundamentos da Eletroquimioterapia**

O principal mecanismo de atuação da EQT reside na eletropermeabilização das células neoplásicas, que potencia a captação do agente quimioterápico e aumenta a sua citotoxicidade por várias ordens de magnitude. Contudo, mecanismos adicionais podem contribuir substancialmente para a eficácia antitumoral da EQT, tais como os efeitos modificadores do fluxo sanguíneo peri e intra-tumoral e o desencadear de resposta imunológica (Čemažar et al. 2008; Jarm et al. 2010; Gehl et al. 2018).

### 4.1.1. Eletropermeabilização

A eletropermeabilização (EP), também denominada eletroporação, é consistentemente definida pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, por influência de um campo elétrico, a moléculas de outro modo não permeáveis ou com baixa permeabilidade (Mir 2014). Das várias teorias existentes para a EP de células, a elaborada por Eberhard Neumann é a mais frequentemente mencionada. Esta teoria afirma que as flutuações normais da membrana plasmática podem ser amplificadas pelo potencial transmembranar induzido por pulsos elétricos, resultando na formação de vias que estabelecem acesso para transporte molecular (Neumann et al. 1982; Mir 2014).

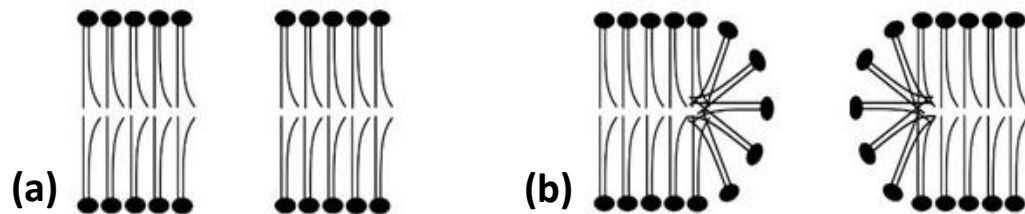
Nas células animais, os meios celulares interno e externo são altamente condutores. Em contrapartida, a membrana plasmática, responsável por isolar o meio intracelular do extracelular, não é condutora. Sob a influência de um campo elétrico, todas as moléculas eletricamente carregadas nos meios celulares interno e externo deslocam-se por eletroforese e o seu movimento finda assim que a membrana plasmática é atingida (Mir, 2014). Deste modo, cargas opostas acumulam-se em ambos os lados da membrana resultando na indução de um potencial transmembranar ( $\Delta V_m$ ), que, segundo uma hipótese simplificada válida, é representada pela seguinte equação:

$$\Delta V_m = 1.5 \times r \times E_{ext} \times \cos\theta$$

Onde  $r$  corresponde ao raio da célula,  $E_{ext}$  à força do campo elétrico externo e  $\theta$  ao ângulo polar relativo à direção do campo elétrico. A modulação do potencial transmembranar está linearmente relacionada com a intensidade do campo elétrico aplicado e é dependente da posição da superfície celular (Mir 2014).

O aumento do potencial transmembranar acima de um valor limiar provoca a formação de defeitos estruturais passíveis de trespasse nas membranas celulares, frequentemente denominados poros (Abidor et al. 1979; Teissié 2014). A formação dos poros é um processo estocástico no qual ocorre a penetração de colunas de moléculas de água em primeiro lugar. Sob a ação do campo elétrico, dipolos de água organizam-se e formam colunas com quase uma única molécula de espessura que penetram a camada de caudas lipídicas – hidrofóbicas. Seguidamente, as cabeças dos fosfolípidos – hidrofílicas – movem-se também para o interior da membrana e as colunas rapidamente dilatam de modo a originar grandes poros condutores hidrofílicos (Mir, 2014; Neumann et al., 1982). Em suma, os grandes poros hidrofóbicos (figura 1a) tornam-se hidrofílicos (figura 1b) mediante a reorientação das moléculas de fosfolípidos, através da rotação dos lípidos nos limites entre a bicamada lipídica e o meio aquoso, fazendo com que a superfície interna do poro seja revestida com grupos polares (Abidor et al. 1979; Neumann et al. 1982; Mir 2014).

A estrutura física dos poros eletricamente induzidos é algo que ainda não se encontra estabelecido claramente (Teissié 2014). No modelo inicial foi assumido que estes são cilíndricos e perpendiculares à superfície da membrana, e posteriormente foi proposto possuírem uma forma toroidal (Abidor et al. 1979; Teissié 2014). Apesar disso, a maior parte dos modelos conclui que a maioria dos poros têm cerca de 1 nm de diâmetro (Teissié 2014).



**Figura 1 - Representação esquemática da configuração hipotética de um poro hidrofóbico (a) e hidrofílico (b) em seção transversal, de raio  $r$  (adaptado de Neu and Neu 2009).**

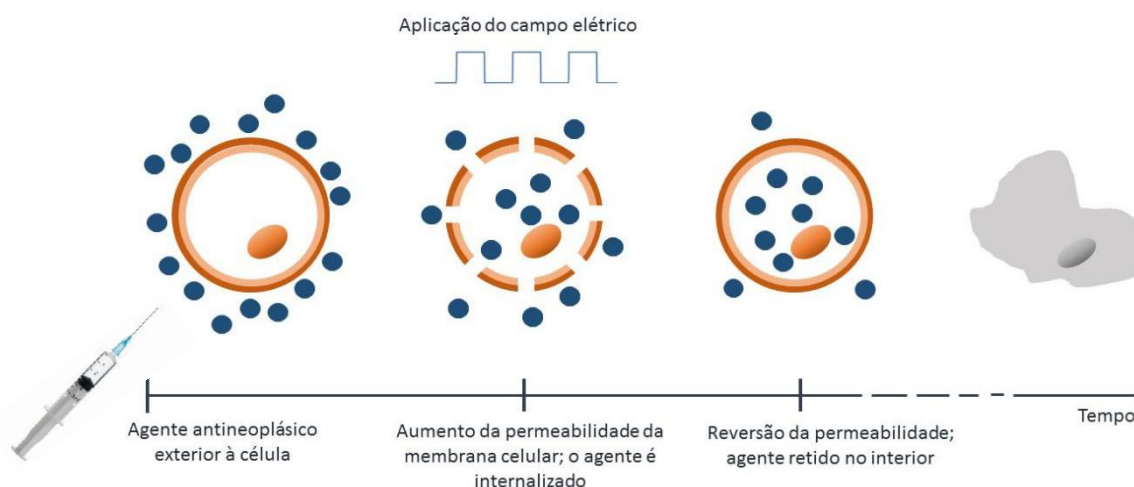
A EP da membrana celular depende de vários parâmetros físicos associados à técnica: intensidade, número e duração dos pulsos elétricos (Teissié 2014). A intensidade do campo elétrico determina a extensão da área de membrana permeabilizada, enquanto que a densidade de defeitos nesta área (i. e., a taxa de fluxo através da membrana) está sob o controle do número e duração dos pulsos elétricos (Gabriel and Teissié 1997). Assim, o aumento da intensidade necessária à EP resulta num aumento de área de membrana capaz de ser permeabilizada, mas não num aumento específico da permeabilidade da área alterada (Teissié 2014).

A exposição de células e tecidos a pulsos elétricos apropriados aporta também consequências ao nível das moléculas carregadas. O campo elétrico induz um deslocamento eletroforético de moléculas carregadas, primeiramente em direção à porção permeabilizada da superfície da célula e, depois, desde a porção permeabilizada para o interior do citoplasma (Mir 2014; Teissié 2014). O transporte é dependente da natureza da molécula, sendo que as moléculas pequenas obtêm maior locomobilidade (Teissié 2014).

A EP pode ser reversível ou irreversível. Na EP reversível as consequências da exposição ao campo elétrico são transitórias e na EP irreversível a permeabilização da membrana celular ocorre de modo permanente, verifica-se a impossibilidade de restaurar a estrutura da membrana e a subsequente morte celular (Davalos et al., 2005; Mir, 2014). O mecanismo pelo qual se dá a modificação do potencial transmembranar é semelhante em ambas, no entanto, para a EP irreversível são necessários pulsos elétricos de maior magnitude e duração (Davalos et al. 2005).

A EP reversível foi descrita pela primeira vez em 1982 e é uma abordagem utilizada rotineiramente há mais de 20 anos em biologia molecular e celular (Neumann et al. 1982; Spugnini and Baldi 2014). Mais recentemente, a EP reversível alcançou a aplicação clínica, sendo a EQT uma das principais aplicações terapêuticas *in vivo* (Spugnini and Baldi 2014; Teissié 2014).

Através da EP reversível, a EQT possibilita o aumento da citotoxicidade dos agentes quimioterápicos por várias ordens de magnitude unicamente na área exposta ao campo elétrico (figura 2) (Čemažar et al. 2008; Jarm et al. 2010; Serša and Čemažar 2016). Deste modo, a EQT atua como uma espécie de quimioterapia localmente potenciada (Cadossi et al. 2014).



**Figura 2 – Exemplificação gráfica da potenciação do agente antineoplásico mediante o mecanismo de eletropermeabilização (adaptado de Miklavčič et al. 2012).**

#### **4.1.2. Efeitos Modificadores do Fluxo Sanguíneo**

As terapias baseadas na EP causam alterações na circulação sanguínea e permeabilidade vascular, e provocam a disrupção de redes de vasos sanguíneos *in vivo* (Kanthou et al. 2006). Posto isto, para além do mecanismo de atuação preponderante supramencionado, a EQT evidencia efeitos vasculares de importância significativa (Serša and Čemažar 2016).

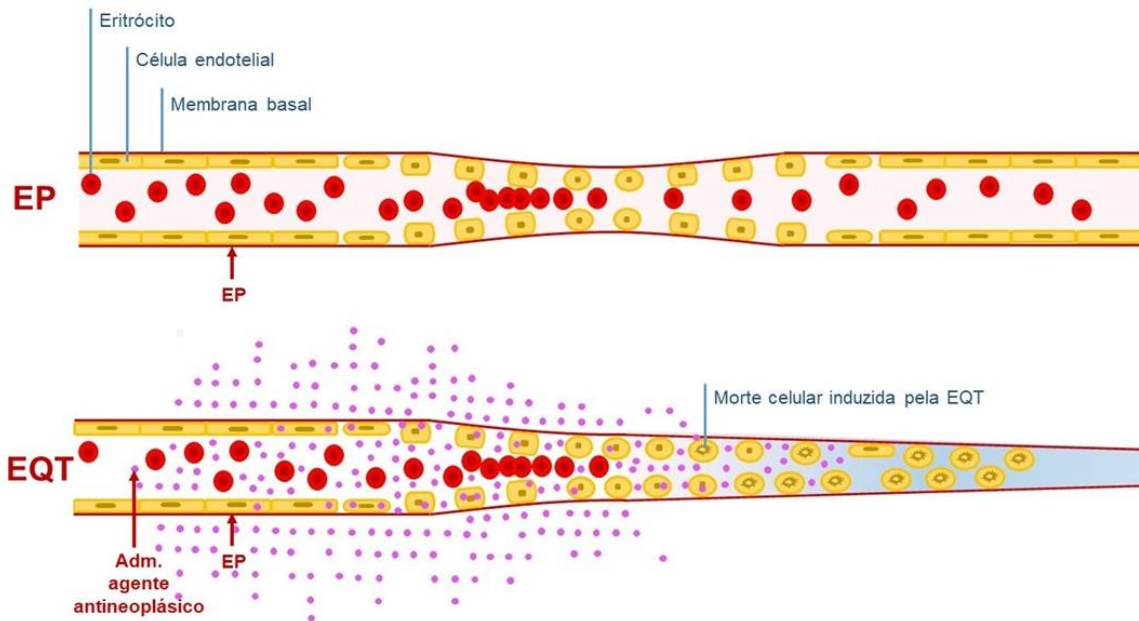
A EP incita um fenómeno de hipoperfusão transiente denominado *vascular lock* (Gehl et al. 2002). Estudos pré-clínicos demonstraram uma significativa e imediata redução da perfusão sanguínea, de até 80 %, nos tecidos expostos aos pulsos elétricos (Serša et al. 1999; Serša and Čemažar 2016). Este fenómeno de hipoperfusão transiente é estabelecido muito rapidamente, podendo ser detetado no primeiro minuto após a EP (Serša, Jarm, et al. 2008).

O *vascular lock* tem a duração de 1 a 2 minutos em músculo esquelético, enquanto que nas neoplasias foi relatado que este efeito prevalece durante horas (Serša et al. 1999; Gehl et al. 2002).

Outro efeito da EP é a indução da permeabilidade vascular. A administração dos pulsos elétricos afeta todas as células na neoplasia, inclusive as endoteliais (Markelc et al. 2013). Uma vez expostas aos pulsos elétricos, as células endoteliais sofrem uma profunda perturbação do citoesqueleto, uma perda de contratilidade e de junções célula-célula. Deste modo, ocorre o arredondamento das células endoteliais e, conseqüentemente, a permeabilização do endotélio (Kanthou et al. 2006; Serša and Čemažar 2016). O vazamento de fluidos e moléculas para o volume extracelular leva ao aumento da pressão intersticial e sucede-se a compressão dos pequenos vasos sanguíneos (Gehl et al. 2002; Serša and Čemažar 2016).

Para além do efeito modificador da circulação sanguínea imediato, estudos clínicos e pré-clínicos evidenciaram a ação disruptiva vascular da EQT em neoplasias após 24 horas (Serša, Jarm, et al. 2008; Markelc et al. 2013; Serša and Čemažar 2016). Um modelo postulou que, se as células endoteliais eletropermeabilizadas nas neoplasias internalizam o fármaco antineoplásico e sofrem morte celular, a permeabilidade dos pequenos vasos tumorais pode ser afetada e a circulação sanguínea aniquilada permanentemente (Jarm et al. 2010; Serša and Čemažar 2016). A continuação deste efeito resulta numa extensa necrose de células neoplásicas e, por conseguinte, na completa regressão tumoral (Serša, Jarm, et al. 2008).

De um modo geral, os efeitos modificadores do fluxo sanguíneo da EQT contribuem para a ação antitumoral de duas formas: através da exposição prolongada das células neoplásicas ao agente antineoplásico, devido ao seu aprisionamento na neoplasia (efeito *vascular lock*), e por meio de uma cascata de morte celular secundária, resultante do déficit de oxigénio e nutrientes e da acumulação de produto residual na neoplasia (efeito de disrupção vascular) (figura 3) (Jarm et al. 2010).



**Figura 3 – Exemplificação gráfica dos efeitos modificadores do fluxo sanguíneo resultantes da eletropermeabilização (EP) e eletroquimioterapia (EQT) (adaptado de Jarm et al. 2010).**

#### **4.1.3. Resposta Imunitária**

A eficácia da EQT também é, em parte, sustentada por uma resposta imunitária (Mir 2006). A destruição das células neoplásicas ativa uma resposta do sistema imunológico que, por sua vez, contribui para a erradicação das células neoplásicas remanescentes (Serša and Čemažar 2016).

Foram evidenciadas diferenças na resposta das neoplasias à EQT em função do estado do sistema imunitário do animal desde os primeiros ensaios pré-clínicos (Silve and Mir 2010). A eficácia antitumoral da EQT demonstrou ser substancialmente menor em murganhos *nude* que em murganhos imunocompetentes (Mir et al. 1991; Serša et al. 1997; Calvet and Mir 2016). Num dos estudos, o tempo de atraso da progressão tumoral foi aproximadamente duas vezes mais longo em murganhos imunocompetentes que em murganhos imunocomprometidos (Serša et al. 1997). Além disso, as neoplasias completamente erradicadas foram exclusivamente observadas em animais com resposta imunológica normal (Serša et al. 1997; Jarm et al. 2010).

#### **4.2. Protocolos de Eletroquimioterapia**

Uma vez alcançado o nível pretendido de analgesia, o agente antineoplásico é administrado por via intralesional ou intravenosa (Spugnini and Baldi 2014). Os POP da EQT para o tratamento de neoplasias em cães e gatos indicam a administração intralesional para pacientes com apenas um ou poucos nódulos, e a administração sistêmica quando possuem

acima de cinco nódulos, aproximadamente (Tozon, Tratar, et al. 2016). Por sua vez, nos mais atuais POP para a EQT de neoplasias e metástases cutâneas, a administração intralesional é recomendada para as neoplasias de menores dimensões e em menor número – menores ou iguais a 3 cm<sup>2</sup> ou com 7 ou menos nódulos –, enquanto que a administração sistémica é preferível para neoplasias maiores e numerosas – acima de 3 cm<sup>2</sup> ou de 7 nódulos (Gehl et al. 2018).

Em vários dos estudos em animais de companhia foi adotado um pré-tratamento com administração local de hialuronidase, a fim de dissolver o tecido conjuntivo persistente e, conseqüentemente, possibilitar uma distribuição mais homogénea do agente antineoplásico (Spugnini, Baldi, Vincenzi, et al. 2007; Spugnini, Filipponi, et al. 2007; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Bufalini, et al. 2008; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, et al. 2008; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, De Luca, et al. 2008; Spugnini et al. 2009; Spugnini et al. 2010).

Os pulsos elétricos permeabilizadores são administrados depois dos agentes antineoplásicos, devendo ser aplicados durante o pico de concentração máximo do agente (Spugnini and Baldi 2014). Segundo os POP da EQT para o tratamento de neoplasias em cães e gatos, os pulsos elétricos devem ser aplicados de modo imediato (dentro de 1 minuto), se o agente antineoplásico for administrado por via intralesional, ou passados 8 minutos, se administrado por via intravenosa. Previamente é realizada a tricotomia da área de pele a ser subjugada ao tratamento e é utilizado um gel eletrocondutor de base aquosa de modo a maximizar o contacto entre a lesão e os elétrodos (Tozon, Tratar, et al. 2016).

O tratamento é repetido em intervalos de uma ou duas semanas até que seja alcançada uma resposta completa ou até que ocorra progressão da neoplasia (Spugnini and Baldi 2014).

#### **4.2.4. Agentes Antineoplásicos**

O pré-requisito para que o agente antineoplásico seja eficaz em combinação com a EP é o próprio não ser capaz de atravessar a membrana celular, devido às suas propriedades químicas ou por falta de mecanismo de transporte (Gehl et al. 1998; Mir 2006). Os que mais beneficiam desta associação são os agentes antineoplásicos de natureza lipofóbica (Spugnini et al., 2016). A bleomicina e a cisplatina são os agentes correntemente utilizados na prática clínica da EQT, sendo que a bleomicina foi o primeiro e mais ativamente estudado (Spugnini et al. 2016; Tozon, Tratar, et al. 2016; Gehl et al. 2018).

#### **4.2.4.1. Bleomicina**

A bleomicina foi descoberta pela primeira vez em 1966 por Umezawa *et al.* Esta molécula pertence à família dos antibióticos glicopeptídicos e exibe atividade citotóxica em células de mamíferos. A citotoxicidade da bleomicina advém principalmente da indução da clivagem de cadeia simples e dupla de ADN e, secundariamente, da indução da clivagem seletiva de RNA (Mir et al. 1996; Gothelf et al. 2003; Spugnini et al. 2012). No entanto, devido à sua natureza lipofóbica, as moléculas de bleomicina apenas podem ser internalizadas nas células por meio de proteínas de transporte da membrana celular, o que, sob condições normais, resulta numa captação lenta e quantitativamente limitada (Gothelf et al. 2003; Spugnini et al. 2012). Para além disso, o principal mecanismo de evasão das células neoplásicas submetidas a quimioterapia consiste na modulação da expressão das proteínas de transporte nas membranas plasmáticas, com consequente comprometimento da sua função (Spugnini et al. 2012; Almasi and Hiani 2020).

Quando as células são eletropermeabilizadas, a bleomicina passa a ter acesso direto ao citosol e a fragmentação de ADN é concluída em menos de trinta segundos após a sua entrada na célula (Mir et al. 1996; Spugnini et al. 2016). Num estudo comparativo entre a ação da bleomicina com EP e da bleomicina isolada, foram evidenciados dois diferentes mecanismos de morte celular, dependentes do número de moléculas de bleomicina interiorizadas. Na ausência de EP, apenas alguns milhares de moléculas de bleomicina são interiorizadas; as células alvo param na fase G2-M, aumentam de dimensão e tornam-se polinucleadas antes da morte. Quando a bleomicina é combinada com a EP, o número de moléculas interiorizadas torna-se aproximadamente setecentas vezes superior e, neste caso, é induzida morte celular apoptótica (Tounekti et al. 1993; Gothelf et al. 2003; Spugnini et al. 2012; Spugnini et al. 2016).

### **4.3. A Eletroquimioterapia em Medicina Veterinária**

A EQT demonstrou ser adequada para o tratamento de várias neoplasias cutâneas e subcutâneas de diferentes tipos histológicos em cães, gatos e cavalos (Spugnini et al. 2016; Tozon, Tratar, et al. 2016). Até à data, as neoplasias predominantemente tratadas em Medicina Veterinária incluem: mastocitoma e tumores perianais caninos, CCE felino e sarcoides equino (Tozon, Tamzali, et al. 2016). As taxas de resposta global obtidas pelos animais de companhia submetidos a EQT para tratamento de neoplasias cutâneas e subcutâneas rondam os 80%, sendo comparáveis às obtidas em Medicina Humana no tratamento de neoplasias semelhantes (Mali, Jarm, et al. 2013; Tozon, Tamzali, et al. 2016).

A EQT é utilizada de modo adjuvante na maioria das neoplasias, excetuando o tumor perianal em cães e o CCE da cabeça em gatos, nos quais pode ser adotada como tratamento de primeira linha (Spugnini et al. 2016).

A EQT continua a ser investigada para neoplasias de diferentes tipos histológicos em animais de companhia, tendo vindo a definir padrões de resposta específicos e fatores de prognóstico, clínicos e histopatológicos (Spugnini, Baldi, Vincenzi, et al. 2007; Spugnini, Baldi, Mellone, et al. 2007; Spugnini, Vincenzi, et al. 2011; Spugnini et al. 2012). Atendendo à sua relativa simplicidade de execução, acessibilidade de preços e eficácia, a EQT demonstra-se promissora na Medicina Veterinária (Čemažar et al. 2008; Tozon, Tamzali, et al. 2016).

## **5. A Eletroquimioterapia como Tratamento de CCE em Gatos**

A EQT tem demonstrado ser extremamente eficaz em carcinomas felinos da cabeça e pescoço, em particular nos CCE induzidos por exposição solar (Spugnini et al. 2016). O primeiro estudo na região da cabeça relata a utilização da EQT para o tratamento de carcinomas felinos induzidos por exposição solar (Spugnini and Baldi 2014). Neste, os gatos com CCE foram tratados com bleomicina IT seguida de sucessões de pulsos elétricos bifásicos. A resultante taxa de resposta clínica descrita foi de 100%, com 77,7% de respostas completas e 22,3% de respostas parciais, e os efeitos colaterais foram limitados a eritema transiente, edema e inflamação focal (Spugnini et al. 2009). Posteriormente, um outro estudo em gatos com CCE, desta vez com administração de bleomicina IV seguida de pulsos elétricos de onda quadrada, alcançou uma taxa de resposta completa de 81,8% (Tozon et al. 2014). Em ambos os estudos foram descritas taxas de respostas muito altas e duradouras (entre 2 meses e 3 anos e meio), assim como muito bons resultados cosméticos, no que diz respeito à aparência e preservação de função (Spugnini et al. 2009; Tozon et al. 2014; Spugnini et al. 2016).

A EQT foi posteriormente descrita para o tratamento de carcinomas avançados da cabeça e pescoço em gatos, exceto CCE orais (Spugnini et al. 2016). Neste artigo de pesquisa, os gatos com CCE avançados foram distribuídos por dois grupos de tratamento diferentes: bleomicina isolada (grupo de controlo) ou bleomicina IT combinada com EQT. O grupo da EQT atingiu uma taxa de resposta global de 89%, com 81% de respostas completas e tempo mediano até recidiva de 60 semanas, enquanto que o grupo de controlo obteve uma taxa de resposta de 33% e tempo mediano até recidiva de 2 semanas (Spugnini and Baldi 2014; Spugnini et al. 2015). Os efeitos colaterais foram limitados à inflamação local e a EQT exibiu melhores resultados que o grupo de controlo (Spugnini et al. 2015; Spugnini et al. 2016). Esta investigação preliminar demonstrou a capacidade da EQT tratar carcinomas amplos, mesmo em áreas sensíveis como a área periocular e pálpebras (Spugnini et al. 2016).

Mais recentemente, a aplicação de EQT com duas diferentes doses de bleomicina IV em gatos com CCE cutâneos resultou numa taxa de resposta de 72% no final do período de observação, inteiramente constituída por respostas completas (Dos Anjos et al. 2020). O mais recente estudo descreve a EQT como tratamento de CCE felinos do plano nasal e relata uma taxa de resposta global de 96,7%, com 65,6% de respostas completas (Simčič et al. 2021).

1 Tabela 3 - Resumo dos estudos de EQT realizados em gatos com CCE.

Tipo Histológico e Localização Anatômica (n)	Estádio Clínico	N.º de Pacientes	Protocolo	Agente Antineoplásico	Resposta ao Tratamento		Duração da Resposta	Ref. <sup>a</sup>
CCE: Plano nasal (2), pavilhão auricular (2) e oral (1)	-	4	· 8 pulsos elétricos bifásicos 1300 V/cm e 800 V/cm	Bleomicina IT	3 RC		90-465 dias	(Spugnini and Porrello 2003)*
					1 RP		120 dias	
					1 DP		-	
CCE: Plano nasal (7), pavilhão auricular (1) e periocular (1)	T <sub>2</sub> -T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	9	· 8 pulsos elétricos bifásicos 1300 V/cm	Bleomicina IT	100% RG;	77,7% RC	90-1613 dias	(Spugnini et al. 2009)
						22,3% RP	70-90 dias	
CCE: Plano nasal (8), pavilhão auricular (7) e periocular (1)	T <sub>is</sub> -T <sub>4</sub>	11	· 8 pulsos elétricos de onda quadrada 1300 V/cm	Bleomicina IV	81,5% RC (9/11) e 87,5% RC (14/16)		2-42 meses	(Tozon et al. 2014)
CCE e carcinoma anaplásico perioculares (12) e CCE avançado da cabeça (14)	T <sub>2</sub> -T <sub>3</sub> M <sub>0</sub>	26	· 8 pulsos elétricos bifásicos 1300 V/cm	Bleomicina IV	89% RG; 81% RC		Tempo mediano até recidiva: 15 meses	(Spugnini and Baldi 2014; Spugnini et al. 2015)

CCE: Plano nasal (33), periocular (22), pavilhão auricular (6), lábio (4) e mandíbula (1)	T <sub>1</sub> (31) T <sub>2</sub> (16) T <sub>3</sub> (5) T <sub>4</sub> (4) N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	56	· 8 pulsos elétricos bifásicos 1300 V/cm	Bleomicina IV	72% RC	30-485 dias	(Dos Anjos et al. 2020)
CCE Plano nasal	T <sub>x</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	61	· 8 pulsos elétricos de onda quadrada 400-1300 V/cm	Bleomicina IV	96,7% RG; 65,5% RC 31,1% RP	39-302 dias	(Simčič et al. 2021)

1 Nota. IT, via intralesional; IV, via intravenosa; RC, remissão completa; RP, remissão parcial; RG, resposta geral. \*Pacientes de um estudo de EQT que incluiu vários animais de  
2 companhia e neoplasias de diferentes tipos histológicos.

### 1 **III – ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO DE CARCINOMA DE** 2 **CÉLULAS ESCAMOSAS EM GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO**

#### 3 **1. Objetivos**

4 O presente trabalho teve como principal objetivo a realização de um estudo  
5 retrospectivo para avaliação da eficácia da EQT como abordagem terapêutica em gatos  
6 diagnosticados com CCE orais e cutâneos localizados na cabeça e pescoço, com  
7 classificação da resposta às quatro semanas após tratamento. Pretendeu-se ainda a  
8 avaliação da segurança do tratamento através do relato e caracterização dos efeitos adversos,  
9 locais e sistêmicos, experienciados pelos animais submetidos a EQT.

10

#### 11 **2. Materiais e Métodos**

##### 12 **2.1. Pacientes**

13 Durante um período de treze meses, entre dezembro de 2015 e novembro de 2016,  
14 um total de quinze gatos com CCE na região da cabeça admitidos no Hospital Veterinário  
15 Berna, do grupo OneVet, foram submetidos a tratamento com EQT.

16 No estudo foram incluídos todos os gatos, fêmeas ou machos, submetidos a pelo  
17 menos uma sessão de quimioterapia no período de tempo considerado, e com um seguimento  
18 realizado no mínimo quatro semanas após o início do tratamento. Foram incluídos apenas  
19 gatos com diagnóstico de CCE por exame citológico ou histopatológico. Previamente ao  
20 tratamento de EQT foi obtido o consentimento informado dos tutores de cada um dos animais.

21 Os animais sujeitos a outros tratamentos de modo concomitante foram excluídos deste  
22 estudo, assim como os com presença de metastização, regional e à distância, ou com  
23 doenças subjacentes potencialmente fatais.

24 Dos quinze gatos, doze eram particulares e três pertencentes a instituições zóofilas.  
25 Os animais foram tratados com EQT na impossibilidade da prática de tratamentos padrão  
26 (devido, por exemplo, à localização ou extensão das neoplasias), na ausência do  
27 consentimento dos tutores para outros tratamentos ou por razões de natureza económica.

28 Dos quinze gatos incluídos no estudo, treze apresentavam CCE cutâneos (onze com  
29 CCE do plano nasal, um com CCE da pálpebra e um com CCE da comissura palpebral,  
30 têmpora e fronte) e dois possuíam CCE orais (um com CCE maxilar e um com CCE  
31 mandibular).

1 O diagnóstico de CCE foi confirmado por exame histopatológico em seis gatos, quatro  
2 com CCE cutâneos (pacientes 6, 10, 11 e 13) e dois com CCE orais (pacientes 5 e 15). Destes,  
3 um gato com lesão cutânea do plano nasal (paciente 6) foi diagnosticado por exame  
4 histopatológico com carcinoma escamoso basalóide, subtipo histológico do CCE.

5 Nos restantes gatos, para além da aparência e localização típicas das lesões  
6 cutâneas, a realização de citologia aspirativa – punção aspirativa por agulha fina – suportou  
7 o diagnóstico de CCE.

8 Todos os gatos foram submetidos a uma extensa anamnese e exame físico geral, com  
9 palpação e avaliação citológica dos linfonodos submaxilares para avaliar a presença de  
10 metastização. Foram também realizadas colheitas para hemograma completo e perfil  
11 bioquímico antes do tratamento. Ademais, em dois gatos foram realizadas radiografias  
12 torácicas e ultrassonografias abdominais (pacientes 11 e 13), e três foram submetidos ao  
13 exame de TC (pacientes 8, 13 e 15).

14 O grupo de estudo é composto por cinco fêmeas e dez machos com idades  
15 compreendidas entre os 4 e os 17 anos (média de 9,7 anos). Apenas um gato era de raça  
16 determinada, Bosques da Noruega, sendo os restantes catorze de raça indeterminada. As  
17 lesões de CCE a tratar foram medidas com recurso a um paquímetro (figura 4). O diâmetro  
18 maior das lesões de CCE na altura da admissão encontrava-se entre os 0,6 e os 4,5 cm.

19 Embora os pacientes incluídos no estudo não tenham recebido tratamento concomitante,  
20 dois dos gatos com CCE cutâneos do plano nasal foram previamente sujeitos a diferentes  
21 tratamentos. À apresentação, o paciente 9 já tivera sido tratado com duas sessões de  
22 criocirurgia, sem resposta, e o paciente 14 apresentara recidiva local após tratamento com  
23 TFD (duração de resposta de aproximadamente um mês e meio).



24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34 **Figura 4 - Demonstração da medição de uma lesão de CCE do plano nasal com um paquímetro (paciente 13).**  
35

## 2.2. Gerador de Pulsos Elétricos

Foi utilizado um dispositivo gerador de pulsos elétricos de uso exclusivo veterinário – ELECTROvet® S13 (LEROY biotech) –, projetado para a aplicação de tratamentos de EQT e eletrogeneterapia em nódulos neoplásicos cutâneos e subcutâneos (figuras 5 e 6). O ELECTROvet® S13 cumpre os requisitos das diretivas europeias 2006/95/EC (12/12/2006), aplicável ao material elétrico destinado a ser utilizado dentro de certos limites de tensão, e 2004/108/EC (15/12/2004), relativa à compatibilidade eletromagnética.

O ELECTROvet® S13 é composto por um gerador de pulsos elétricos com forma de onda quadrada. Este providencia a possibilidade de empregar diferentes tensões elétricas, um variado número de pulsos elétricos e respetivas durações. Os pulsos elétricos não são produzidos de modo individual, mas sim em descargas (*bursts*) de oito pulsos cada, de forma a reduzir o tempo de tratamento e a morbidade geral do paciente. A configuração padrão deste gerador de pulsos para a EQT consiste em séries de oito pulsos elétricos com a duração de 100  $\mu$ s (50 + 50  $\mu$ s) cada, com 1300 V/cm de amplitude para a relação da distância entre elétrodos e frequência de 500Hz.

A aplicação dos pulsos elétricos é aprontada através do toque no ecrã tátil ou ao exercer pressão no pedal interruptor. De modo subsequente, os pulsos elétricos são fornecidos quando pressionado o botão de ativação situado no suporte do elétrodo portátil.



Figura 5 - Exemplar Exemplar do dispositivo gerador de pulsos ELECTROvet® S13 (LEROY biotech) com o respetivo pedal e elétrodo.

Obtido a 20 de Dezembro, 2016, a partir de: <http://vetiss.pl/urzadzenie/eLECTROvet-S13>



Figura 6 - Dispositivo gerador de pulsos elétricos utilizado, ELECTROvet® S13 (LEROY biotech).

### 2.3. Eléctrodo

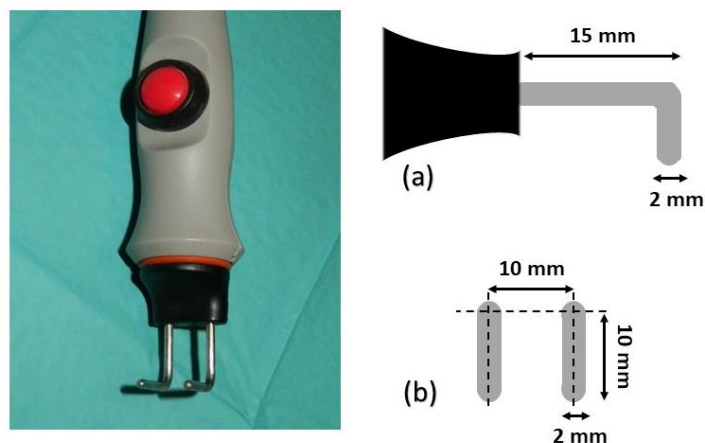
Foi utilizado o eléctrodo portátil associado ao dispositivo gerador de pulsos eléctricos ELECTROvet® S13 (primeira geração).

O eléctrodo é equipado com um botão de ativação de pulsos eléctricos no seu suporte. É constituído por um par de eléctrodos de hastes de aço inoxidável, paralelos e com configuração em "L", especialmente concebido para o tratamento de neoplasias cutâneas de qualquer dimensão (figura 7).

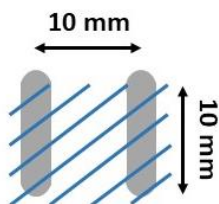
Os eléctrodos possuem pontas arredondadas, uma espessura de 2 mm e uma altura de 15 mm, esta última dimensão que representa a porção do eléctrodo utilizada para cingir e comprimir as neoplasias proeminentes. As bordas dos eléctrodos representam as porções destinadas ao contacto com neoplasias de superfície lisa e perfazem uma área fixa de 10 mm por 10 mm. Deste modo, a distribuição de um campo eléctrico adequado para a indução da EP nas células dos tecidos alvo (i. e., neoplasia) verifica-se numa área de sensivelmente 1 cm<sup>2</sup> com este eléctrodo (figuras 8 e 9).



**Figura 7 - Eléctrodo portátil utilizado com configuração em "L".**



**Figura 8 - Representação esquemática das partes ativas do eletrodo utilizado com configuração em “L” e respectivas dimensões; vista lateral (a) e vista frontal (b).**



**Figura 9 - Representação esquemática das porções do eletrodo utilizado destinadas ao contacto com neoplasias de superfície lisa (vista frontal) e da respetiva distribuição de campo elétrico. O tracejado azul representa a área aproximada onde o campo elétrico local é suficiente para a EP.**

## 2.4. Procedimento do Tratamento

O tratamento foi realizado em conformidade com os protocolos de EQT fundamentados nos estudos anteriores no âmbito da Medicina Veterinária de EQT associada a bleomicina como tratamento de CCE em gatos (Spugnini and Porrello 2003; Spugnini et al. 2009; Tozon et al. 2014; Spugnini et al. 2015).

Os pacientes foram sujeitos a uma anestesia geral de curta duração. Para este efeito, foram utilizadas diferentes combinações de fármacos injetáveis, administrados por via intravenosa ou intramuscular. Os fármacos individuais e as respetivas doses utilizadas foram adequados às necessidades específicas dos pacientes, do clínico e do tratamento.

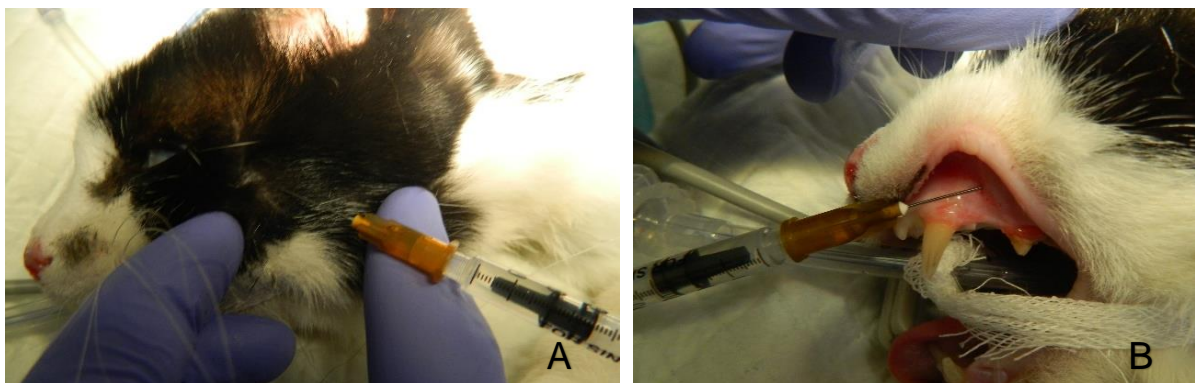
Para a pré-medicação foram utilizados opióides, como a metadona (0,3 mg/kg), agonistas alfa-2 adrenérgicos, como a medetomidina (0,01-0,05 mg/kg), e derivados das benzodiazepinas, como o midazolam (0,05-0,3 mg/kg). Passados sensivelmente trinta

minutos foi induzida a anestesia geral com alfaxalona (0,5 mg/kg) ou propofol (ao efeito). O fentanil (2-5 µg/kg) foi utilizado, por vezes, como agente complementar.

Seguiu-se a colocação do tubo endotraqueal e a anestesia foi mantida com isoflurano, administrado ao paciente em oxigénio através de um circuito anestésico. Durante a anestesia todos os animais receberam fluidoterapia endovenosa, com Cloreto de Sódio 0,9% ou Lactato de Ringer, e foi assegurada a monitorização da função respiratória, da função cardiovascular e da temperatura corporal.

Em alguns dos gatos foi ainda empregada anestesia regional, nomeadamente o bloqueio de nervos periféricos (figura 10). O bloqueio anestésico dos nervos da mandíbula e da maxila foi realizado com a combinação de bupivacaína (0.5%) e lidocaína (2%).

Dois gatos com CCE do plano nasal foram medicados com atropina (0,02 mg/kg) por via intravenosa devido ao excesso de secreções do trato respiratório.



**Figura 10 - Bloqueios anestésicos do nervo maxilar (A) e do nervo infraorbitário (B).**



**Figura 11 - Gato sob anestesia geral, posicionado para iniciar o tratamento com EQT (paciente 4).**

Uma vez alcançado o nível pretendido de analgesia, foi administrado na forma de uma injeção intravenosa lenta o agente antineoplásico de eleição – a bleomicina, na dose de 30 mg/m<sup>2</sup>. A bleomicina foi administrada por via intralesional apenas na primeira sessão de EQT no gato com CCE oral da maxila, na dose de 3 mg/cm<sup>3</sup>.

Aproximadamente dez minutos após a administração da bleomicina por via intravenosa – cinco minutos quando administrada por via intralesional –, foi induzida a eletropermeabilização do tecido neoplásico. Os pulsos elétricos permeabilizadores foram ministrados mediante a aposição do eletrodo na superfície do tecido neoplásico (figura 12). Cada carga aplicada foi composta por uma sequência de oito pulsos elétricos de forma de onda quadrada, com 1300 V/cm de amplitude, 100 µs de duração e 1 Hz de frequência. O contacto do eletrodo com a área a tratar foi otimizado com a prévia aplicação de um gel condutor.

Uma vez que o campo elétrico diminui rapidamente na área exterior aos eletrodos, o tecido a tratar foi totalmente enquadrado dentro dos eletrodos. Os pulsos elétricos foram empregados em toda a extensão das neoplasias, assim como nas margens.

De modo a assegurar cobertura suficiente, efetuou-se a sobreposição de pulsos elétricos no tecido neoplásico. A administração da primeira série de oito pulsos elétricos é alcançada num único disparo. Na administração da segunda série de oito pulsos elétricos, os eletrodos são dispostos perpendicularmente ao primeiro posicionamento do eletrodo.

Para as neoplasias com área superior a 1 cm<sup>2</sup> foi utilizado um padrão para a aplicação dos pulsos elétricos. O eletrodo foi movido de modo sistemático – depois de acionado e de emitidos os pulsos elétricos numa determinada área, o eletrodo foi sendo disposto de modo adjacente às áreas previamente tratadas, repetidamente, até ter sido abrangida a neoplasia na sua total extensão.

O posterior internamento em hospital visou a monitorização de possíveis efeitos adversos, a estabilização do quadro inflamatório, o manejo da dor e a colmatação de necessidades nutricionais. Uma vez hospitalizados, os pacientes iniciaram o tratamento com fluidoterapia endovenosa com Cloreto de Sódio 0,9% ou Lactato de Ringer, ranitidina (2 mg/kg) por via subcutânea e meloxicam (0,05 mg/kg) por via oral ou subcutânea, a cada 24 horas.



**Figura 12 - Administração de pulsos elétricos permeabilizadores em gatos com CCE do plano nasal (pacientes 1, 3, 6 e 13, na devida ordem).**

Em quatro gatos (pacientes 6, 11, 12 e 13) foi colocado um tubo de alimentação enteral (tubo de esofagostomia) no final no tratamento com EQT (figura 13).



**Figura 13 - Gato com tubo de esofagostomia colocado após EQT (paciente 12).**

As consultas de seguimento decorreram, quando possível, na primeira, segunda e quarta semanas após EQT. Em cada consulta foi realizado o exame físico e as lesões foram documentadas fotograficamente. A avaliação foi feita através da observação clínica da área de superfície tratada e da medição do tamanho dos nódulos. O tempo de observação foi determinado como o período entre o primeiro tratamento com EQT e a última observação do paciente.

## 2.5. Classificação da Resposta

A resposta ao tratamento foi classificada na quarta semana após a sua conclusão. A classificação da resposta ao tratamento foi feita com base nos Critérios de Avaliação de Resposta em Neoplasias Sólidas – RECIST, do inglês *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*, versão 1.1, 2009 –, sumarizados na tabela 4. Segundo estes, as respostas foram categorizadas em: remissão completa (RC), definida pelo desaparecimento total da(s) lesão(ões), e na qual qualquer linfonodo patológico deve apresentar uma redução do eixo curto para < 10 mm; remissão parcial (RP), determinada por uma redução de, pelo menos, 30% da soma dos diâmetros das lesões; doença progressiva (DP), determinada por um aumento de, pelo menos, 20% da soma dos diâmetros das lesões – assumindo como referência a menor soma dos diâmetros durante o estudo – e por um aumento absoluto de, pelo menos, 5 mm (o surgimento de uma ou mais novas lesões é também considerado progressão); e doença estável (DE), quando nem a diminuição é suficiente para a qualificação de RP, nem o aumento é suficiente para a qualificação de DP. A duração da resposta é quantificada desde o momento da acessão da classificação da resposta, onde são atendidos os critérios de RC ou RP pela primeira vez, até à data em que é objetivamente documentada a recidiva ou progressão da doença. A resposta objetiva (RO) foi determinada pela combinação de RC e RP (Eisenhauer et al. 2009).

**Tabela 4 - Classificação da resposta ao tratamento com base nos Critérios de Avaliação de Resposta em Neoplasias Sólidas (RECIST) (adaptado de Eisenhauer et al. 2009).**

<b>Critérios de classificação de resposta</b>	
<b>RC</b>	Desaparecimento total da(s) lesão(ões)
<b>RP</b>	Redução $\geq 30\%$ da soma dos diâmetros das lesões
<b>DP</b>	Aumento $\geq 20\%$ da soma dos diâmetros das lesões ou aumento absoluto $\geq 5$ mm
<b>DE</b>	Diminuição insuficiente para RP ou aumento insuficiente para DP

Nota. RC, remissão completa; RP, remissão parcial; DP, doença progressiva; DE, doença estável.

No seguimento, os possíveis efeitos colaterais locais e sistêmicos foram avaliados e determinados de acordo com a escala de toxicidade estabelecida por um grupo de veterinários oncologistas, *Veterinary Cooperative Oncology Group*, no documento *Common Terminology Criteria for Adverse Events Following Chemotherapy or Biological Antineoplastic Therapy in Dogs and Cats* (VCOG-CTCAE, versão 1.1, 2011) (tabelas 5 e 6). Foram considerados todos os efeitos adversos registados nas fichas clínicas dos animais. Para além da interpretação dos dados clínicos, foi também tido em consideração o *feedback* dos tutores.

**Tabela 5 - Classificação, em graus, da intensidade dos efeitos adversos de acordo com o Veterinary Cooperative Oncology Group (adaptado de VCOG-CTCAE 2011).**

<b>Classificação da intensidade dos efeitos adversos</b>	
<b>Grau 1</b>	Ligeiro. Assintomático ou sintomas ligeiros; apenas sinais clínicos ou observações de diagnóstico; sem indicação para intervenção.
<b>Grau 2</b>	Moderado. Indicação para intervenção mínima, não invasiva ou em ambulatório; limitação moderada das atividades diárias <sup>a</sup> .
<b>Grau 3</b>	Grave ou clinicamente significativo, mas sem risco de vida imediato. Indicação para hospitalização ou prolongamento da hospitalização; incapacitante; limitação significativa das atividades diárias.
<b>Grau 4</b>	Consequências que representam risco de vida. Indicação para intervenções urgentes.
<b>Grau 5</b>	Morte relacionada com os efeitos adversos.

*Nota.* <sup>a</sup> As atividades diárias traduzem-se na alimentação, descanso, defecação e micção.

**Tabela 6 - Classificação, em graus, da intensidade dos efeitos adversos mais comuns no grupo de estudo de acordo com as categorias individuais estabelecidas pelo Veterinary Cooperative Oncology Group (adaptado de VCOG-CTCAE 2011).**

<b>Efeito Adverso</b>	<b>Grau</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Letargia/ fadiga/ desempenho geral</b>	Letargia ligeira acima dos parâmetros de referência; atividade diminuída, mas com	Letargia moderada que causa alguma dificuldade na concretização das atividades diárias <sup>a</sup> ambulatório apenas para	Comprometido, atividades diárias severamente limitadas; incapacidade de restringir a defecação e micção a áreas	Incapacitado; a alimentação deve ser forçada e as atividades diárias socorridas.	Morte

	capacidade funcional aceitável.	comer, dormir, defecar e urinar consistentemente em áreas aceitáveis.	aceitáveis; consome alimento se oferecido no local.		
<b>Anorexia</b>	Necessária persuasão ou alteração da dieta para manter o apetite.	Ingestão oral alterada ( $\leq 3$ dias) sem perda significativa de peso; podem ser indicados suplementos nutricionais/estimulantes do apetite.	Duração $> 3$ dias associada a perda de peso significativa ( $\geq 10\%$ ) ou subnutrição; indicação para fluidoterapia IV, alimentação forçada ou por tubo.	Consequências que representam risco de vida; indicação para NPT; duração $> 5$ dias.	Morte
<b>Dor</b>	Dor ligeira que não interfere com a função; controlável com AINE.	Dor moderada; controlável com analgésicos padrão (AINE, opióides) por via oral; dor ou analgésicos interferem com a função, mas não com as atividades diárias.	Dor intensa; controlável com analgesia sistêmica; dor ou analgésicos interferem com as atividades diárias.	Dor incontrolável ou incapacitante	–

Nota. <sup>a</sup> As atividades diárias traduzem-se na alimentação, descanso, defecação e micção.

### 3. Resultados

Os tratamentos foram realizados em relativamente pouco tempo, sem intercorrências. Cada sessão de EQT durou entre 30 a 50 minutos, sendo que destes, apenas 10 a 20 minutos foram reservados para a administração da bleomicina e aplicação dos pulsos elétricos permeabilizadores. Cada sequência de oito pulsos é muito breve e, assim sendo, toda a área de superfície das neoplasias foi percorrida pelo eletrodo em poucos minutos. O número de séries de oito pulsos elétricos ministradas em cada sessão variou entre 2 a 10 (tabela 8).

A hospitalização após o tratamento com EQT foi também de relativa curta duração. A maior parte dos pacientes permaneceram hospitalizados 48 horas após o tratamento, tendo havido quatro pacientes que, após uma das suas sessões, ficaram hospitalizados por apenas 24 horas (pacientes 4, 5, 8 e 13). No entanto, quatro gatos necessitaram de uma

hospitalização prolongada de uma (pacientes 12, 13 e 15) e duas semanas (paciente 6) em pelo menos uma sessão de EQT.

A EQT foi, de um modo geral, bem tolerada. Os efeitos adversos relacionados com a EQT verificados ao longo do tempo de observação foram limitados a inflamação e dor localizadas, prostração e anorexia. No que diz respeito à gravidade, os efeitos adversos variaram entre o grau 1 e grau 3, de acordo com o VCOG-CTCAE. A maioria dos efeitos adversos observados no grupo de estudo foram ligeiros, classificados em grau 1 (tabelas 5 e 6).

O controlo da inflamação e dor foi em grande parte alcançado com o fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE) meloxicam. Após o breve período de hospitalização, os pacientes tiveram alta com medicação oral de famotidina (1 mg/kg) e meloxicam (0,025-0,5 mg/kg), administrada de 24 em 24 horas, até perfazer 7 a 15 dias ou até reavaliação. Em alguns casos, a inflamação de tecidos subcutâneos mais profundos ocasionou prurido de forma a ter sido necessário recorrer ao uso de colares isabelinos durante a recuperação, precavendo o traumatismo autoinfligido.

Quando necessário um reforço adicional de analgesia, foi utilizado gel de lidocaína tópico, buprenorfina (0.02 mg/kg) por administração transmucosal na cavidade sublingual, de 12 em 12 horas, ou metadona (0,2 mg/kg) por via intramuscular, de 8 em 8 horas, até reavaliação.

A antibioterapia foi levada a efeito em nove dos animais, com amoxicilina e ácido clavulânico (12,5 mg de substância ativa combinada/kg) por via oral, de 12 em 12 horas, ou subcutânea, de 24 em 24 horas, ou com enrofloxacina (5 mg/kg) por via oral ou subcutânea, de 24 em 24 horas, entre 5 a 10 dias.

Em um dos gatos com CCE cutâneo da pálpebra (paciente 8), a antibioterapia ocular foi feita mediante administração tópica sob a forma de colírios contendo tobramicina e cloranfenicol. No mesmo, a diminuição da produção de lágrima foi tratada com um gel oftálmico lubrificante.

Em nove de quinze animais foi observada anorexia, três com classificação de grau 1, dois de grau 2 e quatro de grau 3 (tabela 6). A anorexia foi particularmente marcada na primeira semana após o tratamento. Quatro pacientes foram tratados para a estimulação do apetite com mirtazapina (um quarto de um comprimido de 15 mg por animal) por via oral, de 72 em 72 horas.

Todos os gatos submetidos à EQT manifestaram contrações musculares transitórias na área subjacente ao elétrodo aquando da aplicação dos pulsos elétricos, desaparecendo imediatamente após serem ministrados.

1 Tabela 7 - Resumo das características dos quinze gatos com CCE incluídos no estudo.

Paciente	Idade (anos), sexo	N.º de Lesões	Localização Anatômica	Tamanho (cm)	Diagnóstico	Estádio (OMS)	Tratamentos Anteriores
1.	13, F	1	Plano nasal	1,8	Citopatologia	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	–
2.	8, F	1	Plano nasal	1,6	Citopatologia	–	–
3.	8, F	1	Plano nasal	0,6	Citopatologia	–	–
4.	14, M	1	Plano nasal	3	Citopatologia	–	–
5.	10, M	1	Mandíbula	ND	Histopatologia	–	–
6.	5, M	1	Plano nasal e lábio	4,5	Histopatologia (subtipo histológico basalóide)	–	–
7.	10, M	1	Plano nasal	2	Citopatologia	–	–
8.	4, F	1	Pálpebra	1,1	Citopatologia	–	–
9.	5, M	1	Plano nasal	2	Citopatologia	–	Criocirurgia(2x)
10.	17, M	3	Pálpebra	0,7 × 0,7	Histopatologia	–	–
			Têmpora	2 × 2		–	
			Fronte	2 × 2,5		–	
11.	9, F	1	Plano nasal	ND	Histopatologia	–	–
12.	8, M	1	Plano nasal	2,4	Citopatologia	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	–
13.	8, M	1	Plano nasal	2,3	Histopatologia	–	–
14.	11, M	1	Plano nasal	1,2	Citopatologia	–	TFD
15.	15, M	1	Maxila	1,2	Histopatologia	–	–

2 Nota. F, fêmea; M, macho; ND, não disponível.

1 Tabela 8 - Esquematização do tratamento dos animais incluídos no estudo, com especificações do agente e dos parâmetros físicos da EQT.

	Localização anatômica	1ª Sessão	Fármaco	N.º séries de pulsos elétricos <sup>a</sup>	2ª Sessão	Fármaco	N.º séries de pulsos elétricos <sup>a</sup>	3ª Sessão	Fármaco	N.º séries de pulsos elétrico <sup>a</sup>
1.	Plano nasal	08/04/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	7	–	–	–	–	–	–
2.	Plano nasal	02/05/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	5	–	–	–	–	–	–
3.	Plano nasal	ND	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	ND	–	–	–	–	–	–
4.	Plano nasal	28/04/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	10	10/06/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	4	–	–	–
5.	Mandíbula	10/12/2015	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	ND	–	–	–	–	–	–
6.	Plano nasal e lábio	14/04/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	6	07/06/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	7	–	–	–
7.	Plano nasal	02/05/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	8	01/11/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	ND	–	–	–
8.	Pálpebra	19/04/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	2	26/05/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	2	–	–	–
9.	Plano nasal	20/05/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	4	–	–	–	–	–	–
10.	Pálpebra	02/02/2016		2	04/04/2016		3	–	–	–

	Têmpora		Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	4		Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	5			
	Fronte		4	2						
11.	Plano nasal	7/11/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	ND	–	–	–	–	–	–
12.	Plano nasal	10/05/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	6	22/11/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	4	–	–	–
13.	Plano nasal	11/02/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	6	12/09/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	ND	–	–	–
14.	Plano nasal	02/05/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	4	–	–	–	–	–	–
15.	Maxila	03/03/2016	Bleomicina IL 3 mg/cm <sup>3</sup>	3	01/04/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	2	28/06/2016	Bleomicina IV 30 mg/m <sup>2</sup>	3

Nota. IV, via intravenosa; IL, via intralesional; ND, não disponível.

<sup>a</sup>Cada série de pulsos elétricos é constituída por uma sequência de 8 pulsos de forma de onda quadrada, 1300 V/cm.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

O tratamento dos quinze animais incluídos no estudo compreendeu um número variável de sessões de EQT. Sete animais foram tratados com apenas uma sessão, outros sete com duas sessões e somente um animal foi submetido a três sessões de EQT. O intervalo de tempo entre as sessões variou entre um mês e sete meses (tabela 8).

No decorrer das consultas de seguimento foi observada a formação de crostas superficiais (figura 14). As crostas desagregaram-se da lesão entre a primeira e a quinta semana após as sessões de EQT, de modo espontâneo ou como resultado da limpeza das lesões. Em alguns dos pacientes não se verificou a formação de crosta.

Foi também observada necrose parcial do tecido neoplásico em três dos quinze animais (pacientes 5, 6 e 15). Dois dos pacientes (pacientes 6 e 15) contraíram infecção local no tempo posterior ao tratamento.



**Figura 14 - Macho de 14 anos com formação de crosta sobre a lesão do plano nasal uma semana após a primeira sessão de EQT (paciente 4).**

A resposta ao tratamento foi avaliada na quarta semana após o tratamento. Nessa altura, os animais em RP demonstraram uma redução das dimensões da neoplasia, por vezes significativa, e os animais em RC evidenciaram erradicação completa. O paciente 1 morreu antes do assentimento da classificação da resposta ao tratamento por causas não relacionadas com a doença oncológica. Dos restantes catorze gatos, oito alcançaram RC, quatro RP e dois sofreram progressão da doença. Na tabela 9 estão descritas, de modo resumido, as respostas dos gatos com CCE incluídos no estudo ao tratamento com EQT.

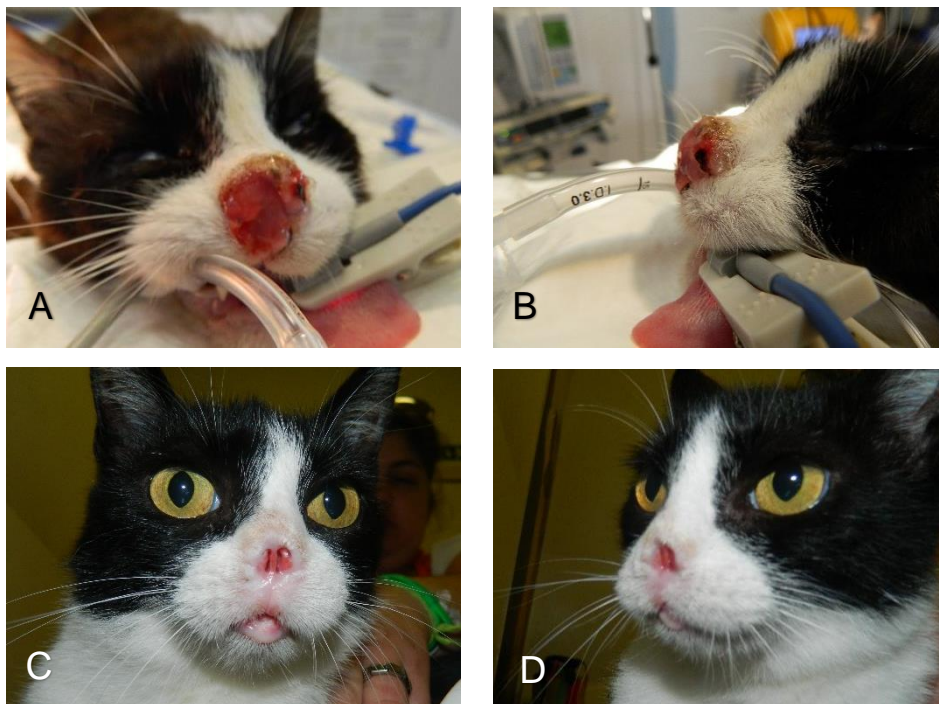
**Tabela 9 - Resumo das respostas ao tratamento com EQT nos quinze gatos com CCE.**

<b>Paciente</b>	<b>Idade (anos), sexo</b>	<b>Localização anatômica</b>	<b>Tamanho (cm)</b>	<b>N.º de sessões</b>	<b>Resposta às 4 semanas</b>
1.	13, F	Plano nasal	1,8	1	Morte por causas não relacionadas
2.	8, F	Plano nasal	1,6	1	RC
3.	8, F	Plano nasal	0,6	1	RC
4.	14, M	Plano nasal	3	2	DP
5.	10, M	Mandíbula	–	1	RP
6.	5, M	Plano nasal e lábio	4,5	2	DP
7.	10, M	Plano nasal	2	2	RC
8.	4, F	Pálpebra	1,1	2	RC
9.	5, M	Plano nasal	2	1	RC
10.	17, M	Pálpebra	0,7 x 0,7	2	RP
		Têmpora	2 x 2		
		Fronte	2 x 2,5		
11.	9, F	Plano nasal	–	1	RC
12.	8, M	Plano nasal	2,4	2	RC
13.	9, M	Plano nasal	2,3	2	RP
14.	11, M	Plano nasal	1,2	1	RC
15.	15, M	Maxila	1,2	3	RP

*Nota.* F, fêmea; M, macho; RC, remissão completa; RP, remissão parcial; DP, doença progressiva;

Dois dos pacientes com CCE cutâneos do plano nasal classificados com RC sofreram recidiva às vinte semanas após uma sessão de EQT. A este ponto no tempo, os pacientes 7 e 12 apresentavam uma nova lesão perinasal, com relevo e sem ulceração cutânea no primeiro e com ulceração no último. No paciente 7, a nova lesão encontrava-se afastada da lesão inicial do plano nasal, sem aparente continuidade com a área tratada anteriormente. Os dois animais foram eficazmente tratados com uma sessão adicional de EQT.

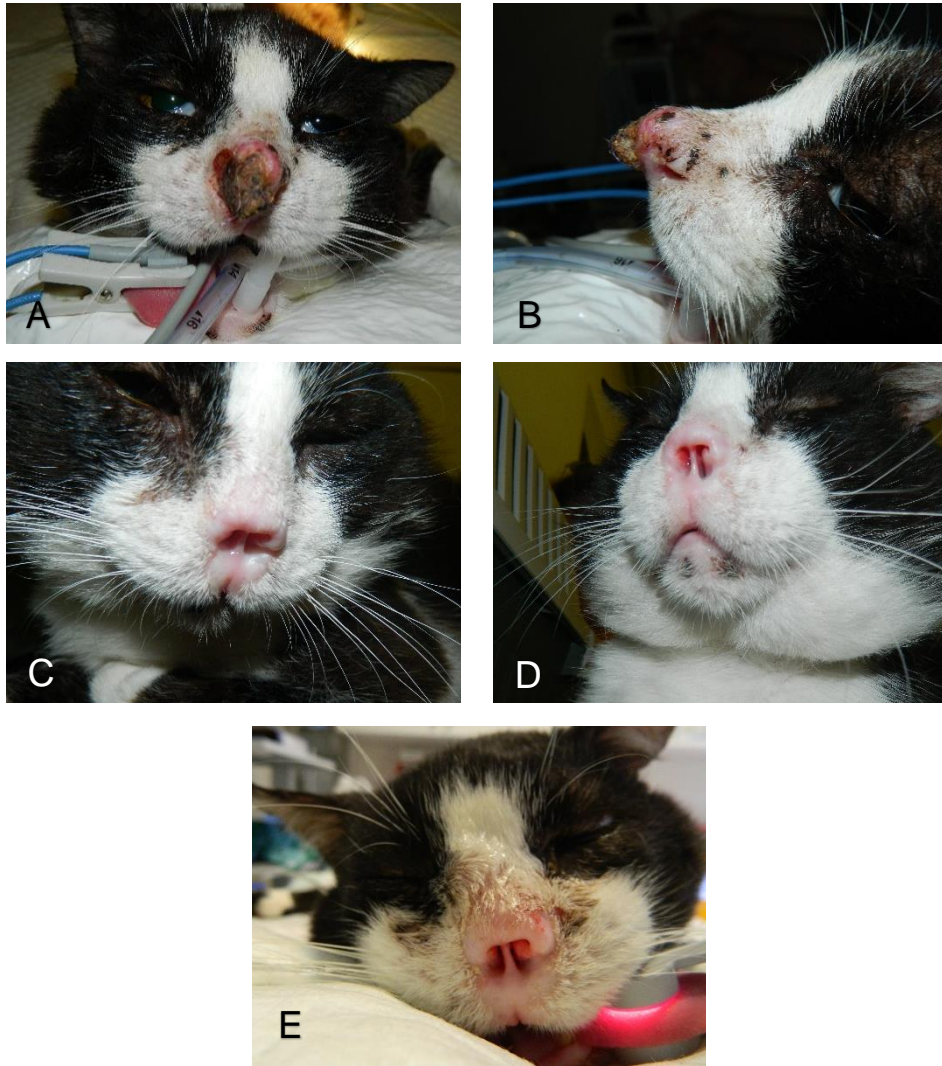
O paciente com CCE cutâneo na pálpebra que alcançou RC mediante duas sessões de EQT sofreu recidiva catorze semanas após o tratamento.



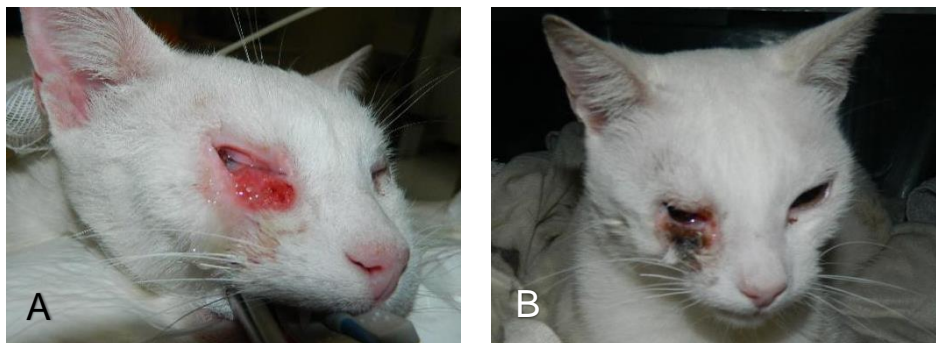
**Figura 15 - Fêmea de 8 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira e única sessão de EQT (A e B) e às treze semanas após conclusão do tratamento (C e D) (paciente 2).**

Um dos pacientes com CCE cutâneo do plano nasal alcançou RP de 80-90% no momento de avaliação após a primeira sessão de EQT. A segunda sessão de EQT foi realizada vinte e seis semanas depois da primeira, quando o animal se apresentou à consulta com o aumento das dimensões da neoplasia. A resposta ao tratamento no momento subsequente foi classificada de RP.

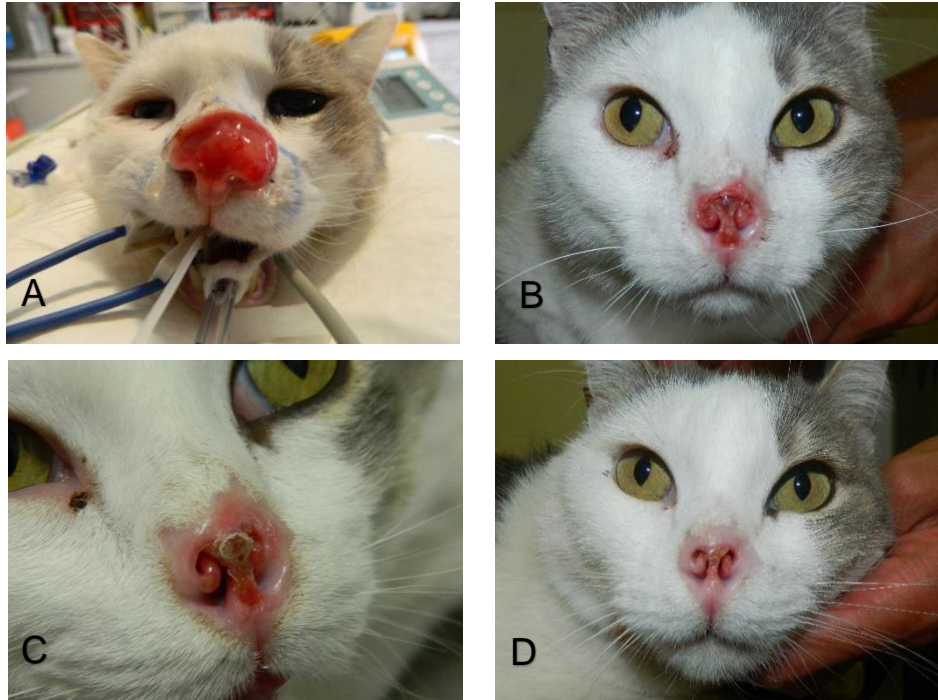
O paciente com CCE oral da mandíbula obteve RP de 30% após uma sessão de EQT. O animal deixou de ser um possível candidato para uma segunda sessão de EQT por evidenciar osteomielite da mandíbula quatro semanas após a avaliação da resposta.



**Figura 16 - Macho de 10 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira sessão de EQT (A e B), às treze semanas depois da primeira sessão (C e D) e antes da segunda e última sessão (E) (paciente 7).**



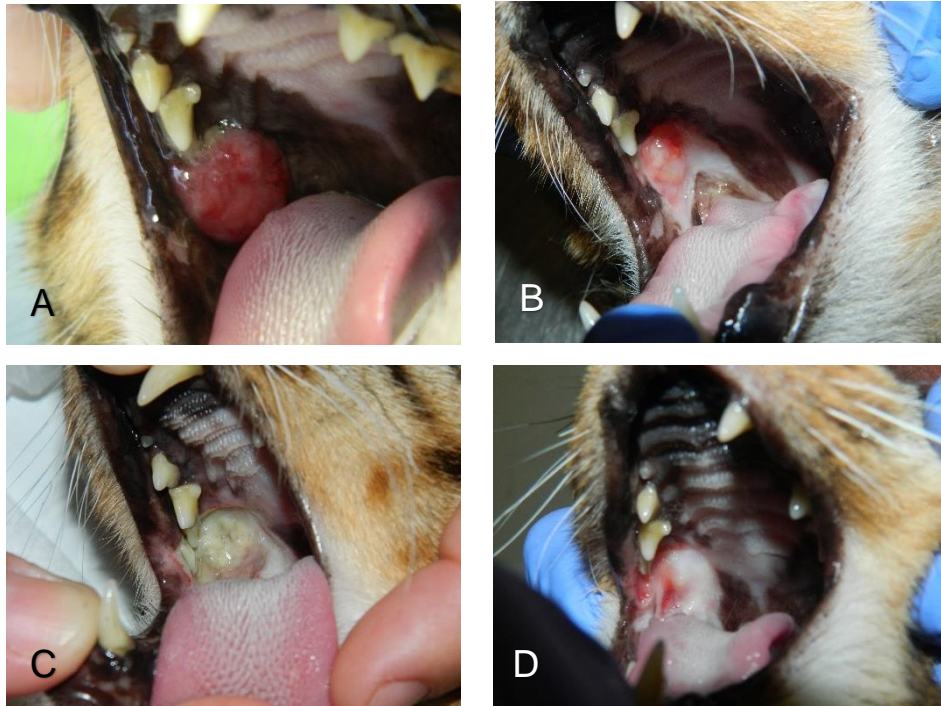
**Figura 17 - Fêmea de 4 anos com CCE cutâneo da pálpebra antes da segunda e última sessão de EQT (A) e uma semana após conclusão do tratamento (B) (paciente 8).**



**Figura 18 - Macho de oito anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira sessão de EQT (A) e às duas (B), quatro (C) e doze semanas (D) posteriores (paciente 12).**

O paciente com CCE oral da maxila alcançou RP de 50% após duas sessões de EQT realizadas com quatro semanas de intervalo. O animal sofreu recidiva na região do molar superior direito dez semanas depois da segunda sessão e foi tratado num momento posterior com uma terceira sessão de EQT. À avaliação após a última sessão, o animal encontrava-se em RP de aparentemente 90%. Seis semanas depois da terceira sessão foi detetada metastização em linfonodo e o paciente foi submetido à excisão dos linfonodos submaxilares. O animal sofreu progressão da doença às quinze semanas após o último tratamento.

Os dois animais que sofreram progressão da doença apresentavam CCE cutâneos do plano nasal. Estes foram tratados com duas sessões de EQT separadas por um intervalo de seis e sete semanas. No momento de avaliação subsequente, ambos os pacientes evidenciaram expansão dorsal das lesões nasais – DP. O paciente 4 chegou a alcançar RP após a primeira sessão, no entanto, este sofreu trauma diretamente sobre o plano nasal e saiu de remissão entre as sessões. No paciente 6, a EQT foi eleita com a finalidade de tratamento paliativo. Neste, a lesão evidenciou progressão na face esquerda às cinco semanas após a finalização do tratamento, com ligeira exposição do osso nasal e destruição do lábio superior e tecidos adjacentes. Nove semanas depois foi visível uma lesão intranasal pedunculada no lado esquerdo (1,8 cm de comprimento e base de 0,5 cm de diâmetro), sem ulceração e com ligeira necrose na extremidade.



**Figura 19 - Macho de 15 anos com CCE oral da maxila à apresentação (A), recidiva dez semanas após a segunda sessão de EQT (B), presença de tecido necrótico uma semana após a terceira e última sessão (C) e quatro semanas após a conclusão do tratamento (D) (paciente 15).**



**Figura 20 - Macho de 5 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira (A) e segunda sessão de EQT (B) e duas semanas após conclusão do tratamento (C) (paciente 6).**

A eutanásia foi contemplada em dois dos animais, pacientes 5 e 6, aquando do diagnóstico da osteomielite e às dezassete semanas após o tratamento devido à progressão da doença oncológica, respetivamente.

No decorrer do período de acompanhamento vários animais experienciaram uma distinta melhoria do estado geral. Em alguns dos pacientes foi observada a melhoria da respiração, a recuperação do olfato, a diminuição dos espirros e a restabelecimento do apetite, este último especialmente a partir da segunda semana após o tratamento.



**Figura 21 - Macho de 14 anos com CCE cutâneo do plano nasal antes da primeira (A e B) e segunda sessão de EQT (C e D) e às quatro semanas após conclusão do tratamento (E e F) (paciente 4).**

#### 4. Discussão

No presente estudo, a EQT associada a bleomicina para o tratamento de CCE em gatos permitiu alcançar uma taxa de resposta objetiva global de 86% (12/14). Dos catorze gatos, oito obtiveram RC (57%) e quatro RP (29%), ao passo que dois apresentaram progressão da doença (14%). A taxa de resposta objetiva é comparável às descritas previamente na literatura veterinária, cujos estudos de EQT com bleomicina em gatos com CCE apresentaram taxas de resposta objetiva entre 72% e 100%. Contudo, a taxa de RC obtida de 57% foi menor que as anteriormente relatadas, que se encontram entre os 65,6% e os 81,8% (Spugnini and Porrello 2003; Spugnini et al. 2009; Tozon et al. 2014; Spugnini et al. 2015; Dos Anjos et al. 2020; Simčič et al. 2021). No entanto, é de salientar que num estudo de EQT com duas diferentes doses de bleomicina em gatos com CCE cutâneos, apesar de ter sido registado no final do período de observação uma taxa de resposta completa de 72%, às quatro semanas após o tratamento foi observada uma taxa de resposta completa de 39,4% e uma taxa de resposta parcial de 56% (Dos Anjos et al. 2020).

A disparidade entre resultados deve-se sobretudo à diferença entre os grupos de estudo e os intervalos de tempo praticados entre sessões de EQT. Os cinco estudos de EQT associada a bleomicina para o tratamento de CCE em gatos até então realizados compreenderam grupos de estudo compostos somente por gatos com CCE cutâneos. Destes, dois descrevem predominantemente o tratamento de CCE do plano nasal e superficiais. Apenas num ensaio clínico em diferentes tipos histológicos em cães e gatos foi relatado um gato com CCE oral submetido a EQT. Além disso, a maioria dos estudos supracitados descrevem intervalos entre sessões de EQT mais curtos que os do presente estudo e, contrariamente a este, cumpridos de modo consistente (Spugnini and Porrello 2003; Spugnini et al. 2009; Tozon et al. 2014; Spugnini et al. 2015).

A determinação da duração da resposta foi possível em quatro pacientes, nos quais foram descritas durações de resposta de até onze semanas. Destes quatro pacientes, dois apresentavam CCE orais. Na literatura veterinária estão descritos longos intervalos livres de doença de até três anos e meio para os CCE cutâneos em gatos tratados com EQT (Spugnini and Porrello 2003; Spugnini et al. 2009; Tozon et al. 2014; Spugnini et al. 2015; Dos Anjos et al. 2020; Simčič et al. 2021). Por seu turno, o tratamento de CCE oral com EQT foi relatado uma única vez e neste foi descrita uma duração de resposta de dezassete semanas (Spugnini and Porrello 2003).

Quando comparados entre si, o atual estudo difere dos anteriores em alguns parâmetros do protocolo de EQT, nomeadamente na dose e via de administração do agente de quimioterapia, no número de sessões a que os animais foram submetidos e a sua

periodicidade. Em dois destes a bleomicina foi administrada por via intralesional na dose de 1-1,5 mg/cm<sup>3</sup>, inclusive no primeiro ensaio clínico de EQT em animais de companhia contendo CCE felinos. Nos quatro mais recentes, a bleomicina foi administrada por via intravenosa nas doses de 10 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup> e 30 mg/cm<sup>2</sup> de superfície corporal. O número de sessões de EQT por animal variou entre uma a oito e, quando realizada mais do que uma, o intervalo entre sessões foi continuamente de sete dias, à exceção de um estudo, no qual foram praticados intervalos de 30 dias entre sessões. Além disso, o tratamento foi realizado em regime de ambulatório nos estudos anteriores, enquanto que neste todos os animais permaneceram hospitalizados após o tratamento entre 24 horas a duas semanas.

No presente estudo foi intencionada a repetição do tratamento as vezes necessárias para a obtenção de RC ou até ser observada progressão da doença. As sessões de EQT foram intervaladas por um período mínimo de quatro semanas. Embora primeiramente idealizado um intervalo de quatro semanas entre tratamentos, o intervalo entre sessões variou entre quatro a vinte e oito semanas. O espaçamento entre sessões foi na maioria das vezes prolongado por determinação dos tutores ou em consequência da sua disponibilidade.

Os pacientes 4, 7, 12 e 13 receberam indicação para uma sessão de EQT adicional às quatro semanas no momento da primeira consulta de avaliação, visando o aumento da resposta ao tratamento ou a consolidação da remissão. Contudo, os pacientes 7 e 12 compareceram para a segunda sessão sensivelmente vinte semanas depois do assentimento da RC e com recidiva. Além destes, o paciente 13 foi submetido à segunda sessão vinte e quatro semanas depois de avaliado com RP de 80% a 90%. O paciente 4, por sua vez, foi submetido à segunda sessão de EQT seis semanas depois de observada RP.

O prolongamento do intervalo entre sessões além do período determinado impactou negativamente os resultados, traduzindo-se numa menor probabilidade de sucesso do tratamento. Todavia, intervalos tão breves como os documentados nos estudos anteriores (uma semana) foram inexecutáveis. Isso deveu-se sobretudo ao tempo de recuperação requerido antes de uma nova sessão, visto que muitos dos animais incluídos no estudo experienciaram um agravamento do estado geral posterior ao tratamento, em especial na primeira semana.

Além do protocolo, o atual grupo de estudo difere dos anteriores. Os três mais recentes estudos compreenderam apenas CCE cutâneos e os estádios encontravam-se entre Tis e T4. No primeiro, onde a taxa de RG foi de 100%, as duas únicas respostas classificadas de RP corresponderam às neoplasias em estádios mais avançados (T4). No estudo seguinte, as duas únicas DP foram observadas nos animais com neoplasias em estádios avançados T3 e T4 (Spugnini et al. 2009; Tozon et al. 2014; Spugnini et al. 2015).

Os CCE cutâneos da face em gatos são, de um modo geral, localmente invasivos. A resposta à terapêutica é bastante mais bem-sucedida em lesões que se encontram em estádios iniciais, como Tis e T1, do que em neoplasias com considerável invasão (Hauck 2013). Num estudo comparativo em CCE felinos cutâneos, no grupo em que foi utilizada a EQT com dose padrão de bleomicina foi observado um menor tempo de sobrevida global nos gatos em estádios mais avançados (T3 e T4) que nos em estádios iniciais (T1 e T2) (Dos Anjos et al. 2020). No presente estudo, os dois animais que demonstraram progressão da doença após o tratamento de EQT (pacientes 4 e 6) correspondem aos gatos com as duas lesões invasivas de maiores dimensões, com 3 cm e 4,5 cm de diâmetro.

Num ensaio clínico em cães e gatos onde a eficácia da EQT como tratamento de diferentes tipos histológicos foi estudada, a resposta à terapêutica demonstrou não ser dependente do tamanho das neoplasias (Spugnini and Porrello 2003). No entanto, uma mais recente meta-análise em Medicina Humana investigando a relação entre o tamanho da neoplasia e a eficácia de uma única sessão de EQT (9 estudos, 1466 neoplasias de qualquer tipo histológico) demonstrou um significativo decréscimo estatístico na eficácia do tratamento com o aumento progressivo do diâmetro da neoplasia. Os resultados desta indicaram que a EQT aplicada a neoplasias menores que 3 cm aumenta a probabilidade de CR em 31% e de RO em 24,9 %, em média, quando em comparação com neoplasias de maiores dimensões (Mali, Miklavčič, et al. 2013). Os dois mais recentes estudos de EQT associada a bleomicina como tratamento de gatos com CCE cutâneos vão ao encontro desta constatação. No primeiro, os gatos com neoplasias de menores dimensões, com menos de 0,33 cm<sup>3</sup>, experienciaram ILD maiores que os com neoplasias maiores (Dos Anjos et al. 2020). No último, a análise estatística identificou o tamanho da neoplasia como uma das variáveis que mais influenciaram o tempo de sobrevivência e a recidiva/progressão do tumor. Neste, as neoplasias menores que 1,7 cm apresentaram maior probabilidade de alcançar remissão completa (Simčič et al. 2021).

Para além disso, o paciente 6 foi diagnosticado por exame histopatológico com CCE basalóide, subtipo histológico distinto de CCE, pouco comum e caracterizado por um comportamento clínico agressivo. Os relatos de CCE da cabeça e pescoço em humanos associam o subtipo basalóide a um elevado potencial metastático e prognóstico reservado. Nestes, o CCE basalóide foi descrito nos tratos respiratório e digestivo mas não como neoplasia primária cutânea (Paulino et al. 2000; Boyd et al. 2010). Neste animal a EQT foi aplicada como modalidade paliativa. Apesar da extensão da neoplasia, a aparência clínica da lesão melhorou notavelmente após a primeira sessão de EQT e o animal manteve-se estável durante quatro meses após a conclusão do tratamento.

O único relato de EQT como tratamento de CCE oral, incluído num estudo de vários animais de companhia e neoplasias de diferentes tipos histológicos, resultou numa RP com duração de 120 dias (Spugnini and Porrello 2003).

O CCE oral em gatos está associado a um prognóstico reservado e o controlo local constitui o maior desafio (Liptak and Withrow 2013). Dois dos quatro animais que alcançaram RP apresentavam CCE orais (pacientes 5 e 15). O paciente com CCE oral da mandíbula obteve RP de 30% com apenas uma sessão de EQT e, apesar da impossibilidade de continuar o tratamento, o animal experienciou um considerável aumento da qualidade de vida no decorrer dos dois meses posteriores a este. Por sua vez, o paciente com CCE oral da maxila chegou a evidenciar RP de 90% depois de finalizada a terceira e última sessão de EQT, resposta que teve a duração de onze semanas. Não é conhecido tratamento de CCE oral que consistentemente resulte num controlo ou sobrevivência de longa duração (Liptak and Withrow 2013). Os gatos com CCE oral submetidos a cirurgia descreveram elevadas taxas de recidiva e a quimioterapia aparenta ser ineficaz (Liptak and Withrow 2013; Bilgic et al. 2015). A maioria dos protocolos de radioterapia de CCE orais em gatos relata uma taxa de resposta global de aproximadamente 50% e uma mediana do tempo de sobrevivência entre 2 a 4 meses (Evans et al. 1991; Bregazzi et al. 2001; Fidel et al. 2007; Fidel et al. 2011; McDonald et al. 2011; Sabhlok and Ayl 2014).

A EQT pode empregar diferentes tipos de elérodos. Os POP da EQT para o tratamento de neoplasias cutâneas e subcutâneas indicam a utilização de elérodos em placa e elérodos em agulha (Tozon, Tratar, et al. 2016; Gehl et al. 2018). De um modo geral, os elérodos em placa e os elérodos em agulha de linhas paralelas destinam-se ao tratamento de neoplasias superficiais e de pequenas dimensões, enquanto que os elérodos em agulha de configuração hexagonal são mais adequados para o tratamento de neoplasias mais profundas e de maiores dimensões (Mir et al. 2006; Tozon, Tratar, et al. 2016).

Quando em comparação com os protocolos anteriormente adotados, é também aparente uma falta de homogeneidade no que respeita aos elérodos utilizados. Todos os estudos de EQT em gatos com CCE até então realizados empregaram elérodos em placa adaptáveis, à exceção de um, no qual foi também utilizado, para além destes e de modo revezado, um elédrodo em agulhas. Por seu turno, no presente estudo foi utilizado um elédrodo de contacto, fixo e com hastes de configuração em "L".

O sucesso da EQT depende da distribuição do campo elétrico e, por conseguinte, da configuração do elédrodo (Eisa et al. 2013). As diferenças nas taxas de resposta relatadas podem dever-se às diferentes configurações de elédrodo utilizadas e à respetiva capacidade de tratar as áreas mais profundas da neoplasia (Gothelf et al. 2003).

Relativamente aos elérodos em placa, embora estes tenham proporcionado muito boas taxas de resposta em humanos e animais, não é ainda claro se os mesmos são eficazes

no tratamento das áreas mais profundas de neoplasias cutâneas e subcutâneas (Gilbert et al. 1997; Spugnini et al. 2016).

Por sua vez, a distribuição do campo elétrico associada aos elétrodos de contacto é limitada em profundidade. Os elétrodos de contacto proporcionam uma distribuição de campo elétrico muito localizada, sendo este particularmente intenso ao longo da superfície do tecido. Deste modo, este tipo de eletrodo é o mais indicado para o tratamento de amplas neoplasias cutâneas superficiais (Mazères et al. 2009). A EQT com elétrodos de contacto foi descrita apenas no tratamento de sarcoides equino na Medicina Veterinária (Rols et al. 2002; Tamzali et al. 2012).

A adoção de um diferente tipo de eletrodo, nomeadamente um que proporcione uma mais profunda distribuição do campo elétrico, pode representar uma solução para uma maior eficácia da EQT, em especial no tratamento de neoplasias em estádios mais avançados.

Ambos os elétrodos em placa e de contacto são elétrodos não invasivos. Os elétrodos em agulhas, por seu turno, são invasivos e são os mais adequados para o tratamento de neoplasias sediadas mais profundamente na pele – até 3 cm de profundidade (Miklavčič et al. 2006; Mir et al. 2006; Cadossi et al. 2014).

Gilbert *et al.* (1997) compararam a eficácia de cinco modelos de elétrodos em agulha com a do eletrodo em placa no tratamento com EQT de melanomas em murganhos. Neste estudo, três dos elétrodos em agulha apresentaram resultados superiores aos do eletrodo em placa. Destes, o eletrodo com arranjo de duas por duas agulhas proporcionou os melhores resultados, com um aumento de 50% no tempo de duplicação tumoral e nas taxas de resposta completa (Gilbert et al. 1997).

Em alguns casos, a utilização de mais de um tipo de eletrodo pode constituir uma boa solução para cobrir devidamente a neoplasia (Gehl et al. 2018). De forma a alcançar a configuração de eletrodo ideal para técnicas de tratamento oncológico, um estudo comparou a distribuição do campo elétrico incitada por elétrodos em placa utilizados de modo isolado com a resultante da combinação destes com elétrodos em agulha. Neste estudo, os resultados indicaram que tanto a intensidade como a homogeneidade do campo elétrico na área-alvo são melhores quando combinados os elétrodos em placa e os elétrodos em agulha. Assim, a combinação destes elétrodos pode constituir uma solução para alguns dos problemas na EQT dependentes da distribuição do campo elétrico (Eisa et al. 2013).

O aumento da citotoxicidade seletivamente direcionado para as células neoplásicas permite a utilização de doses baixas do agente antineoplásico na EQT e, deste modo, esta modalidade de tratamento está associada a uma baixa toxicidade.

O tratamento de EQT no presente estudo foi, de um modo geral, bem tolerado. Os efeitos adversos locais observados no grupo incluem inflamação, contrações musculares e dor; na sua maioria ligeiros. Estes foram em parte acompanhados por prostração e anorexia.

Na literatura, os efeitos colaterais locais e sistêmicos da EQT até então relatados foram mínimos e transeúntes. Destes, os efeitos adversos locais foram os mais comumente descritos, sobretudo inflamação, eritema ligeiro, edema, contrações musculares durante a EP e dor (Marty et al. 2006; Serša, Miklavčič, et al. 2008; Spugnini et al. 2012; Cadossi et al. 2014).

Ainda que os efeitos adversos vivenciados no presente estudo em consequência da EQT tenham sido maioritariamente ligeiros, alguns destes foram, por vezes, de maior intensidade que os relatados previamente, nomeadamente a anorexia de grau 3, de acordo com o VCOG-CTCAE (Spugnini, Renaud, et al. 2011). Dos quinze animais, quatro foram medicados com estimulantes do apetite e quatro requereram a colocação de um tubo de alimentação enteral. No entanto, todos os animais alimentados por tubo possuíam uma muito extensa ulceração do plano nasal e correspondiam aos CCE de maiores dimensões do grupo.

A necrose do tecido neoplásico verificada em três dos quinze animais foi, na realidade, uma consequência do tratamento bem-sucedido (Tozon et al. 2005; Spugnini, Baldi, Mellone, et al. 2007).

Para além da adoção de diferentes tipos de elétrodos, podem ser considerados outros ajustes de protocolos de EQT, designadamente ao nível das doses de agente antineoplásico administradas. No âmbito da Medicina Humana, um estudo de EQT como tratamento de cancro de pele não melanoma na cabeça e pescoço (carcinomas basocelulares e CCE) comparou a eficácia do tratamento quando aplicadas diferentes doses de bleomicina. Num grupo foi utilizada a dose padrão de bleomicina, de 15 mg/m<sup>2</sup>, e noutro uma dose reduzida, de 10 mg/m<sup>2</sup>. Ambos os grupos obtiveram resultados comparáveis, com taxas de remissão completa de 96% e 100% respetivamente, e o grupo sujeito à dose reduzida de bleomicina demonstrou uma menor frequência de efeitos colaterais e uma mais rápida recuperação (Groselj et al. 2018). Mais tarde, Dos Anjos et al. (2020) compararam dois protocolos de EQT em gatos com CCE cutâneos. Dos 56 gatos incluídos no estudo, 22 foram tratados com a dose padrão de bleomicina e 34 com uma dose reduzida, de 10 mg/m<sup>2</sup>. A eficácia da EQT foi semelhante nos dois grupos, e ambas as doses de bleomicina associadas à EQT resultaram em semelhantes taxas de resposta global, de sobrevivência e ILD. Com base nestas publicações, no mais recente estudo multicêntrico de EQT como tratamento de CCE felinos do plano nasal um investigador praticou o protocolo com a dose reduzida de 10 mg/m<sup>2</sup> em um dos seis centros veterinários incluídos no estudo (Simčič et al. 2021).

Além da eficácia no controlo local e a baixa toxicidade, a EQT apresenta outras vantagens como a possibilidade de repetição, a preservação da eficácia em neoplasias emergentes em áreas pré-tratadas, a simplicidade de execução e um baixo custo (Serša 2006; Spugnini et al. 2016). Tem sido relatada uma melhor relação custo/eficácia da EQT no

tratamento de neoplasias cutâneas e subcutâneas quando comparada com outras abordagens terapêuticas (radioterapia, quimioterapia, hipertermia associada à radioterapia, entre outros) (Miklavčič et al. 2014; Esmaeili and Friebe 2019).

Os pacientes podem ser repetidamente tratados com EQT em caso de insucesso, resposta parcial ou recidiva; sem que sejam instigados efeitos colaterais nos tecidos irradiados ou que se desenvolva resistência aos fármacos quimioterápicos (Mir et al. 2006; Tozon, Tratar, et al. 2016; Gehl et al. 2018; Spugnini and Baldi 2019). Além disso, a maioria dos nódulos recidivantes em áreas previamente submetidas a radioterapia ou ressecção foram eficazmente tratados com EQT (Mir et al. 1998; Serša 2006).

Outro ponto a considerar é o custo biológico. A cirurgia é muitas vezes limitada por considerações anatômicas e funcionais, e os pacientes sujeitos a cirurgia ou radioterapia podem sofrer sequelas que variam desde dor e infecção a desfiguramento e perda transitória de função estomatognática (Spugnini et al. 2009; Spugnini et al. 2016). O resultado cosmético decorrente do tratamento cirúrgico de CCE cutâneos é normalmente aceitável (Ayres and Liptak 2012), todavia, a ampla excisão cirúrgica de CCE cutâneos maiores e mais invasivos é por vezes limitada em consequência do desfiguramento estético resultante (Thomson 2007; Murphy 2013). A excisão completa dos CCE das pálpebras muitas vezes representa a pálpebra na íntegra e constitui um problema para a preservação da sua funcionalidade (Murphy 2013). Nos CCE orais, por sua vez, para além dos vários outros desafios que o tratamento cirúrgico encara, as pequenas dimensões craniofaciais dos gatos geralmente dificultam a consecução de margens adequadas. Os gatos não tendem a tolerar cirurgias orais agressivas sem morbidade significativa (Turek and Pellin 2016).

Até à data, os resultados clínicos de EQT evidenciam bons resultados cosméticos, com preservação da arquitetura facial dentro dos padrões individuais de normalidade (Marty et al. 2006; Spugnini et al. 2009; Escoffre and Rols 2012; Serša and Čemažar 2016). Inclusivamente os gatos do presente estudo evidenciaram resultados cosméticos muito bons.

A EQT é um procedimento breve e de simples execução. Segundo os POP de EQT, um dia de formação num centro experiente é suficiente para o Médico Veterinário estabelecer confiança para a sua prática (Marty et al. 2006).

A EQT pode ser utilizada alternativamente aos outros tratamentos oncológicos convencionais correntemente adotados. Pode ser uma modalidade de tratamento alternativa à cirurgia, quando inexequível, e pode ser adotada para o tratamento de lesões resistentes à radioterapia ou quimioterapia (Esmaeili and Friebe 2019; Spugnini and Baldi 2019).

Apesar de ser um tratamento bem tolerado e com efeitos colaterais limitados, numa investigação clínica de EQT com bleomicina em animais de companhia foram constatadas duas toxicidades nunca antes relatadas: tromboembolismo pulmonar e vasculite secundária a fármacos (Spugnini and Porrello 2003).

Ademais, a aplicação da EQT em pacientes com anterior radioterapia malsucedida pode estar associada a consistentes efeitos colaterais. O único caso relatado na literatura descreve uma *radiation recall* – reação dérmica à radiação – acentuada num gato tratado com cisplatina (Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, et al. 2008; Spugnini et al. 2012). Entretanto, os POP da EQT para o tratamento de neoplasias em cães e gatos apenas indicam o uso de bleomicina para a aplicação de EQT em gatos e a cisplatina é contraindicada nesta espécie (Tozon, Tratar, et al. 2016).

A fim de evitar complicações indesejáveis, deverá ser feita uma seleção cuidadosa dos pacientes adequados ao tratamento. Os pacientes com neoplasias volumosas podem estar sujeitos a intoxicação secundária a uma grande destruição de tecido neoplásico (e. g. tromboembolismo, síndrome de lise tumoral, coagulação intravascular disseminada) ou à cicatrização tardia de feridas, queloides e necrose local (Spugnini and Baldi 2019).

Um fator limitativo da EQT em pacientes humanos é a dor durante a aplicação dos impulsos elétricos, porém, em animais esta pode ser evitada com sedação e com a elevação do nódulo a ser tratado durante a aplicação dos pulsos elétricos (Serša et al. 2003; Tozon et al. 2014).

Campana et al. (2016) realizaram uma análise qualitativa de 33 estudos de EQT levada a efeito em humanos, com um total de 1215 pacientes, no período de 2006 a 2015. Embora tenham sido publicados até então uma grande quantidade de estudos deste tratamento oncológico em ascensão, muitas vezes estes estão desprovidos de relatos precisos e detalhados. Com base nas questões críticas emergentes desta análise, os autores elaboraram recomendações para o relato de dados de ensaios clínicos de EQT que abrangem as áreas do delineamento experimental, caracterização da população em estudo, descrição do tratamento e dos resultados, de modo a melhorar a qualidade da prática clínica e futura investigação. Ressalta-se a importância da utilização consistente dos POP, tendo em vista a padronização do agente antineoplásico, parâmetros elétricos, eletrodos, classificação dos efeitos adversos e da resposta (Campana et al. 2016).

Neste estudo unicêntrico são observadas algumas limitações como a sua natureza retrospectiva, a amostra não randomizada e a inexistência de comparação com um grupo sujeito a diferentes tratamentos padrão de CCE. Também a impossibilidade de rastrear os pacientes a longo prazo constituiu uma importante limitação do presente estudo. Com a perda de seguimento dos animais, o estudo enfocou-se nos resultados e respostas iniciais. Além disso, e na sequência das recomendações para melhorar a qualidade dos ensaios clínicos de EQT, o estudo beneficiaria de uma observação e registro mais detalhados de todos os tipos e graus de toxicidades.

A EQT está a tornar-se num tratamento de primeira linha para várias neoplasias de diferentes tipos histológicos nos animais de companhia. Até à data, as neoplasias

predominantemente tratadas em Medicina Veterinária incluem: mastocitoma e tumores perianais caninos, CCE felino e sarcoides equino (Tozon, Tamzali, et al. 2016; Spugnini and Baldi 2019). Atualmente, a EQT tem vindo a ampliar o seu campo de aplicação com o tratamento de neoplasias viscerais e intracavitárias, assistidas por ultrassonografia (Spugnini and Baldi 2019).

## **5. Conclusão**

A EQT, atualmente utilizada em Medicina Humana para o tratamento de neoplasias cutâneas primárias e, principalmente, de metástases cutâneas e subcutâneas de vários tipos histológicos, demonstrou ser um tratamento promissor de CCE em gatos. Os resultados do presente estudo sugerem que a EQT com bleomicina é um tratamento eficaz e seguro de CCE felinos, especialmente de CCE cutâneos e em estádios iniciais. Na população em estudo, as lesões de menores dimensões obtiveram melhor resposta ao tratamento, nomeadamente as de diâmetro inferior a 3 cm.

Os POP da EQT podem ser ajustados de modo a combater as respostas menos favoráveis relatadas nas lesões de maiores dimensões. O ajuste para esse efeito passa idealmente pela seleção do tipo e conformação de eléctrodo, e pela acomodação dos parâmetros físicos da EQT de acordo com as necessidades individuais.

De um modo geral, a EQT foi associada a um bom controlo local, baixa toxicidade e bons resultados cosméticos. A EQT com bleomicina pode ser considerada um tratamento alternativo de CCE felinos, levada a efeito quando outras abordagens terapêuticas não são exequíveis, aquando inacessibilidade, falta de consentimento ou restrições financeiras por parte dos tutores.

É, no entanto, necessária pesquisa clínica adicional para melhor compreender e confirmar o potencial da combinação de pulsos eléctricos permeabilizadores com agentes de quimioterapia, preferencialmente ensaios clínicos prospetivos, comparativos e multicêntricos.

## BIBLIOGRAFIA

- Abidor IG, Arakelyan VB, Chernomordik L V, Chizmadzhev YA, Pastushenko VF, Tarasevich MR. 1979. Electric Breakdown of Bilayer Lipid Membranes: The Main Experimental Facts and Their Qualitative Discussion. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 6:37–52.
- Almasi S, Hiani Y El. 2020. Exploring the Therapeutic Potential of Membrane Transport Proteins: Focus on Cancer. *Cancers (Basel).* 12(6):1624.
- Dos Anjos DS, Sierra OR, Spugnini EP, Nardi AB De, Fonseca-Alves CE. 2020. Comparison of two different doses of bleomycin in electrochemotherapy protocols for feline cutaneous squamous cell carcinoma nonsegregated from ultraviolet light exposure. *Sci Rep.* 10:1–9.
- Argyle D. 2013. Molecular/Targeted Gene Therapy for Cancer. In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.* p. 215–244.
- Ayres SA, Liptak JM. 2012. Head and Neck Tumors. In: *Kudnig S, Seguin B, editors. Veterinary surgical oncology.* 1st ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell. p. 87–94.
- Belehradek M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Behraderk J, Poddevin B, Mir LM. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: First clinical Phase I-II trial. *Cancer.* 72(12):3694–3700.
- Bexfield NH, Stell AJ, Gear RN, Dobson JM. 2008. Photodynamic Therapy of Superficial Nasal Planum Squamous Cell Carcinomas in Cats: 55 Cases. *J Vet Intern Med.* 22:1385–1389.
- Bilgic O, Duda L, Sánchez MD, Lewis JR. 2015. Feline oral Squamous cell carcinoma: Clinical manifestations and literature review. *J Vet Dent.* 32(1):30–40.
- Blackwood L. 2011. Tumours of the skin and subcutaneous tissues. In: *Dobson J, Lascelles D, editors. BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.* 3rd ed. Quedgeley: Wiley. p. 130–158.
- Bostock DE. 1986. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J.* 142(1):1–19.
- Boyd AS, Stasko TS, Tang YW. 2010. Basaloid squamous cell carcinoma of the skin. *J Am Acad Dermatol.* 64(1):144–151.

- Boyer SN, Wazer DE, Band V. 1996. E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway'. *Cancer Res.*(56):4620–4624.
- Bregazzi V, LaRue S, Powers B, Fettman M, Ogilvie G, Withrow S. 2001. Response to Feline Oral Squamous Cell Carcinoma To Palliative Radiation Therapy. *Vet Radiol Ultrasound.* 42(1):77–79.
- Brodey RS. 1970. Canine and feline neoplasia. *Adv Vet Sci Comp Med.* 14:309–354.
- Buchholz J, Wergin M, Walt H, Gräfe S, Bley CR, Kaser-hotz B. 2007. Photodynamic Therapy of Feline Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Using a Newly Developed Liposomal Photosensitizer: Preliminary Results Concerning Drug Safety and Efficacy. *J Vet Intern Med.* 21(4):770–775.
- Cadossi R, Ronchetti M, Cadossi M. 2014. Locally enhanced chemotherapy by electroporation: clinical experiences and perspective of use of electrochemotherapy. *Futur Oncol.* 10(5):877–90.
- Calvet CY, Mir LM. 2016. The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 35(2):165–177.
- Campana LG, Clover AJP, Valpione S, Quaglino P, Gehl J, Kunte C, Snoj M, Cemazar M, Rossi CR, Miklavcic D, et al. 2016. Recommendations for improving the quality of reporting clinical electrochemotherapy studies based on qualitative systematic review. *Radiol Oncol.* 50(1):1–13.
- Čemažar M, Tamzali Y, Serša G, Tozon N, Mir LM, Miklavčič D, Lowe R, Teissié J. 2008. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. *J Vet Intern Med.* 22:826–831.
- Davalos R V., Mir LM, Rubinsky B. 2005. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng.* 33(2):223–231.
- Dobson JM. 2011. Introduction: cancer in cats and dogs. In: Dobson J, Lascelles D, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.* 3rd ed. Quedgeley: Wiley. p. 1–5.
- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R. 1971. Sunlight exposure and risk of developing cutaneous and oral squamous cell carcinomas in white cats. *J Natl Cancer Inst.*:1073–1078.

- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. 1968. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst.* 40(2):307–318.
- Eisa K, Shawki M, Mohammed M, Shalaby T, Youssef Y. 2013. Combination of square and needle electrodes for better electric field distribution in cancer treatment techniques. *Rom J Biophys.* 23(January 2013):15–25.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, et al. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 45(2):228–247.
- Escoffre J, Rols M. 2012. Electrochemotherapy: Progress and Prospects. *Curr Pharm Des.* 18(23):3406–3415.
- Esmaeili N, Friebe M. 2019. Electrochemotherapy: A Review of Current Status, Alternative IGP Approaches, and Future Perspectives. *J Healthc Eng.* 2019.
- Evans SM, LaCreta F, Helfand S, VanWinkle T, Hanks G. 1991. Technique, pharmacokinetics, toxicity, and efficacy of intratumoral etanidazole and radiotherapy for treatment of spontaneous feline oral squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 20(4):703–708.
- Farese JP, Withrow SJ. 2013. Surgical Oncology. In: Elsevier S, editor. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St. Louis: Elsevier Inc. p. 149–156.
- Favrot C, Welle M, Heimann M, Godson DL, Guscetti F. 2009. Clinical, histologic, and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma in situ. *Vet Pathol.* 46:25–33.
- Fidel J, Lyons J, Tripp C, Houston R, Wheeler B, Ruiz A. 2011. Treatment of Oral Squamous Cell Carcinoma with Accelerated Radiation Therapy and Concomitant Carboplatin in Cats. *J Vet Med.* 25:504–510.
- Fidel JL, Sellon RK, Houston RK, Wheeler BA. 2007. A nine-day accelerated radiation protocol for feline squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound.* 48(5):482–485.
- Fox LE, Rosenthal RC, King RR, Levine PB, Vail DM, Helfand SC, MacEwen EG, Perez-Soler R, Calderwood-Mays M, Kurzman ID. 2000. Use of cis-bis-neodecanoato-trans-R, R-

- 1, 2-diaminocyclohexane platinum (II), a liposomal cisplatin analogue, in cats with oral squamous cell carcinoma. *Am J Vet Res.* 61(7):791–795.
- Gabriel B, Teissié J. 1997. Direct Observation in the Millisecond Time Range of Fluorescent Molecule Asymmetrical Interaction with the Electropermeabilized Cell Membrane. *Biophys J.* 73(November):2630–2637. d
- Gasymova E, Meier V, Guscetti F, Cancedda S, Roos M, Bley CR. 2017. Retrospective clinical study on outcome in cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with an accelerated radiation protocol. *BMC Vet Res.* 13(86):1–8
- Gehl J, Serša G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, Occhini A, Quagliano P, Curatolo P, Campana LG, Kunte C, et al. 2018. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol (Madr).* 57(7):874–882.
- Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. 1998. Enhancement of cytotoxicity by electropermeabilization: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs.* 9:319–325.
- Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. 2002. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta.* 1569:51–58.
- Gilbert RA, Jaroszeski MJ, Heller R. 1997. Novel electrode designs for electrochemotherapy. *Biochim Biophys Acta.*:9–14.
- Gill VL, Bergman PJ, Baer KE, Craft D, Leung C. 2008. Use of imiquimod 5% cream (Aldara™) in cats with multicentric squamous cell carcinoma in situ: 12 cases (2002–2005). *Vet Comp Oncol.* 6(1):55–64.
- Goldschmidt MH, Goldschmidt KH. 2017. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in Domestic Animals.* 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons. p. 88–141.
- Goodfellow M, Hayes A, Murphy S, Brearley M. 2006. A retrospective study of 90Strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. *J Feline Med Surg.* 8(3):169–176. d
- Gothelf A, Mir LM, Gehl J. 2003. Electrochemotherapy: Results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev.* 29(5):371–387.

- Grošelj A, Bosnjak M, Strojani P, Kržan M, Cemazar M, Sersa G. 2018. Efficiency of electrochemotherapy with reduced bleomycin dose in the treatment of nonmelanoma head and neck skin cancer: Preliminary results. *Head Neck*. 40(1):120–125.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. 2005. Epidermal Tumors. In: *Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis*. 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Science. p. 562–603.
- Hammond GM, Gordon IK, Theon AP, Kent MS. 2007. Evaluation of strontium Sr 90 for the treatment of superficial squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats: 49 cases (1990-2006). *J Am Vet Med Assoc*. 231(5):736–741.
- Hauck ML. 2013. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St. Louis, MO: Saunders. p. 305–320.
- Helfand SC. 2011. Therapies of the future. In: Dobson J, Lascelles D, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. 3rd ed. Quedgeley: Wiley. p. 30–99.
- Jarm T, Čemažar M, Miklavčič D, Serša G. 2010. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Rev Anticancer Ther*. 10(5):729–746.
- Jermyn K, Lascelles BDX. 2011. Principles of oncological surgery. In: Dobson J, Lascelles D, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. 3rd ed. Quedgeley: Wiley. p. 44–59.
- Kanthou C, Kranjc S, Serša G, Tozer G, Zupanic A, Čemažar M. 2006. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Mol Cancer Ther*. 5(December):3145–3153.
- Kisseberth WC, Vail DM, Yaissle J, Jeglum KA, Couto CG, Ward H, Khanna C, Obradovich JE. 2008. Phase I clinical evaluation of carboplatin in tumor-bearing cats: A veterinary cooperative oncology group study. *J Vet Intern Med*. 22(1):83–88.
- LaRue SM, Gordon IK. 2013. Radiation Therapy. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St. Louis, MO: Saunders. p. 180–197.

- Lascelles B. 2011. Oral tumours. In: Dobson J, Lascelles D, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. 3rd ed. Quedgeley: Wiley. p. 191–201.
- Liptak JM, Withrow SJ. 2013. Cancer of the Gastrointestinal Tract. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St. Louis, MO: Saunders. p. 381–431
- Mali B, Jarm T, Snoj M, Serša G, Miklavčič D. 2013. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 39(1):4–16.
- Mali B, Miklavčič D, Campana LG, Čemažar M, Serša G, Snoj M, Jarm T. 2013. Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. *Radiol Oncol*. 47(1):32–41.
- Markelc B, Serša G, Čemažar M. 2013. Differential Mechanisms Associated with Vascular Disrupting Action of Electrochemotherapy: Intravital Microscopy on the Level of Single Normal and Tumor Blood Vessels. *PLoS One*. 8(3):1–11.
- Martinez-Ruzafa I, Dominguez PA, Dervisis NG, Sarbu L, Newman RG, Cadile CD, Kitchell BE. 2009. Tolerability of gemcitabine and carboplatin doublet therapy in cats with carcinomas. *J Vet Intern Med*. 23(3):570–577.
- Marty M, Serša G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, Billard V, Geertsen PF, Larkin JO, Miklavcic D, et al. 2006. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer, Suppl*. 4(11):3–13.
- Mauldin GN, Matus RE, Patnaik AK, Bond BR, Mooney SC. 1988. Efficacy and Toxicity of Doxorubicin and Cyclophosphamide Used in the Treatment of Selected Malignant Tumors in 23 Cats. *J Vet Intern Med*. 2(2):60–65.
- Mazères S, Sel D, Golzio M, Pucihar G, Tamzali Y, Miklavčič D, Teissié J. 2009. Non invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery. *J Control Release*. 134(2):125–131.
- McDonald C, Looper J, Greene S. 2011. Response Rate and Duration Associated with a 4Gy 5 Fraction Palliative Radiation Protocol. *Vet Radiol Ultrasound*. 00(0):1–7.

- Miklavčič D, Corovic S, Pucihar G, Pavselj N. 2006. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer, Suppl.* 4(11):45–51.
- Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Ser G. 2014. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online.* 13(1):1–20.
- Miklavčič D, Serša G, Brecej E, Gehl J, Soden D, Bianchi G, Ruggieri P, Rossi CR, Campana LG, Jarm T. 2012. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Med Biol Eng Comput.* 50:1213–1225.
- Miller M a, Nelson SL, Turk JR, Pace LW, Brown TP, Shaw DP, Fischer JR, Gosser HS. 1991. Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Vet Pathol.* 28(5):389–395.
- Mir LM. 2006. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl.* 4(11):38–44.
- Mir LM. 2014. Electroporation-Based Gene Therapy: Recent Evolution in the Mechanism Description and Technology Developments. In: Li S, Cutrera J, Heller R, Teissié J, editors. *Electroporation Protocols. Preclinical and Clinical Gene Medicine.* 2nd ed. New York: Springer. p. 17–37.
- Mir LM, Gehl J, Serša G, Collins C, Garbay J-R, Billard V, Geertsen PF, Rudolf Z, O'Sullivan GC, Marty M. 2006. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator TM by means of invasive or non-invasive electrodes. *EJC Suppl.* 4:14–25.
- Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissié J, Domenge C, Miklavčič D, Jaroszeski MJ, Orlowski S, Reintgen DS, Rudolf Z, et al. 1998. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer.* 77(12):2336–42.
- Mir LM, Orlowski S, Belehradec JJ, Paoletti C. 1991. Electrochemotherapy Potentiation of Antitumour Effect of Bleomycin by Local Electric Pulses. *Eur J Cancer.* 27(1):68–72.
- Mir LM, Tounekti O, Orlowski S. 1996. Bleomycin: Revival of an old drug. *Gen Pharmacol.* 27(5):745–748.
- Munday JS. 2014. Papillomaviruses in felids. *Vet J.* 199(3):340–347.

- Munday JS, Aberdein D. 2012. Loss of Retinoblastoma Protein, But Not p53, Is Associated With the Presence of Papillomaviral DNA in Feline Viral Plaques, Bowenoid In Situ Carcinomas, and Squamous Cell Carcinomas. *Vet Pathol.* 49(3):538–545.
- Munday JS, French AF, Peters-Kennedy J, Orbell GMB, Gwynne K. 2011. Increased p16 CDKN2A Protein Within Feline Cutaneous Viral Plaques, Bowenoid In Situ Carcinomas, and a Subset of Invasive Squamous Cell Carcinomas. *Vet Pathol.* 48(2):460–465.
- Munday JS, Gibson I, French AF. 2011. Papillomaviral DNA and increased p16CDKN2A protein are frequently present within feline cutaneous squamous cell carcinomas in ultraviolet-protected skin. *Vet Dermatol.* 22(4):360–366.
- Munday JS, Kiupel M, Adrienne F, Howe L. 2008. Amplification of papillomaviral DNA sequences from a high proportion of feline cutaneous in situ and invasive squamous cell carcinomas using a nested polymerase chain reaction. *Vet Dermatol.* 19 (May):259–263.
- Munday JS, Kiupel M, French AF, Howe L, Squires RA. 2007. Detection of papillomaviral sequences in feline Bowenoid in situ carcinoma using consensus primers. *Vet Dermatol.* 18(4):241–245.
- Munday JS, Löhr C V., Kiupel M. 2017. Tumors of the Alimentary Tract. In: Meuten D, editor. *Tumors in Domestic Animals.* 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons. p. 499–601.
- Murphy S. 2013. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Cat: Current understanding and treatment approaches. *J Feline Med Surg.* 15(5):401–407.
- Nespeca G, Vet M, Grest P, Rosenkrantz WS, Ackermann M, Favrot C. 2006. Detection of novel papillomaviruslike sequences in paraffin-embedded specimens of invasive and in situ squamous cell carcinomas from cats. *Am J Vet Res.* 67(12):1–6.
- Neu KW, Neu JC. 2009. Theory of electroporation. In: Efimov IR, Kroll MW, Tchou P, editors. *Cardiac Bioelectric Therapy.* 1st ed. Springer US. p. 133–161.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1(7):841–5.
- North S, Banks T. 2009. The human-animal bond and why veterinary oncology is important. In: *Small Animal Oncology: An Introduction.* 1st ed. Saunders Ltd. p. 1–3.

- Owen LN. 1980. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. Owen LN, editor. Geneva.
- Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. 1995. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J.* 14(3):503–511.
- Paulino AFG, Singh B, Shah JP, Huvos AG. 2000. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 110:1479–1482.
- Roberts G, Klein MK, Loomis M, Weldy S, Berns MW. 1991. Photodynamic Therapy of Spontaneous Cancers in Felines, Canines, and Snakes With Chloro-aluminum Sulfonated Phthalocyanine. *J Natl Cancer Inst.* 83:18–23.
- Rols MP, Tamzali Y, Teissié J. 2002. Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report. *Bioelectrochemistry.* 55(1–2):101–105.
- Sabhlok A, Ayl R. 2014. Palliative Radiation Therapy Outcomes for Cats with Oral Squamous Cell Carcinoma (1999–2005). *Am Coll Vet Radiol.* 55(5):565–570.
- Serša G. 2006. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *EJC Suppl.* 4:52–59.
- Serša G, Čemažar M. 2016. Tissue Reactions to Electroporation and Electrochemotherapy: Vascular Effects that have Implications in Tumor Treatment. *IFMBE Proc.* 53(Wc 2015):20–23.
- Serša G, Čemažar M, Parkins CS, Chaplin DJ. 1999. Tumour Blood Flow Changes Induced by Application of Electric Pulses. *Eur J Cancer.* 35(4):672–677.
- Serša G, Čemažar M, Rudolf Z. 2003. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Ther.* 1:133–142.
- Serša G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajsek M, Sentjurc M, Miklavčič D, Kadivec M, Kranjc S, Secerov A, et al. 2008. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer.* 98(2):388–98.
- Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Belehradek J, Jarm T, Mir LM. 1997. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: Comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. In: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* Vol. 43. p. 279–283.

- Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. 2008. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *J Cancer Surg.* 34:232–240.
- Silve A, Mir LM. 2010. Cell Electroporation and Cellular Uptake of Small Molecules: The Electrochemotherapy Concept. In: Kee S, Lee E, Gehl J, editors. *Electroporation in Science and Medicine*. New York: Springer. p. 69–82.
- Simčič P, Pierini A, Lubas G, Lowe R, Granziera V, Tornago R, Valentini F, Alterio G, Cochi M, Rangel MMM, et al. 2021. A retrospective multicentric study of electrochemotherapy in the treatment of feline nasal planum squamous cell carcinoma. *Vet Sci.* 8(3):1–16.
- Spugnini EP, Azzarito T, Fais S, Fanciulli M, Baldi A. 2016. Electrochemotherapy as First Line Cancer Treatment: Experiences from Veterinary Medicine in Developing Novel Protocols. *Curr Cancer Drug Targets.* 16(1):43–52.
- Spugnini EP, Baldi A. 2014. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: From Rescue to First Line Therapy. In: Li S, Cutrera J, Heller R, Teissié J, editors. *Electroporation Protocols. Preclinical and Clinical Gene Medicine*. 2nd ed. New York: Springer. p. 247–256.
- Spugnini EP, Baldi A. 2019. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: State-of-the-Art and Perspectives. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 49(5):967–979.
- Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, Citro G, Porrello A. 2007. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: A preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 59(3):375–381.
- Spugnini EP, Baldi F, Mellone P, Feroce F, D'Avino A, Bonetto F, Vincenzi B, Citro G, Baldi A. 2007. Patterns of tumor response in canine and feline cancer patients treated with electrochemotherapy: preclinical data for the standardization of this treatment in pets and humans. *J Transl Med.* 5:48.
- Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Bufalini M, Giannini G, Citro G, Feroce F, Baldi A. 2008. Adjuvant electrochemotherapy for incompletely excised anal sac carcinoma in a dog. *In Vivo (Brooklyn).* 22(1):47–50.
- Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Citro G, Caruso G, Cardelli P, Baldi A. 2008. Electrochemotherapy-induced radiation recall in a cat. *In Vivo (Brooklyn).* 22(6):751–754.

- Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, De Luca A, Codini C, Citro G, D'Avino A, Baldi A. 2008. Successful rescue of an apocrine gland carcinoma metastatic to the cervical lymph nodes by mitoxantrone coupled with trains of permeabilizing electrical pulses (Electrochemotherapy). *In Vivo (Brooklyn)*. 22(1):51–54.
- Spugnini EP, Fanciulli M, Citro G, Baldi A. 2012. Preclinical models in electrochemotherapy: the role of veterinary patients. *Futur Oncol*. 8(7):829–837.
- Spugnini EP, Filipponi M, Romani L, Dotsinsky I, Mudrov N, Baroni A, Ruocco E, Laieta MT, Montesarchio V, Cassandro R, et al. 2007. Local control and distant metastasis after electrochemotherapy of a canine anal melanoma. *In Vivo (Brooklyn)*. 21(5):897–900.
- Spugnini EP, Filipponi M, Romani L, Dotsinsky I, Mudrov N, Citro G, Baldi A. 2010. Electrochemotherapy treatment for bilateral pleomorphic rhabdomyosarcoma in a cat. *J Small Anim Pract*. 51(6):330–332.
- Spugnini EP, Pizzuto M, Filipponi M, Romani L, Vincenzi B, Menicagli F, Lanza A, De Girolamo R, Lomonaco R, Fanciulli M, et al. 2015. Electroporation Enhances Bleomycin Efficacy in Cats with Periocular Carcinoma and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head. *J Vet Intern Med*. 29(5):1368–1375.
- Spugnini EP, Porrello A. 2003. Potentiation of Chemotherapy in Companion Animals with Spontaneous Large Neoplasms by Application of Biphasic Electric Pulses. *J Exp Clin Cancer Res*. 22:571–580.
- Spugnini EP, Renaud SM, Buglioni S, Carocci F, Dragonetti E, Murace R, Cardello P, Vincenzi B, Baldi A, Citro G. 2011. Electrochemotherapy with cisplatin enhances local control after surgical ablation of fibrosarcoma in cats: an approach to improve the therapeutic index of highly toxic chemotherapy drugs. *J Transl Med*. 9:152.
- Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Dotsinsky I, Mudrov T, Baldi A. 2011. Evaluation of Cisplatin as an Electrochemotherapy Agent for the Treatment of Incompletely Excised Mast Cell Tumors in Dogs. *J Vet Intern Med*. 25(2):407–411..
- Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Tonini G, Dotsinsky I, Mudrov N, Baldi A. 2009. Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report. *Vet J*. 179(1):117–120.

- Tamzali Y, Borde L, Rols MP, Golzio M, Lyazrhi F, Teissié J. 2012. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases. *Equine Vet J.* 44(2):214–220.
- Teissié J. 2014. Electroporation of the Cell Membrane. In: Li S, Cutrera J, Heller R, Teissié J, editors. *Electroporation Protocols. Preclinical and Clinical Gene Medicine.* 2nd ed. New York: Springer. p. 25–46.
- Théon AP. 2010. Practical Radiation Therapy. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 7th ed. Missouri: Elsevier Health Sciences. p. 2137–2148.
- Thomson M. 2007. Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum in Cats and Dogs. *Clin Tech Small Anim Pract.* 22:42–45.
- Thomson NA, Munday JS, Dittmer KE. 2016. Frequent detection of transcriptionally active *Felis catus* papillomavirus 2 in feline cutaneous squamous cell carcinomas. *J Gen Virol.* 97:1189–1197.
- Tounekti O, Pron G, Belehradec J, Mir LM. 1993. Bleomycin, an Apoptosis-mimetic Drug That Induces Two Types of Cell Death Depending on the Number of Molecules Internalized. *Cancer Res.* 53(22):5462–5469.
- Tozon N, Kodre V, Serša G, Čemažar M. 2005. Effective Treatment of Perianal Tumors in Dogs with Electrochemotherapy. *Anticancer Res.* 25:839–846.
- Tozon N, Pavlin D, Serša G, Dolinsek T, Čemažar M. 2014. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *J Feline Med Surg.* 16(4):291–9..
- Tozon N, Tamzali Y, Čemažar M. 2016. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. In: Miklavčič D, editor. *Handbook of Electroporation.* Springer, Cham. p. 1–14.
- Tozon N, Tratar UL, Znidar K, Serša G, Teissié J, Čemažar M. 2016. Operating Procedures of the Electrochemotherapy for Treatment of Tumor in Dogs and Cats. *J Vis Exp.*(116):1–7.
- Turek M, Pellin M. 2016. A Review of Feline Oral Squamous Cell Carcinoma. *Today's Veterinaty Pract.*(December):24–33.

- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)*. Ser. A(19):200–209.
- Vail DM, Withrow SJ. 2007. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. St. Louis, MO: Saunders. p. 375–400.
- Vascellari M, Mazzei M, Zanardello C, Melchiotti E, Albanese F, Forzan M, Croce MF, Alberti A, Abramo F. 2019. *Felis catus* Papillomavirus Types 1, 2, 3, 4, and 5 in Feline Bowenoid in Situ Carcinoma: An In Situ Hybridization Study. *Vet Pathol.*:1–8.
- VCOG-CTCAE. 2011. Veterinary Cooperative Oncology Group - Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1. 0. *Vet Comp Oncol*. 14(4):417–446.
- de Vos JP, Burm AGO, Focker BP. 2004. Results from the treatment of advanced stage squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats, using a combination of intralesional carboplatin and superficial radiotherapy: a pilot study. *Vet Comp Oncol*. 2(2):75–81.
- Wiles V, Hohenhaus A, Lamb K, Zaidi B, Camps-palau M, Leibman N. 2016. Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats with oral squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg.*:1–9.
- Withrow SJ, Vail DM, Page RL. 2013. Why Worry About Cancer in Companion Animals? In: Withrow and MacEwen's *Small Animal Clinical Oncology*. Fifth. St. Louis: Saunders Elsevier. p. 25–26.
- Zhan H, Zheng H. 2007. The Role of Topical Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitors in Skin Cancer. *Am J Clin Dermatol*. 8(4):195–200.

# ANEXOS

## Anexo 1 - Poster científico apresentado no XIII CONGRESSO HOSPITAL VETERINÁRIO MONTENEGRO – PATOLOGIAS CARDIO-RESPIRATÓRIAS SEM SEGREDOS (2017) (18 a 19 de fevereiro de 2017)



### ELETROQUIMIOTERAPIA: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 15 GATOS COM CARCINOMA DAS CÉLULAS ESCAMOSAS

Sousa, L.<sup>1</sup>; Felisberto, R.<sup>2</sup>; Henriques, J.<sup>2</sup>.

1 - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Portugal; 2 - Hospital Veterinário Berna, Lisboa, Portugal



#### Introdução

O carcinoma das células escamosas (CCE) é um dos tumores malignos mais frequentes nos gatos, representando aproximadamente 15% dos seus tumores cutâneos e 60-75% dos seus tumores orais. Existem várias opções terapêuticas, destacando-se a excisão cirúrgica e crioterapia<sup>1</sup>. No entanto, devido ao seu carácter insidioso, muitas vezes os animais apresentam-se à consulta em estádios muito avançados da doença.

Este estudo visa avaliar a resposta a uma modalidade terapêutica relativamente recente, direcionada a neoplasias cutâneas e subcutâneas, que tem vindo a ganhar popularidade pela sua elevada eficácia associada a baixa toxicidade.

A eletroquimioterapia (EQT) combina a quimioterapia com a aplicação de pulsos elétricos. São utilizados curtos pulsos elétricos de alta voltagem que resultam num aumento substancial e transitório da permeabilidade das células, fenómeno designado de eletroporação (EP)<sup>2</sup>. Deste modo é possível a utilização de agentes antineoplásicos pouco permeáveis, maximizando a sua concentração intracelular.

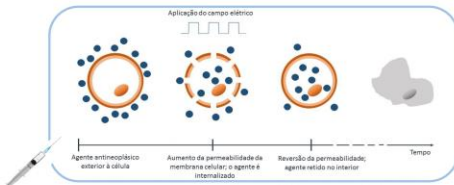


Figura 1. Potenciação do agente citotóxico através do mecanismo de eletroporação.

Outro fenómeno importante resultante dos pulsos elétricos é o *vascular lock*<sup>3</sup>. Este consiste na diminuição do fluxo sanguíneo local e no consequente aprisionamento dos agentes antineoplásicos no tecido tumoral por maiores períodos de tempo.

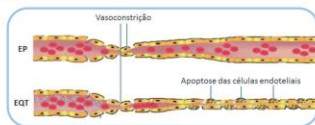


Figura 2. Efeitos vasculares resultantes da aplicação do campo elétrico, isoladamente e associado a quimioterapia respetivamente. Adaptado de *Clinical Aspects of Electroporation* (p. 87), Sersa, G., 2011. New York: Springer.

Assim, a eficácia dos agentes citotóxicos é potenciada e a sua ação é mais localizada, resultando numa mínima toxicidade sistémica.

No caso particular dos CCE em gatos, foi demonstrada altas taxas de resposta na EQT com bleomicina, com taxas de remissão completa que variam, na literatura, entre 77% e 87,5%.

#### Metodologia

Entre dezembro de 2015 e novembro de 2016, foi realizada EQT em quinze gatos com CCE.

O agente utilizado foi a bleomicina, administrada por via intravenosa na dose de 30 mg/m<sup>2</sup>. Aproximadamente 10 minutos após a administração, foi induzida a eletroporação da área tumoral com o gerador de pulsos e o seu respetivo eletrodo (*ELECTROvet S13*)<sup>4</sup>.

O contacto do eletrodo com a área a tratar foi otimizado com a prévia aplicação de um gel condutor e os pulsos elétricos foram empregues em toda a sua extensão. Cada carga aplicada foi composta por uma sequência de 8 pulsos elétricos de onda quadrada com 1300 V/cm de amplitude, 100 µs de duração e 1 Hz de frequência.

#### Referências

- Vail, D.M., & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: S.J. Withrow & D.M. Vail (Eds), *Small Animal Clinical Oncology* 4th Ed. (pp. 382-386). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Spugnini, E.P., Azzarito, T., Fais, S., Fanciulli, M., & Baldi, A. (2016). Electrochemotherapy as First Line Cancer Treatment: Experiences from Veterinary Medicine in Developing Novel Protocols. *Current Cancer Drug Targets*, 16(1), 43-52.
- Sersa, G., & Cemažar, M., (2016). Tissue Reactions to Electroporation and Electrochemotherapy: Vascular Effects that have Implications in Tumor Treatment. *IFMBE Proceedings*, 53(Wc 2015).
- Mali, B., Miklavcic, D., Campana, L.G., Cemažar, M., Sersa, G., Snój, M., & Jarm, T. (2013). Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. *Radiology and Oncology*, 47(1), 32-41.



Figura 3. Modelo de gerador de pulsos utilizado, *ELECTROvet S13*<sup>4</sup>. Obtido a 20 de Dezembro, 2016, a partir de: <http://vetis.pl/uradomnie/ELECTROvet-S13>



Figura 4. Eletrodo utilizado, peça de eletrodos paralelos, em forma de "L".



Figura 5. Aplicação de pulsos elétricos na área tumoral.

#### Resultados

Idade (anos), Sexo	Localização	Tamanho (cm)	N sessões EQT	Resposta
13, F	Nasal	1,8	1	Morte por causas não relacionadas
8, F	Nasal	1,6	1	RC
8, F	Nasal	0,6	1	RC
14, M	Nasal	3	2	DP
10, M	Mandibular	-	1	RP
5, M	Nasal e Labial	4,5	2	DP
10, M	Nasal	2	1	RC
4, F	Palpebral	1,1	2	RC
5, M	Nasal	2,8	1	RC
17, M	Fronte   Pálpebra   Tempora	1,7   1,6   1,7	2	RP
9, F	Nasal	-	1	RC
8, M	Nasal	2,4	2	RC
9, M	Nasal	2,3	1	RP
11, M	Nasal	1,2	1	RC
15, M	Oral	-	3	RP

F: fêmea; M: macho; N: número; EQT: eletroquimioterapia; RC: remissão completa; RP: remissão parcial; DP: doença progressiva.

Tabela 1. Dados individuais e resposta à eletroquimioterapia dos quinze gatos com carcinoma de células escamosas incluídos no estudo.

Um dos animais faleceu por causas não relacionadas. No total, a taxa de resposta foi de 86%. Dos quatorze gatos, oito alcançaram remissão completa (57%), quatro remissão parcial (29%) e dois sofreram progressão da doença (14%).



Figura 6. Gato fêmea de 8 anos com CCE no plano nasal à apresentação (A) e após uma sessão de EQT (B).



Figura 7. Gato macho de 10 anos com CCE no plano nasal à apresentação (A) e após uma sessão de EQT (B).



Figura 8. Gato macho de 8 anos com CCE no plano nasal à apresentação (A) e após uma sessão de EQT (B).



Figura 9. Gato macho de 15 anos com CCE na cavidade oral à apresentação (A) e após três sessões de EQT (B).

Posteriormente ao procedimento os animais apresentaram inflamação local, por vezes intensa, com edema e prurido. Alguns com marcada prostração durante a recuperação, desconforto e dor. Foi necessário a colocação de tubo esofágico em quatro gatos e, em alguns casos, a analgesia teve de ser ajustada com metadona ou buprenorfina.

#### Discussão e Conclusão

As taxas de remissão completa obtidas foram inferiores às reportadas. No entanto, os dois animais com progressão da doença correspondem às duas lesões de maiores dimensões. Esta situação poderá estar relacionada com a correlação entre o tamanho das lesões e a resposta à EQT, em que a EQT demonstrou ter uma eficácia significativamente mais baixa em tumores com diâmetro máximo igual ou superior a 3 cm<sup>4</sup>.

Os efeitos secundários observados foram mais intensos que os descritos e o intervalo de tempo entre sessões relatado de uma semana não foi praticável devido à morosa recuperação, optando-se por intervalos de um mês.

A EQT demonstra ser uma abordagem terapêutica eficaz em gatos com CCE, cujos tumores são inferiores a 3 cm.