

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃO:
ELETROQUIMIOTERAPIA ASSOCIADA OU NÃO A CIRURGIA E
CORRELAÇÃO COM A SOBREVIDA**

RÚBIA MONTEIRO DE CASTRO CUNHA

Belo Horizonte – MG

2021

RÚBIA MONTEIRO DE CASTRO CUNHA

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃO:
ELETROQUIMIOTERAPIA ASSOCIADA OU NÃO A CIRURGIA E
CORRELAÇÃO COM A SOBREVIDA**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo

Co-orientadora: Dra. Gleidice Eunice Lavalle

Belo Horizonte – MG

2021

C972c Cunha, Rúbia Monteiro de Castro, 1987 -
Carcinoma de células escamosas em cão: eletroquimioterapia associada ou não a
cirurgia e correlação com a sobrevida/ Rúbia Monteiro de Castro Cunha. -2021.

127 f.:il

Orientador: Roberto Baracat de Araújo
Coorientadora: Gleidice Eunice Lavalle
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias
Bibliografia: f. 86 a 119.

1- Cão – Teses - 2. Câncer – Tratamento – Teses - 3. Tumores em animais – Teses -
I. Araújo, Roberto Baracat de – II. Lavalle, Gleidice Eunice - III. Universidade Federal de
Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636 089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

RUBIA MONTEIRO DE CASTRO CUNHA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 25 de junho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Roberto Baracat de Araújo
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Gleidice Eunice Lavalle

Dr.(a). Renato de Lima Santos

Dr.(a). Rodrigo dos Santos Horta

Dr.(a). Marcelo Mont Mór Rangel

Dr.(a). Martha de Souza Teixeira da Rocha



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Roberto Baracat de Araujo, Chefe de departamento**, em 25/06/2021, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 25/06/2021, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo dos Santos Horta, Servidor(a)**, em 25/06/2021, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Gleidice Eunice Lavalle, Médica Veterinária**, em 25/06/2021, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Martha de Souza Teixeira da Rocha, Usuário Externo**, em 25/06/2021, às 19:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Monte Mor Rangel, Usuário Externo**, em 30/06/2021, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o

código verificador **0791988** e o código CRC **6D843C39**.

AGRADECIMENTOS

O final de uma caminhada que começou em 2005, quando iniciei o curso de Medicina Veterinária. Foram 12 anos na Escola de Veterinária da UFMG, minha segunda casa. Como agradecer a todos que foram importantes em todos esses anos? Como me despedir?

Começo pelos meus pais, minha base sólida, meus exemplos, meus heróis. Obrigada por estarem ao meu lado em cada passo dessa caminhada, acreditando e torcendo por mim! Amo vocês!

Ao Gustavo, grande amor da minha vida! Obrigada pelo companheirismo, carinho, apoio e incentivo. Te amo!

À minha amada e adorada filha, Olívia! A caminhada não foi mais fácil com você, mas com certeza foi infinitamente mais bonita! Mamãe te ama muito!

Ao meu irmão, pela paciência e disponibilidade para me socorrer nos momentos de desespero nas minhas brigas com o computador. Te amo Nhanhos!

À Gleidice, por ser guia e luz nessa caminhada! Por tantos ensinamentos, pelo exemplo profissional e pessoal, pela amizade! Por ser a mãe da oncologia veterinária no Brasil e um pouco mãe de todos nós, seus meninos (com a licença do Pedro, Vitor e Davi). Você é uma das minhas pessoas favoritas!

Ao Prof. Baracat, o melhor orientador que eu poderia desejar! Obrigada por saber os meandros da pós-graduação e por estar sempre disponível.

A todos os companheiros da oncologia, Bia, Carlota, Adônis, Stefane, Fernanda, Miriã, Rodrigo e Cecília! Saudades das nossas terças-feiras de loucura, correria e estresse, mas também de muito aprendizado e risadas! Um agradecimento especial à Fernanda, que foi de ajuda inestimável na reta final!

A todos os profissionais, professores, veterinários e prestadores de serviço da Escola!

À Ayisa, por sua incomensurável contribuição com a análise histopatológica! Obrigada pelo profissionalismo, seriedade e disponibilidade. Tenho certeza de que ainda vou ouvir falar muito de você!

Aos amigos queridos, Abras, Tayer, Flavinha e Chico. Obrigada pela amizade e incentivo!

Aos animais, em especial Pepe, Mel, Rambo, Maguila, Tuco, Maria Rita, Poppy, Bartolomeu e Flecha! Vocês merecem todo o estudo e dedicação do mundo!

À Universidade Federal de Minas Gerais, me despeço, já saudosa de seus corredores! A caminhada foi longa, mas valeu cada passo!

“São as crianças, que sem falar, nos ensinam as razões para viver. Elas não têm saberes a transmitir. No entanto, elas sabem o essencial da vida.”

Rubem Alves

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) se destaca dentre as neoplasias malignas em cães, por sua incidência e apresentação clínica, que pode ser de nódulos únicos ou múltiplos, localmente agressivos e com potencial metastático. Este experimento teve como objetivo avaliar a resposta ao tratamento e características anatomopatológicas e imuno-histoquímicas relacionadas ao CCE, com posterior análise do intervalo livre de doença e sobrevida específica. Para tanto, foram incluídos cães referenciados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais com diagnóstico histopatológico de CCE. Foram incluídos 54 cães neste estudo, com idade entre 1 e 14 anos (média 9,16 anos). 65,4% (34/54) dos animais do estudo possuíam pele e pelagem branca. Houve uma associação significativa entre cor do pelo do animal e tumores em locais com exposição ao sol ($p = 0,001$). Os animais com tumores em locais com exposição solar tiveram uma sobrevida maior do que os animais com tumores em locais não relacionados com a exposição solar ($p = 0,001$). A associação de cirurgia com eletroquimioterapia (EQT) conferiu um benefício 32% maior em relação à abordagem somente cirúrgica ($HR = 0,32$, $p = 0,038$, $IC = 0,11-0,94$). Os pacientes toleraram bem a EQT e nenhum efeito colateral local ou sistêmico importante foi observado. EQT associada ou não à cirurgia apresentou 90,9% de resposta objetiva. 33,3% (18/54) dos animais apresentaram metástase para o linfonodo regional e/ou metástase à distância no momento do diagnóstico ou em algum momento ao longo do período de acompanhamento. Considerando a graduação histopatológica, 16,2% (6/37) foram bem diferenciados (grau 1 de Broder), 81,1% (30/37) foram moderadamente diferenciados (graus 2 e 3 de Broder) e 2,7% (1/37) foram pobremente diferenciados (grau 4 de Broder). Os animais com CCE relacionados à exposição solar apresentaram características histopatológicas mais agressivas, mas apresentaram um maior tempo de sobrevida específica. Isso provavelmente se deve à programação terapêutica individualizada dos pacientes, com a associação da cirurgia com a EQT. Não foi possível estabelecer um valor de corte prognóstico para escore de COX-2, densidade de microvasos intratumoral e índice de proliferação celular (Ki-67).

Palavras-chave: Cães, neoplasias, eletroquimioterapia, cirurgia, cicloxigenase-2, antígeno Ki-67, densidade de microvasos intratumoral

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most important malignancies in dogs, due to its incidence and clinical presentation, which can be of single or multiple lesions, locally aggressive, and with metastatic potential. The objective of this thesis was to evaluate response to treatment and anatomopathological and immunohistochemical characteristics related to this neoplasm, followed by disease-free interval and overall survival time evaluation. Dogs referred to the Veterinary Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais with a histopathologic diagnosis of SCC were included in the study. 54 dogs were included in this study, with a median age of 9.16 years (1 to 14 years old). 65.4% (34/54) of the animals in this study had white skin and fur coats. There was a significant association between fur coat color and tumors in locations related to sun exposure ($p = 0.001$). Animals with tumors in sun exposed locations had longer overall survival time than animals with tumors in locations not associated with sun exposure ($p = 0.001$). Association of surgery with electrochemotherapy (ECT) yielded a survival benefit 32% higher when compared to surgical approach alone (HR = 0.32, $p = 0.038$, IC = 0.11-0.94). Patients tolerated ECT well and no important local or systemic side effects were noted. ECT with or without surgery showed an objective response rate of 90.9%. 34.6% (18/52) of animals showed local lymph node and/or distant site metastasis at diagnosis or at some point during follow-up. Considering histopathological grading, 16.2% (6/37) were well differentiated (Broder grade 1), 81.1% (30/37) were moderately differentiated (Broder grades 2 and 3), and 2.7% (1/37) were poorly differentiated (Broder grade 4). Animals with tumors in sun exposed locations had more aggressive histopathological characteristics but had a longer overall survival time. This is probably due to individualized therapeutic planning, with surgery and ECT association. It was not possible to establish a prognostic value for COX-2 score, intratumoral microvessel density nor proliferation index.

Key words: Dogs, neoplasia, electrochemotherapy, surgery, cyclooxygenase-2, ki-67 antigen, intratumoral microvessel density

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Modelo de iniciação e progressão do CCE induzido por radiação UV. 35
A radiação UV-B induz dano ao DNA e apoptose nos queratinócitos da epiderme. A geração de fotoprodutos de DNA pela radiação UV-B e defeitos no reparo e replicação do DNA leva ao acúmulo de mutações no gene supressor de tumor p53 nos queratinócitos, perda da expressão do ligante Fas e resistência à apoptose. Com a exposição repetida à radiação UV, células mutantes para p53 sofrem expansão clonal e acumulam mutações em outros genes importantes. Alguns clones se desenvolvem em lesões pré-neoplásicas (dano actínico) e algumas progridem para CCE (Melnikova e Ananthaswamy, 2005).
- Figura 2 Representação esquemática do conceito básico da EQT: a) após a 39
administração, o quimioterápico circunda a célula; b) formação de poros após a aplicação dos pulsos, o quimioterápico entra na célula; c) a membrana se fecha, o quimioterápico fica aprisionado dentro da célula; d) o quimioterápico induz a morte celular (Modificado de Miklavcic et al., 2012).
- Figura 3 Eletroporação da membrana plasmática das células de acordo com a 41
intensidade e direção do campo elétrico e de acordo com o formato e orientação das células no espaço (Modificado de Corovic et al., 2009).
- Figura 4 Aparelho eletroporador VetCP125® utilizado para realizar as sessões 44
de eletroquimioterapia.
- Figura 5 Eletrodo em agulhas com duas fileiras de agulhas paralelas de aço 44
inoxidável, com distância interna entre as fileiras de 5 mm.
- Figura 6 Carcinoma de células escamosas grau 1 de Broder, apresentando 49
células neoplásicas com citoplasma eosinofílico abundante, pontes intercelulares e massas laminadas concêntricas de queratina (pérolas córneas) (seta marela) (A); carcinoma de células escamosas grau 2 de Broder, apresentando células neoplásicas com citoplasma menos eosinofílico e pérolas córneas ainda frequentes (seta amarela) (B); carcinoma de células escamosas grau 3 de Broder, apresentando

núcleos mostrando maior pleomorfismo e hiperchromatismo (C); carcinoma de células escamosas grau 4 de Broder apresentando pouca diferenciação escamosa, com citoplasma anfófilico e núcleos extremamente pleomórficos. Hematoxilina-eosina, 20x.

- Figura 7 Padrões de expressão de COX-2 em carcinoma de células escamosas, sendo escore baixo (A) e escore alto (B). COX-2 (monoclonal; 1:100), Hematoxilina de Harris, 40x. 52
- Figura 8 Padrões de expressão de CD-31 em carcinoma de células escamosas, sendo escore baixo (A) e escore alto (B). JC70A (1:100), Hematoxilina de Harris, 40x. 53
- Figura 9 Padrões de expressão de ki-67 em carcinoma de células escamosas, sendo escore baixo (A) e escore alto (B). MIB-1 (monoclonal; 1:50), Hematoxilina de Harris, 40x. 53
- Figura 10 Distribuição da idade entre os animais tratados com cirurgia e os animais tratados com EQT, associada ou não a cirurgia ($p = 0.085$). 56
- Figura 11 Cão da raça Pit Bull de pele e pelagem claras, apresentando múltiplas lesões de CCE no abdômen, pele avermelhada, espessada e ressecada devido à exposição solar (dano actínico). 57
- Figura 12 Figura 12 – 100% dos animais com tumores em locais relacionados à exposição solar apresentavam pelagem branca, enquanto 81.8% dos animais com tumores em locais não relacionados à exposição solar apresentavam pelagem não branca ($p = 0,001$). 58
- Figura 13 Cão, Cocker Spaniel, pelagem preta: observa-se CCE no dígito. 59
- Figura 14 Representação gráfica da sobrevida global dos 54 animais com CCE, conforme a localização do tumor. Animais com tumores em locais relacionados com a exposição ao sol ($n = 32$), animais com tumores em locais não relacionado com a exposição ao sol ($n = 22$) ($p = 0,001$). 60
- Figura 15 Representação gráfica da sobrevida específica dos 32 animais com CCE em locais relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia + EQT ($n = 26$); EQT ($n = 5$) ($p = 0,698$). 61
- Figura 16 Representação gráfica do intervalo livre de doença dos 32 animais 61

com CCE em locais relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia + EQT (n = 26); EQT (n = 5) (p = 0,9012).

- Figura 17 Representação gráfica da sobrevida global dos 22 animais com CCE em locais não relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia (n = 17); EQT (n = 5) (p = 0,8207). 62
- Figura 18 Representação gráfica do intervalo livre de doença dos 22 animais com CCE em locais não relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia (n = 17); EQT (n = 5) (p = 0,0241). 62
- Figura 19 Representação gráfica da sobrevida dos 54 animais com CCE, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia (n = 18); cirurgia + EQT (n = 26); EQT (n = 10) (p = 0,0545). 63
- Figura 20 Representação gráfica da sobrevida global dos 54 animais com CCE, conforme o número de sessões de EQT: nenhuma sessão (n = 15); uma sessão (n = 14); duas sessões (n = 12); três ou mais sessões (n = 13) (p = 0,0001). 64
- Figura 21 Cão da raça Dogo Argentino apresentando CCE na região do prepúcio (16a), resultado após cirurgia conservativa com EQT (16b) e aspecto da deiscência 30 dias após o procedimento (16c). 67
- Figura 22 Representação gráfica do ILD dos 49 animais com CCE, conforme o RECIST (p = 0,0001). 68
- Figura 23 Distribuição dos animais de acordo com o estadiamento em cada grupo de tratamento (p = 0,213). 69
- Figura 24 Representação gráfica da sobrevida global dos 52 animais com CCE, conforme o estadiamento (p = 0,67). 69
- Figura 25 O estadiamento clínico proposto para o CCE canino apresentou correlação com a idade (p = 0,028) e com o grau de queratinização (p = 0,05). 70
- Figura 26 O estadiamento clínico proposto para o CCE canino não apresentou correlação significativa com as variáveis: estágio de invasão, padrão de invasão, graduação de Broder, graduação de Bryne, escore de 70

COX-2, subtipo histológico, pleomorfismo nuclear, figuras de mitose por 10 HPF, figuras de mitose bizarras, infiltrado linfoplasmocitário, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67).

- Figura 27 Representação gráfica do ILD dos 52 animais com CCE, conforme a 71
presença ou ausência de metástase ($p = 0,0304$).
- Figura 28 Metástases de cães com CCE cutâneo em locais relacionados com 72
exposição solar. a) Metástase em linfonodo axilar. b) Metástase
pulmonar. c) Metástase óssea.
- Figura 29 Representação gráfica da sobrevida dos 18 animais com metástase de 72
CCE, conforme a localização do tumor, se está em área relacionada
com a exposição solar ou não ($p = 0,0373$).
- Figura 30 Representação gráfica da sobrevida dos 18 animais com metástase de 73
CCE, conforme o número de sessões de EQT ($p < 0,0001$).
- Figura 31 Representação gráfica da sobrevida global dos 37 animais com CCE, 75
conforme a graduação histopatológica ($p = 0,03$).
- Figura 32 Os tumores em locais relacionados à exposição solar tiveram total de 76
pontos de Bryne ($p = 0,072$) e graduação de Broder ($p = 0,083$)
marginalmente maiores do que os tumores em locais não relacionados
à exposição solar.
- Figura 33 Os tumores em locais relacionados à exposição solar tiveram valores 77
de padrão de invasão ($p = 0,018$) e de pleomorfismo nuclear ($p =$
 $0,026$) significativamente maiores do que os tumores em locais não
relacionados à exposição solar.
- Figura 34 Representação gráfica do ILD dos 27 animais com CCE, conforme o 77
estágio de invasão ($p < 0,0001$).
- Figura 35 Avaliação dos tumores em locais relacionados com a exposição solar 78
ou não, com relação a grau de queratinização, figuras de mitose por 10
HPF, infiltrado linfoplasmocitário, estágio de invasão, graduação de
Bryne, número de vasos por campo (CD31), escore de COX-2, taxa de
proliferação (ki-67) e subtipo. Não houve significância estatística para
essas variáveis.

Figura 36	Avaliação da correlação do número de figuras de mitose com a média de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD31) e com o escore de COX-2.	79
Figura 37	Avaliação da correlação do número de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD31) com o escore de COX-2 e com a taxa de proliferação (avaliado pela marcação com ki-67).	79
Figura 38	Avaliação da correlação do escore de COX-2 com a taxa de proliferação (avaliado pela marcação com ki-67).	79
Figura 39	Os tumores de subtipo convencional tiveram valores significativamente menores de ki-67 ($p = 0,078$) e figuras de mitose ($p = 0,020$) do que os tumores de outros subtipos.	83
Figura 40	Avaliação da correlação do subtipo histológico com o escore de COX-2 e com a média de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD-31).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico para o carcinoma de células escamosas (adaptado de Bukhari et al., 2015)	43
Tabela 2	Informações individuais de 54 cães com diagnóstico de carcinoma de células escamosas	48
Tabela 3	Gradação de Bryne (Negamine et al., 2017)	50
Tabela 4	Relação de anticorpos primários	51
Tabela 5	Frequência (número e porcentagem) de animais tratados de acordo com o grau histológico ($p > 0.05$)	75

LISTA DE ABREVIACOES

- AgNOR – Argyrophilic nucleolar organiser region (região organizadora nuclear argirofílica)
- ALT – Alanina aminotransferase
- AST – Aspartato aminotransferase
- CCE – Carcinoma de células escamosas
- COX – Cicloxigenase
- DE – Doença estável
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DP – Doença progressiva
- EQT – Eletroquimioterapia
- FA – Fosfatase alcalina
- GGT – Gama-glutamyl-transferase
- HE – Hematoxilina-eosina
- HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- HPF – *High powerfield*
- HPV – *Human papillomavirus* (papilomavírus oncogênico humano)
- HR – *Hazard ratio* (razão de risco)
- HV-UFGM – Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
- Hz – Hertz
- IC – Intervalo de confiança
- IL-1 – Interleucina-1
- ILD – Intervalo livre de doença
- ILV – Invasão linfovascular
- iMVD – *Intratumoral microvessel density* (densidade de microvasos intratumoral)
- IPN – Invasão perineural
- MHC – *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
- MNA – *Mean nuclear area* (área nuclear média)
- MNP – *Mean nuclear perimeter* (perímetro nuclear médio)

MP – Membro pélvico

MT – Membro torácico

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen* (antígeno nuclear da célula em proliferação)

PG – Prostaglandina

PGE2 – Prostaglandina E2

RC – Resposta completa

RECIST – *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos)

RO – Resposta objetiva

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

RP – Resposta parcial

SRD – Sem raça definida

SOP – *Standard operating procedure* (protocolo operacional padrão)

TAI – *Tumor-associated inflammation* (inflamação associada ao tumor)

TNF – *Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

UV – Ultravioleta

UV-B – Ultravioleta B

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. Carcinoma de células escamosas	21
3.1.1. Fatores prognósticos	22
3.1.2. Fatores preditivos	29
3.1.3. Inflamação e carcinogênese	30
3.1.4. Radiação ultravioleta	33
3.1.5. Fatores de risco	35
3.2. Eletroquimioterapia	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Seleção dos casos de carcinoma de células escamosas	41
4.2. Estadiamento clínico	42
4.3. Formulações das drogas	42
4.4. Protocolos de tratamento	43
4.5. Análise histopatológica	47
4.7. Avaliação da resposta, intervalo livre de doença e sobrevida específica	53
4.8. Análise estatística	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. Critérios clínicos	56
5.2. Critérios histopatológicos e imuno-histoquímicos	74
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. PRODUTIVIDADE NO PERÍODO DO DOUTORADO	120
8.1. Atividades e produção científica relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia	120
8.2. Atividades e produção científica não relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia	120
9. ANEXOS	122
9.1. Anexo 1 – Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFMG	122

9.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais	123
9.3. Anexo 3 – Distribuição das raças de acordo com o tratamento	126

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida dos animais de companhia está aumentando e, com isso, também a prevalência do câncer nestes animais, já que geralmente é uma doença de animais idosos. O câncer é a principal causa de mortalidade dos animais de companhia e os proprietários estão buscando, cada vez mais, tratamentos oncológicos adequados para que seus animais tenham maior sobrevida com boa qualidade de vida (Withrow et al., 2013).

A pele constitui o local mais frequente para o aparecimento das neoplasias no cão, e é responsável por aproximadamente um terço de todos os tumores encontrados nesta espécie. O carcinoma de células escamosas (CCE) é responsável por 3,5% dos tumores cutâneos no cão (Brodey, 1970), sendo localmente invasivo na maioria dos casos e frequentemente caracterizado por ulceração superficial, com margens endurecidas. O potencial metastático é baixo (Brodey, 1970; Lascelles et al., 2000).

A luz ultravioleta (UV) pode causar danos diretos aos queratinócitos, produzindo mutações e resultando na expansão da população de células mutadas. O resultado é o dano actínico, que é uma lesão inicial. Com a contínua exposição à luz solar, o CCE pode se desenvolver, associado com outras lesões de dermatite solar. Nos cães, as placas actínicas são mais comuns na pele clara e glabra das axilas, flanco, abdômen ventral e áreas laterais das extremidades (Werner, 2014). Não há dados sobre a incidência de CCE em cães no Brasil; mas como, em geral, a temperatura é elevada em quase todo o território, pode-se esperar uma incidência alta, principalmente nos animais de pele e pelos brancos (IBGE, 2015).

Oncologistas humanos e veterinários estão cientes da dificuldade de se conseguir controle local dos tumores em pacientes oncológicos com tumores sólidos. Diagnóstico tardio, testes de triagem inadequados e início súbito de neoplasias de crescimento rápido, frequentemente frustram os esforços do clínico de curar as neoplasias malignas (Spugnini et al., 2016). Os tratamentos para o câncer podem ser divididos em categorias diferentes baseadas nos seus objetivos e modo de ação. Muito frequentemente, diferentes tipos de tratamento são usados em associação, simultânea ou sequencialmente. Em geral, são três modalidades principais, cirurgia e radioterapia

(tratamento local) e quimioterapia (tratamento sistêmico) (Sersa et al., 2006). Quimioterapia é usualmente combinada com cirurgia e radioterapia de forma adjuvante para as neoplasias com alta tendência de recidiva e metástase. Em casos selecionados, a quimioterapia pode ser adotada em uma conduta neoadjuvante para maximizar a possibilidade de erradicar a lesão (Spugnini et al., 2016).

A cirurgia é a modalidade de tratamento local mais comumente utilizada para a maioria das neoplasias, pois ainda é o tratamento mais eficaz quando bem planejada e se obtém margens cirúrgicas limpas. Além disso, apresenta várias vantagens sobre outros tratamentos, como a possibilidade da avaliação histopatológica das margens e disponibilidade em várias clínicas (Lana, 1997). No entanto, quando os casos são diagnosticados em um estadio avançado e há múltiplas lesões e/ou invasão da neoplasia aos tecidos adjacentes (subcutâneo, fáscia, cartilagem, osso) pode ocorrer uma resposta ruim à cirurgia, já que tumores grandes são difíceis de excisar com margens adequadas (Rogers, 1995). Outro ponto limitante que dificulta o uso de terapias agressivas para se conseguir controle local em pacientes com câncer é o custo biológico pago para se atingir este objetivo. Muitos pacientes têm que se submeter a cirurgias desfigurantes ou mutilantes (Spugnini et al., 2016).

A eletroquimioterapia (EQT) consiste na quimioterapia seguida da eletroporação do tumor para aumentar a entrada do fármaco nas células (Sersa et al., 2003a). A eletroporação, tratamento com campo elétrico pulsado (*pulsed electric field treatment* ou *PEF treatment*) ou eletropulsão, é o processo de expor células em suspensão ou tecido a pulsos elétricos (Cemazar et al., 2018). O princípio básico da eletroporação é que os pulsos de campo elétrico promovem uma reorganização da membrana celular mediada eletricamente (os chamados “eletroporos” ou “defeitos permeáveis transientes”). Isto é um evento localizado na superfície da célula, induzido quando a força do campo local excede um limiar crítico. Moléculas polares podem, então, atravessar a membrana (Cemazar et al., 2008). A eletroporação da membrana plasmática é obtida se a célula for submetida a um campo elétrico suficientemente alto. Isto depende das características dos pulsos elétricos e da sua distribuição no tecido, o que é controlado pela geometria dos eletrodos e tecido (Sersa et al., 2006).

A eletroporação facilita o transporte de fármacos através da membrana celular apenas para moléculas pobremente ou não penetrantes, portanto, os fármacos candidatos

a serem usados na EQT são limitados àqueles que são hidrofílicos ou que tenham sistemas limitados de transporte na membrana (Sersa et al., 2006; Sersa et al., 2008a). Um fármaco não penetrante é uma molécula que não consegue se difundir através da membrana plasmática devido ao seu tamanho e propriedades físico-químicas (Mir, 2006). Como os fármacos não conseguem entrar nas células não eletroporadas, há diminuição ou ausência de efeitos colaterais sistêmicos (Marty et al., 2006).

Com relação ao procedimento, a EQT é fácil e rápida de realizar. Os requerimentos são uma sala adequada para a preparação e tratamento do paciente e um aparelho eletroporador (Sersa et al., 2003a). O tratamento é realizado sob anestesia sistêmica (Mir et al., 2006). Após o tratamento, os pacientes não precisam de atenção ou medicação específicos, apenas os cuidados de pós-operatório convencionais, como analgésicos e anti-inflamatórios (Sersa et al., 2003a).

A EQT é efetiva para neoplasias sólidas de qualquer tipo histológico e vem sendo usada clinicamente na medicina humana desde 2005 e na medicina veterinária o primeiro relato é de 1997 (Mir et al., 1997; Marty et al., 2006; Madero e Pérez, 2011; Cunha et al., 2017). Na literatura, a EQT como um tratamento oncológico local mostra respostas objetivas de 70 a 94% em lesões cutâneas, subcutâneas e mucocutâneas primárias e metastáticas apresentando poucos efeitos colaterais locais e sistêmicos (Mir et al., 1997; Marty et al., 2006; Quaglini et al., 2008; Kodre et al., 2009; Spugnini et al., 2009; Silveira et al., 2010; Spugnini et al., 2010; Sersa et al., 2012).

A EQT já foi usada isoladamente no tratamento de tumores perianais (Tozon et al., 2005), mastocitomas (Kodre et al., 2009), melanomas e carcinomas de células escamosas (Silveira et al., 2010) e foi usada em associação com a cirurgia com excelente controle local em mastocitomas, sarcomas de tecido mole e carcinoma de saco anal em cães (Spugnini et al., 2006; Spugnini et al., 2008a; Spugnini et al., 2008b).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar e comparar a sobrevida específica e intervalo livre de doença de cães portadores de CCE atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da

Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM) submetidos a tratamento com eletroquimioterapia associada ou não a cirurgia baseado no estadiamento da doença.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o uso da EQT no tratamento de cães com carcinoma de células escamosas baseado no estadiamento clínico dos pacientes.
- Avaliar a sobrevida específica e o intervalo livre de doença em pacientes com carcinoma de células escamosas submetidos a EQT associada ou não a cirurgia baseado no estadiamento de doença.
- Avaliar o escore de COX-2 dos carcinomas de células escamosas de cães, correlacionando com estadiamento e sobrevida específica.
- Avaliar a densidade de microvasos em carcinomas de células escamosas de cães, correlacionando com estadiamento e sobrevida específica.
- Avaliar o índice de proliferação celular (Ki-67) em carcinomas de células escamosas em cães, correlacionando com estadiamento e sobrevida específica.
- Correlacionar estadiamento de doença com graduação histológica e sobrevida específica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Carcinoma de células escamosas

A pele constitui o local mais frequente para o aparecimento das neoplasias no cão, e é responsável por aproximadamente um terço de todos os tumores encontrados nesta espécie. O CCE é o segundo tumor cutâneo mais frequente no cão e acomete animais entre 10 e 11 anos (Walder, 1995; Goldschmidt e Shofer, 1998; Que et al., 2018). O CCE é um tumor maligno que pode surgir na epiderme ou mucosa (Almeida et al., 2001). É localmente invasivo na maioria dos casos. O potencial metastático é baixo e é frequentemente caracterizado por ulceração superficial, com margens endurecidas (Lascelles et al., 2000).

3.1.1. Fatores prognósticos

Os termos prognóstico e preditivo têm sido usados em inúmeras publicações para descrever relações entre biomarcadores e resultados clínicos; no entanto, estes termos raramente são definidos e frequentemente são usados de forma intercambiável. Neste trabalho, serão utilizadas as definições propostas por Clark et al. (2006). Um fator prognóstico é uma medida que está associada com o resultado clínico na ausência de terapia, ou com o uso da terapia padrão que os pacientes provavelmente receberão (Clark, 2008). São as avaliações disponíveis no momento do diagnóstico que estão associadas com o intervalo livre de doença (ILD) ou com a sobrevida. Frequentemente podem ser usados para prever o comportamento natural de um tumor (Omene e Tiersten, 2010). Um grupo controle de um teste clínico randomizado é o ideal para se avaliar a importância prognóstica de um biomarcador (Clark, 2008).

O fator prognóstico mais importante em todas as neoplasias humanas é o estadiamento clínico no momento do diagnóstico, que é a extensão anatômica da doença. Usando avaliações que indicam a disseminação anatômica do tumor, é possível classificar cada tumor em uma categoria que está associada com um resultado diferente (Ruffini et al., 2018).

Inconsistências entre características histopatológicas e comportamento biológico ou prognóstico foram documentados em vários tumores caninos. Portanto, um número considerável de marcadores moleculares tem sido aplicado para diagnosticar e prever o prognóstico das doenças neoplásicas nos cães (Mukaratirwa, 2005).

A incidência do CCE cutâneo humano tem aumentado, com as maiores taxas encontradas em países com alta exposição à luz ultravioleta. Este fato associado ao potencial metastático do tumor justifica a necessidade de sistemas de prognóstico suficientes para avaliar adequadamente o risco de disseminação tumoral (Peter e Haustein, 2000).

Gradação e subtipo histológico do CCE, presença de invasão perineural (IPN) e invasão linfovascular (ILV), localização anatômica, formato e espessura do tumor, idade do paciente no momento do diagnóstico, estadiamento clínico e inflamação associada ao tumor são considerados fatores prognósticos importantes para o CCE oral humano e canino (Barnes et al., 2005; Pereira et al., 2007; Silveira et al., 2007; Arduino et al.,

2008; Regezi et al., 2008; Larsen et al., 2009; Chatzistamou et al., 2010; Liao et al., 2010; Nemeč et al., 2012; de Matos et al., 2012; Fulton et al., 2013). Para o CCE cutâneo canino, fatores prognósticos bem definidos ainda são escassos.

3.1.1.1. Fatores prognósticos clínicos

O CCE canino pode ter um comportamento completamente diferente, dependendo da sua localização. CCE cutâneo é localmente invasivo, mas tem um potencial metastático baixo. Em contraste, CCE do dígito tem uma maior tendência a recidiva e metástase (Weiss e Frese, 1974; Maiolino et al., 2002). O resultado após tratamento geralmente é bom para CCE oral não-tonsilar, quando comparado com o CCE oral tonsilar que tem uma alta probabilidade de metástase e, portanto, um prognóstico ruim (Liptak e Withrow, 2013; Fulton et al., 2013). CCE bem diferenciado na língua é considerado como tendo o melhor prognóstico dos CCE orais. Em geral, no entanto, CCE na língua tem um prognóstico reservado, com um alto risco de metástase, especialmente se as lesões estão localizadas na base da língua (Liptak e Withrow, 2013). Os tumores linguais caudais tendem a ser notados mais tardiamente e a excisão cirúrgica com margens adequadas é mais difícil (Evans e Shofer, 1988; Dunning, 2003; Nemeč et al., 2012). A taxa de sobrevida após um ano varia de 84 a 91% e a taxa de metástase varia de 3 a 36% em cães após a ressecção cirúrgica de CCE oral (Kosovsky et al., 1991; White, 1991; Wallace et al., 1992; Clarke et al., 2011).

No estudo realizado por Fulton et al. (2013) com CCE oral canino, a idade no momento do diagnóstico não foi significativamente associada com a sobrevida. No entanto, a sobrevida média global e a taxa de sobrevida após 1 ano para os cães do estudo diminuíram à medida que a idade aumentou. Estes achados foram consistentes, mesmo quando os cães que morreram ou foram eutanasiados por motivos não relacionados à doença foram censurados. Apesar de não ter tido significância estatística, o fato de o tempo de sobrevida ter diminuído à medida que a idade do paciente aumentava está mais provavelmente associado com fatores como comorbidades ou a percepção do tutor ou do veterinário de risco cirúrgico, o que pode direcionar o tratamento de pacientes idosos para tratamentos paliativos ao invés de curativos (Fulton et al., 2013).

Nos pacientes humanos com CCE oral, o estadió clínico é considerado o indicador prognóstico padrão (Regezi et al., 2008; Arduino et al., 2008). Foi demonstrado que a taxa de recorrência local dobra (de 7,4% para 15,2%) e a taxa de metástase triplica (de 9,1% para 30,3%) quando o diâmetro do tumor é maior do que 2 cm em CCE cutâneo humano (Rowe et al., 1992). No estudo de Fulton et al. (2013) que avaliou 31 casos de CCE oral canino, o estadiamento clínico não se correlacionou com a sobrevivida. O exame citológico ou histológico dos linfonodos só foi realizado quando os linfonodos se mostravam alterados à palpação ou em exames de imagem e nenhum dos cães que tinha linfonodos normais à palpação no momento do diagnóstico do CCE foi subsequentemente diagnosticado com metástase para estes linfonodos.

3.1.1.2. Fatores prognósticos histopatológicos

Normalmente os CCE mais comuns são separados em três categorias: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. Os subtipos incomuns incluem os CCE acantolíticos (adenoide e pseudogranular), de células claras, de células alongadas, do tipo ceratoacantoma, desmoplásico (neurotrópico), verrucoso, produtor de mucina (adenoescamoso, mucoepidermóide) e o carcinoma que surge a partir da doença de Bowen (Nappi et al., 1989; Kirkham, 1997; Petter e Haustein, 2000; Khanna et al., 2002; Gross et al., 2009). Exceto os do tipo verrucoso e o produtor de mucina, as demais formas já foram relatadas em cães (Gross e Brimacombe, 1986; Goldschmidt e Shofer, 1998; Goldschmidt et al., 1998; Scott et al., 2001). Em seres humanos, as variantes acantolítica, de células alongadas, desmoplásica e a produtora de mucina parecem ser mais agressivas que as outras formas mais comuns de CCE (Nappi et al., 1989; Kirkham, 1997; Petter e Haustein, 2000; Khanna et al., 2002).

O CCE convencional bem ou moderadamente diferenciado é o subtipo mais comum na mucosa e pele dos cães (Gross et al., 2009; Nemeč et al., 2012). Apesar de ainda ser um pouco controverso, o CCE bem diferenciado ou de baixo grau parece ter um comportamento biológico de curso menos agressivo do que tumores pouco diferenciados (Pereira et al., 2007; Arduino et al., 2008; Larsen et al., 2009).

O grau de diferenciação histopatológica é um critério prognóstico importante e útil para CCE cutâneo humano (UICC, 1997). Em uma grande revisão de literatura, Rowe et al. (1992) mostraram um aumento maior que duas vezes na taxa de recorrência

local (13,6% para 28,6%) e um aumento de mais de três vezes na taxa de metástase (9,2% para 32,8%) para carcinomas pobremente diferenciados (graus 3 e 4 de Broder) quando comparados com tumores bem ou moderadamente diferenciados de grau 1 e 2 de Broder (Goldschmidt e Goldschmidt, 2017). No entanto, também é sabido que lesões bem diferenciadas são capazes de metastatizar, o que enfatiza que não se pode basear o prognóstico em apenas um critério para o CCE cutâneo (Rowe et al., 1992; Peter e Haustein, 1998).

O fator histológico de maior predição para metástase do CCE em seres humanos é a profundidade do tumor. Lesões com menos de 2 mm de profundidade não geram metástase. No entanto, as lesões com mais de 5 ou 6 mm de profundidade, com invasão muscular, cartilaginosa ou óssea, apresentam um potencial metastático de aproximadamente 20% (Khanna et al., 2002; Gross et al., 2009).

A graduação nuclear, que expressa o grau de diferenciação nuclear das células neoplásicas (Black e Speer, 1957) foi apresentado como um fator diagnóstico e prognóstico importante, mas frequentemente carece de objetividade e reprodutibilidade entre diferentes patologistas (Baak et al., 1982). Portanto, a tendência atual é quantificar características nucleares por métodos morfométricos que são objetivos e reproduzíveis (Sorensen, 1992). Estudos com tumores em humanos demonstraram o valor do método morfométrico no prognóstico e como um indicador do potencial de malignidade (Tosi et al., 1986; De Rosa et al., 1990; Mitmaker et al., 1991; Pienta e Coffey, 1991; Bundgaard et al., 1992). A morfometria nuclear computadorizada pode ser rapidamente realizada por meio da análise microscópica convencional, sem utilizar reagentes para imuno-histoquímica ou outros métodos de análise caros. O estudo de Maiolino et al. (2002) avaliou a relação entre a graduação histológica e a área nuclear média (MNA, *mean nuclear area*) e o perímetro nuclear médio (MNP, *mean nuclear perimeter*) de CCE cutâneo em cães. O estudo encontrou uma associação significativa entre grau histológico e MNA e grau histológico e MNP. Estes resultados indicam que a análise da morfometria nuclear é um método simples e reprodutível que pode ser usado como um critério diagnóstico e prognóstico objetivo para o CCE cutâneo canino (Maiolino et al., 2002).

A inflamação associada ao tumor (TAI – *tumor-associated inflammation*) já foi associada a tumores bem diferenciados e pouco diferenciados (Vieira et al., 2008;

Nemec et al., 2012). De qualquer forma, um infiltrado inflamatório significativo é usualmente encontrado ao redor das ilhas de células tumorais invasoras no CCE humano (Regezi et al., 2008), e a resposta imune celular parece ser o principal mecanismo de defesa no CCE (Vieira et al., 2008; Chatzistamou et al., 2010; Nemec et al., 2012). No entanto, o papel da inflamação associada ao CCE na formação de um prognóstico ainda é controverso na oncologia humana (Pereira et al., 2007; Vieira et al., 2008; Chatzistamou et al., 2010; Nemec et al., 2012).

No estudo retrospectivo de Williams et al. (2001), a taxa de sobrevivência caiu de 86% para 5% quando invasão perineural foi observada em pacientes humanos com CCE ou carcinoma de células basais (Williams et al., 2001). No estudo de Fulton et al. (2013), apenas 16% dos cães com CCE oral não-tonsilar apresentavam invasão perineural ou linfovascular. Os autores sugerem que invasão perineural e/ou linfovascular podem não ter sido identificadas pelo exame histopatológico, ou que apenas tumores agressivos desenvolvem estas alterações.

Ciclooxigenase (COX) é uma classe de enzimas catalíticas relacionada à formação de mediadores inflamatórios. São enzimas chave na conversão do ácido aracônico em prostaglandinas e existem em duas isoformas, COX-1 e COX-2 (Beam et al., 2003). COX-1, a isoforma constitutiva, é expressa na maioria dos tecidos. COX-2, a isoforma induzível e um potente catalizador da inflamação, é ativada em resposta a citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (Vos et al., 2005). A COX-2 pode contribuir patologicamente para o desenvolvimento do câncer através de vários mecanismos, incluindo o aumento na proliferação celular, inibição da apoptose, alteração no metabolismo de carcinógenos ou modulação do sistema imune (Fisher, 1997).

No câncer, tanto na espécie humana, quanto em outras espécies animais, a expressão de COX-2 pode estar relacionada à sua ação nas fases de promoção e progressão tumoral, sendo, portanto, considerada um fator prognóstico desfavorável para vários tipos histológicos (Mutsaers, 2013). A COX-2 e seus produtos são capazes de manter a resposta inflamatória local, contribuindo para uma das fases mais importantes e iniciais da carcinogênese, a promoção. A sua ação na progressão tumoral pode ser evidenciada pela inibição da apoptose (aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas homólogas de células B, como o Bcl-2), aumento da proliferação celular e

angiogênese (aumento da produção do fator de crescimento endotelial vascular), mas também pelo aumento da invasividade tumoral ao provocar a diminuição da adesão celular e destruição da membrana basal (Costa et al., 2002; Mutsaers, 2013).

A expressão de COX-2 foi observada em várias neoplasias em animais e humanos, estando implicada na carcinogênese. COX-2 tem um papel importante em vários tumores malignos através da conversão do ácido aracdônico em prostaglandina E-2 (PGE-2) (Mohammed et al., 2001). A PGE-2 é uma grande mediadora da proliferação celular tumoral, resistência à apoptose, angiogênese e invasão através da produção de metaloproteínas (Lupulescu, 1996). Alguns tumores com expressão elevada de COX-2, descritos na literatura humana ou veterinária, são CCE (Almeida et al., 2001; Itoh et al., 2003; Bardagi et al., 2012; Cunha et al., 2016), tumores de mama (Lavalle et al., 2009), carcinoma de células de transição (Knapp et al., 2002; Yu et al., 2003), carcinoma hepatocelular (Kern et al., 2002) e tumores intestinais (Arbabi et al., 2001; Husain et al., 2002). Portanto, a avaliação imuno-histoquímica de COX-2 é um fator prognóstico e um potencial alvo para intervenção terapêutica e preventiva para estes tipos de tumores (Vos et al., 2005; Cunha et al., 2016).

Angiogênese é o desenvolvimento de novos capilares, vindos de um vaso sanguíneo pré-existente, processo esse comum na inflamação crônica e reparo de feridas (Folkman e Shing, 1992; Cotran et al., 2000). Angiogênese tumoral é a habilidade de células neoplásicas de induzir a formação de novos vasos e é um pré-requisito para o crescimento tumoral acima de 2 mm e metástase (Morrison, 1998; Maiolino et al., 2001). Para um tumor desenvolver um fenótipo metastático é necessário primeiro recrutar e sustentar o seu próprio suprimento sanguíneo. Tumores incapazes de induzir angiogênese permanecem microscópicos (Folkman, 1974). Entre os fatores angiogênicos conhecidos, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) parece ter um papel central no processo de neovascularização (Folkman, 1990). Níveis altos de fatores angiogênicos e evidência histológica de aumento na neovascularização do tumor através da mensuração da densidade de microvasos têm valor prognóstico importante na medicina humana para vários tumores sólidos e na medicina veterinária para tumores de mama (Sorenmo, 2003; Lavalle et al., 2009).

A angiogênese pode ser avaliada usando-se imuno-histoquímica para avaliar a densidade de microvasos intratumoral (iMVD – *intratumoral microvessel density*) e a expressão de VEGF. Os estudos ainda são controversos entre a relação da iMVD e o prognóstico em tumores humanos, incluindo o CCE (Weidner et al., 1993; Gasparini et al., 1993; Dray et al., 1995; Zatterstrom et al., 1995; Axelsson et al., 1995; Siitonen et al., 1995; Morphopoulos et al., 1996; Fox, 1997; Weidner, 1998; Weidner, 1999; Maiolino et al., 2001). As discrepâncias com relação ao significado prognóstico da angiogênese nos tumores pode ser explicada pelo fato de que vários anticorpos podem ser usados para marcar vasos em um tecido, e a escolha do anticorpo pode influenciar o número de microvasos disponíveis para contagem (Maiolino et al., 2001). CD31 é uma glicoproteína que participa na adesão entre plaquetas e células endoteliais. O antígeno CD31 é tido como um marcador útil de células endoteliais na medicina humana porque é constantemente expresso em todos os tipos de células endoteliais e é expresso apenas por células endoteliais, plaquetas e macrófagos. Além disso, um anticorpo monoclonal comercial (JC70) está disponível e reage com o antígeno CD31 em seções de tecido fixadas em formol e preservadas na parafina (Parums et al., 1990; Page et al., 1992; Kuzu et al., 1993; Ferrer et al., 1995).

No estudo de Maiolino et al. (2001), a iMVD média aumentou progressivamente do CCE de grau 1 de Broder para o CCE pouco diferenciado de grau 4 de Broder na pele de cães (Goldschmidt e Goldschmidt, 2017). Isto pode indicar que a avaliação da iMVD pode fornecer mais um critério prognóstico para a avaliação de malignidade e potencial de crescimento dos CCE cutâneos caninos (Maiolino et al., 2001). No estudo de Maiolino et al. (2000), expressão imuno-histoquímica de VEGF foi observada em todos os CCE cutâneos caninos analisados, mas estava ausente ou fraca em tumores de células basais, que tem um comportamento menos agressivo. Estes resultados sugerem que a expressão de VEGF está relacionada com a malignidade intrínseca e o potencial de crescimento dos tumores (Maiolino et al., 2000).

A proliferação celular é o aumento no número de células após o término do ciclo celular. A taxa de proliferação de células tumorais é um determinante importante da agressividade de um tumor e, portanto, um fator prognóstico essencial. Muitos métodos diferentes foram desenvolvidos para detectar a proliferação celular em tumores. Estes métodos variam não só no que eles detectam, mas também nas fases do ciclo celular que

a célula é marcada. Portanto, estes métodos frequentemente produzem resultados diferentes. Os métodos usados para estimar a proliferação das células tumorais incluem métodos mais tradicionais como a contagem do índice mitótico e, recentemente, citometria de fluxo e marcação histoquímica e imuno-histoquímica. O marcador de proliferação histoquímico mais comumente utilizado é o da região organizadora nuclear argirofílica (AgNOR – *argyrophilic nucleolar organiser region*), e os marcadores imuno-histoquímicos mais comumente usados são o antígeno nuclear da célula em proliferação (PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*) e o antígeno Ki-67 (Mukaratirwa, 2005).

O estudo de Sakai et al. (2001) avaliou a expressão de Ki-67 em tumores de pele caninos. O CCE apresentou maior expressão de Ki-67 do que as demais neoplasias benignas da pele. Auler et al. (2014) relataram um CCE cutâneo canino bem diferenciado, mas de estadió avançado (invasão de estruturas adjacentes e metástase para o linfonodo regional) que apresentou elevado índice mitótico (Ki-67 de 30%). Poggiani et al. (2012) avaliaram a expressão de Ki-67 em lesões cutâneas de dano actínico (lesão pré-neoplásica) e CCE cutâneo em cães e não encontraram diferença nos valores entre os dois grupos.

3.1.2. Fatores preditivos

Um fator preditivo é uma medida que está associada com a resposta ou falha em responder a um determinado tratamento. A resposta pode ser definida usando qualquer dos pontos finais de avaliação comumente usados em testes clínicos (p. ex. ILD, sobrevida global). Um fator preditivo implica em um benefício diferencial da terapia que depende do status do biomarcador preditivo. Em termos estatísticos, isto constitui uma interação entre benefício do tratamento e status do biomarcador que é mais bem avaliado em um ensaio clínico randomizado com um grupo controle (Clark, 2008).

A taxa de proliferação celular das células neoplásicas é importante para o crescimento e invasão tumoral e metástase. Portanto, a taxa de proliferação pré-operatória ou pré-tratamento de um tumor pode estar correlacionada com a resposta à terapia. Mais estudos foram realizados com o valor diagnóstico e prognóstico dos marcadores de proliferação do que com o valor preditivo destes marcadores. Um bom

indicador prognóstico pode não ser um bom fator preditivo para terapia e vice-versa (Mukaratirwa, 2005).

A expressão de COX-2 é um potencial fator preditivo devido à possível associação de inibidores seletivos de COX-2, como firocoxib, em terapias adjuvantes. Apesar da duração do tratamento ainda ser empírica, sabe-se que deve ser prolongada, já que os inibidores seletivos de COX-2 são capazes de inibir a ativação do receptor, mas não afetam a expressão do mesmo (Lavalle et al., 2009). De acordo com Lavalle et al. (2012), inibidores seletivos de COX-2 apresentam benefícios terapêuticos a pacientes com tumores que apresentam escores elevados de COX-2 (escores 6 a 12 são considerados elevados, em uma escala que varia de zero a 12). No relato de Auler et al. (2014), o tratamento com firocoxib foi baseado no escore 6 de expressão imunohistoquímica de COX-2 de um CCE cutâneo bem diferenciado canino, e foi relacionado com um maior ILD.

3.1.3. Inflamação e carcinogênese

O desenvolvimento do câncer não depende apenas de alterações genéticas ou epigenéticas nas células acometidas. O tumor possui células neoplásicas que são suportadas pelo estroma do tecido onde se originaram, no qual existem células de defesa que procuram eliminar o clone anômalo (Brasileiro Filho et al., 2006). Uma ligação clínica entre inflamação e câncer fornecida por estudos epidemiológicos indica que uma grande variedade de desordens inflamatórias crônicas, infecções crônicas e irritações mecânicas e químicas crônicas predispõem ao desenvolvimento do câncer (Weitzman e Gordon, 1990; Ness e Cottreau, 1999; Shacter e Weitzman, 2002; Pagano et al., 2004; Thun et al., 2004; Visser e Coussens, 2006).

O microambiente inflamatório é um componente essencial de todos os tumores, incluindo alguns em que uma relação causal direta com a inflamação ainda não tenha sido provada (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010). Apesar do individualismo das células cancerosas, elas interagem com suas congêneres, com a matriz extracelular, com as células do estroma (fibroblastos e mastócitos) e com células de defesa inata e adaptativa (células dendríticas, linfócitos, macrófagos, células polimorfonucleares, eosinófilos). Essa interação implica enviar e receber sinais: é a resultante dessa troca de sinais que vai tornar o ambiente permissivo ou não para a

progressão da neoplasia. Em geral, os carcinógenos induzem lesões não só na célula que origina o câncer, como também no estroma, nele induzindo alterações que também afetam o processo da carcinogênese (Brasileiro Filho et al., 2006).

Mutações em células do estroma de diversos tumores são frequentes, existindo já nas lesões pré-cancerosas. Os leucócitos que infiltram o estroma do tumor aparecem em geral desde as fases iniciais da carcinogênese e produzem muitos fatores de crescimento (citocinas e quimiocinas) que podem influenciar as células da matriz e as próprias células tumorais, além de poder destruí-las. Na verdade, o desenvolvimento do tumor implica que as células neoplásicas consigam se livrar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Células neoplásicas alteram a expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*), reduzindo especialmente as MHC I, o que impede o seu reconhecimento como célula anormal (Brasileiro Filho et al., 2006).

Reação inflamatória também influencia a progressão das neoplasias. A suspeita de relação entre neoplasia e inflamação é antiga, tendo Virchow admitido que os tumores surgiam em tecidos cronicamente inflamados. Sabe-se que a resposta inflamatória pode se acompanhar de sinais e efeitos inibidores da progressão ou mesmo que eliminam o tumor ou, como também se observa com maior frequência, que o tumor usurpa alguns mecanismos inflamatórios e os utiliza para facilitar sua progressão (Brasileiro Filho et al., 2006).

Como a inflamação crônica é um processo complexo e dinâmico, com muitas células e mediadores solúveis envolvidos, múltiplos mecanismos foram identificados através dos quais estados inflamatórios podem promover o desenvolvimento do câncer. Os efeitos modulatórios das células imunes no desenvolvimento do câncer podem ser divididos em efeitos diretos nas células neoplásicas, como indução de dano no ácido desoxirribonucleico (DNA – *deoxyribonucleic acid*) ou regulação parácrina do sinal de transdução dentro da célula neoplásica, e efeitos indiretos no crescimento neoplásico, como ativação da angiogênese, remodelação tecidual e supressão da resposta imune adaptativa antitumoral (Visser e Coussens, 2006).

Células imunes inatas produzem numerosos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas solúveis, assim como vários tipos de proteinases extracelulares ou

associadas à célula, como as metaloproteinases, que tem capacidades pró-inflamatórias, pró-angiogênicas e pró-remodelamento tecidual (Visser e Coussens, 2006).

Citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas liberadas na inflamação, especialmente nas inflamações crônicas, são importantes para estimular a degradação da matriz extracelular, o que favorece a migração das células transformadas, permite a expansão dos tecidos neoplásicos e aumenta a biodisponibilidade de fatores de crescimento e citocinas. As quimiocinas são importantes no recrutamento dos leucócitos que infiltram os tumores, interferem na angiogênese, influenciam na indução da resposta imune adaptativa, agem diretamente sobre a proliferação e a sobrevivência das células tumorais e controlam a motilidade destas. Curiosamente, a expressão dos receptores para quimiocinas está reprimida nos leucócitos que infiltram o tumor, o que explica sua baixa eficiência em induzir efeitos citocidas ou citostáticos contra as células tumorais, ainda que possam continuar produzindo quimiocinas e metaloproteases capazes de facilitar a progressão do tumor. A formação de novos vasos sanguíneos é crítica, já que a expansão do tecido requer suprimento de oxigênio e nutrientes. A ativação da angiogênese e a remodelação tecidual são moduladas pelas células inflamatórias presentes no microambiente tumoral (Coussens e Werb, 2002; Balkwill et al., 2005; Visser e Coussens, 2006; Brasileiro Filho et al., 2006).

Além da ação das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias favorecendo o crescimento do tumor, especialmente nas suas fases iniciais, a inflamação crônica gera espécies de oxigênio e nitrogênio reativos que podem causar danos no DNA de células em proliferação, favorecendo a instabilidade do genoma, condição associada à progressão das neoplasias (Maeda e Akaike, 1998; Ohshima, 2003; Visser e Coussens, 2006, Brasileiro Filho et al., 2006).

A inflamação também aumenta a expressão de COX-2, uma enzima chave na síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico, e há evidência cumulativa de que a maior expressão de COX-2 tem um papel importante na formação de neoplasias (Smith et al., 2000; Cao e Prescott, 2002; Turini e DuBois, 2002; Visser e Coussens, 2006). Em geral, a COX-2 não é expressa em tecidos quiescentes. No entanto, sua expressão é induzida em muitos cânceres (Ristimaki et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2002; Choy e Milas, 2003; Visser e Coussens, 2006). A presença crônica de COX-2 em microambientes (pré-) malignos resulta na produção de prostaglandinas que

sabidamente mediam muitos efeitos, incluindo, mas não limitado à promoção da proliferação enquanto reduz a apoptose, ativação da angiogênese, indução de quimiocinas pró-inflamatórias e supressão de mecanismos de vigilância imunológica (Cao e Prescott, 2002; Visser e Coussens, 2006).

Além disso, a inflamação crônica promove o desenvolvimento do câncer através da supressão das respostas imunes adaptativas antitumorais, permitindo que o tumor escape da vigilância imune do hospedeiro (Visser e Coussens, 2006). Se uma resposta inflamatória vigorosa, com participação de células Th1, acontece no tecido tumoral ou pré-neoplásico, muito provavelmente o tumor não progride e as células pré-cancerosas são eliminadas. A manipulação da resposta imune inata e adaptativa poderá possibilitar no futuro a modulação da inflamação nos tumores de modo a desviá-la para um efeito predominantemente antineoplásico (Brasileiro Filho et al., 2006).

Há muitos mecanismos pelos quais a inflamação contribui para a carcinogênese. Qual mecanismo está envolvido em uma situação em particular vai depender do estágio da progressão neoplásica, do tipo de tumor, do genoma e do *status* imune do paciente e da exposição prévia a terapias. A elucidação dos mecanismos pelos quais o sistema imune participa na formação das neoplasias pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Visser e Coussens, 2006).

3.1.4. Radiação ultravioleta

A evidência para o papel da radiação ultravioleta (UV) no desenvolvimento de tumores de pele em cães é primariamente epidemiológica e sustentada por relatos de cães diagnosticados com um espectro de lesões induzidas pela luz do sol (Hauck e Oblak, 2020).

A radiação UV tem muitos efeitos biológicos na pele que contribuem para a fotocarcinogênese (Halliday, 2005). Baixo nível de exposição aumenta a síntese de vitamina D, que protege de dano genético e carcinogênese (Wong et al., 2004). Alto nível de exposição causa a formação de células queimadas pelo sol, que são células em apoptose. Isto também protege da fotocarcinogênese, já que células mortas não causam câncer. Níveis intermediários de exposição à radiação UV causam supressão da imunidade, mutação gênica e inflamação. Estes três eventos biológicos causam o câncer de pele (Halliday, 2005).

A faixa ativa das radiações UV está entre 200 e 400 nm. Estudos fotoquímicos demonstram que o alvo principal dessa radiação é o DNA, no qual podem ser produzidas várias alterações, sendo a formação de dímeros de timina a mais importante. Trata-se da produção de uma mutação puntiforme, que pode afetar oncogenes ou genes supressores de tumor. Em condições normais essas modificações da molécula de DNA podem ser reparadas eficazmente por sistemas enzimáticos, aparecendo tumores somente quando esses sistemas protetores falham. Além disso, pelo menos em animais, a radiação UV estimula linfócitos T-supressores a inibir a resposta imune, o que também pode favorecer o aparecimento de neoplasias (Brasileiro Filho et al., 2006).

A relação entre a exposição à luz solar ou radiação UV e o subsequente desenvolvimento de câncer de pele é um dos exemplos mais conhecidos de carcinogênese física. Reconhecido por seu papel na indução do CCE em humanos, a luz do sol também tem sido implicada como uma causa de CCE em animais domésticos, uma relação que é fortalecida por uma clara relação dose-resposta mostrada em estudos epidemiológicos e experimentais (Kahn et al., 1994; Buckowski e Wartenberg, 1997; Bukowski et al., 1998; Fu e Cockerell, 2003; Henry, 2013). Em particular, a pele com pouca pigmentação e a exposição crônica ao sol estão associadas com o desenvolvimento de CCE na face, pino e plano nasal de gatos brancos ou parcialmente brancos e pode ter um papel similar em algumas lesões cutâneas de CCE em cães (Hargis, 1981; Lowe et al., 1988; Bukowski et al., 1998; Henry, 2013).

Se um mutagênico, como a luz UV, causa mutações em células da pele e morte celular, ele pode ser tanto um iniciador, como um promotor indireto, por induzir a hiperplasia compensatória de qualquer célula iniciada e que tenha sobrevivido a luz UV (Fig. 1) (Trosko e Tai, 2006).

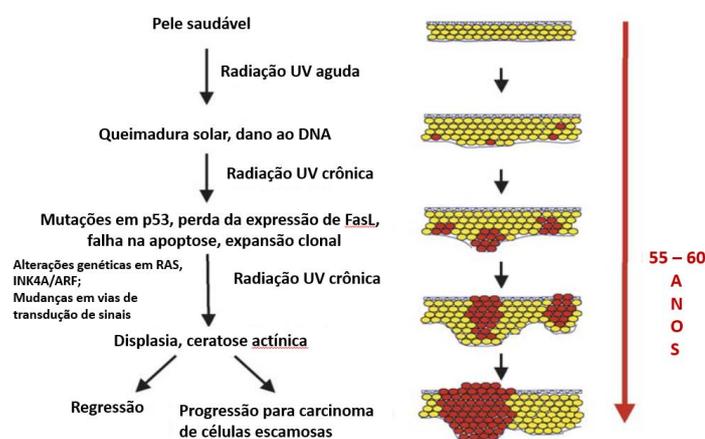


Figura 1 – Modelo de iniciação e progressão do CCE induzido por radiação UV. A radiação UV-B induz dano ao DNA e apoptose nos queratinócitos da epiderme. A geração de fotoprodutos de DNA pela radiação UV-B e defeitos no reparo e replicação do DNA leva ao acúmulo de mutações no gene supressor de tumor p53 nos queratinócitos, perda da expressão do ligante Fas e resistência à apoptose. Com a exposição repetida à radiação UV, células mutantes para p53 sofrem expansão clonal e acumulam mutações em outros genes importantes. Alguns clones se desenvolvem em lesões pré-neoplásicas (dano actínico) e algumas progridem para CCE (Melnikova e Ananthaswamy, 2005).

A luz UV aumenta o fluxo sanguíneo e a infiltração de leucócitos, como macrófagos e neutrófilos na pele, observado clinicamente como inflamação (Halliday, 2005). A radiação UV também induz a peroxidação lipídica, o que aumenta a produção de prostaglandinas (PG), incluindo PGE2, o que causa inflamação da pele (Hruza e Pentland, 1993). PGE2 é produzida a partir do ácido aracdônico pela COX-2. Acredita-se que isto acontece devido ao aumento da atividade da fosfolipase causado pela radiação UV, promovendo uma maior disponibilidade de ácido aracdônico para produção de PG (Kangrotondo et al., 1993). Outros mediadores induzidos pela luz UV, como fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*) e interleucina-1 (IL-1) também contribuem para a inflamação induzida por radiação UV (Grewe et al., 1993). As células inflamatórias por sua vez produzem espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) que causam mais danos aos lipídeos, proteínas e DNA. Portanto, o dano oxidativo induzido por radiação UV aos lipídeos inicia uma cascata de eventos que resulta em inflamação, o que causa ainda mais estresse de oxigênio reativo na pele. Como ROS das células inflamatórias podem causar mutações genéticas, parece uma hipótese razoável de que a inflamação induzida pela radiação UV resulta em dano genético, o que contribui para a fotocarcinogênese induzida diretamente pela exposição à luz UV (Halliday, 2005).

3.1.5. Fatores de risco

Os fatores de risco mais significativos que resultam em CCE cutâneo em humanos incluem a exposição ao sol, idade, pele clara e imunossupressão. CCE cutâneo é mais comum em pessoas brancas e é mais comum em homens do que em mulheres (proporção de 3:1). A incidência aumenta com a idade, com a idade média de aparecimento de 60 anos. A localização geográfica também influencia no desenvolvimento do CCE. O aumento de 1-kJ/m² de radiação UV ambiente é

responsável por um aumento de 95% na incidência de CCE em pessoas brancas. Essa unidade de medida seria equivalente à diferença entre Barcelona e Copenhague (Xiang et al., 2014).

Apesar de ser menos comum em pacientes hispânicos, negros ou asiáticos, o CCE é o câncer de pele mais comum nestas populações (Rowe et al., 1992). Nos pacientes negros, o CCE resulta em uma maior taxa de mortalidade (18%) devido ao atraso no diagnóstico e ao aparecimento de CCE em locais de trauma ou cicatriz prévios, o que traz um pior prognóstico (Mora e Perniciaro, 1981).

O papilomavírus oncogênico humano (HPV – *human papillomavirus*) pode ser associado com CCE cutâneo, particularmente o periungueal e o anogenital. Os tipos 16 e 18 do HPV têm as proteínas E6 e E7 que previnem apoptose e permitem a replicação contínua do DNA viral pela regulação do p53 e retinoblastoma, respectivamente (Zur Hausen, 2009). Os CCE de pacientes transplantados frequentemente também expressam HPV dos tipos 8, 9 e 15, sugerindo um papel potencial do HPV no desenvolvimento de CCE entre estes pacientes (Dang et al., 2006).

A associação entre o papilomavírus oral canino e o desenvolvimento de papilomas orais tem sido estudado desde 1950 (Chambers e Evans, 1959). A associação entre infecção viral e o desenvolvimento de CCE evoluiu de uma combinação de evidências, incluindo a detecção de papilomavírus canino em CCE oral e cutâneo e a indução de CCE cutâneo em 10 cães da raça beagle (de 4500) vacinados com uma vacina com papilomavírus oral vivo (Bregman et al., 1987; Teifke et al., 1998; Stokking et al., 2004). O papilomavírus canino oral também foi detectado em múltiplos casos de CCE cutâneo (Teifke et al., 1998). Um papilomavírus novo com potencial maligno foi clonado de um cão com papilomas nos coxins (Yuan et al., 2007). Cães persistentemente infectados com esse novo vírus desenvolveram CCE invasivo e metastático (Goldschmidt et al., 2006). Vários novos papilomavírus caninos foram detectados em CCE em outras localizações, incluindo quatro tumores cutâneos (Zaugg et al., 2005).

A imunossupressão pode ter um papel fundamental no CCE, e pacientes que recebem transplantes de órgãos sólidos têm 65 a 250 vezes mais o risco de desenvolver CCE quando comparados com a população geral (Hartevelt et al., 1990; Jensen et al., 1999; Lindelof et al., 2000). A taxa de formação de CCE é proporcional ao número de

agentes imunossupressores que o transplantado recebe (Jensen et al., 1999). Embora isso possa refletir a susceptibilidade de infecção persistente de papilomavírus em alguns casos, acredita-se também que possa refletir a perda da vigilância imunológica normal, resultando em uma perda da resposta imune contra neoplasia inicial (Hauck e Oblak, 2020). Em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV – *human immunodeficiency virus*), a incidência de neoplasias cutâneas não-melanoma foi duas vezes maior, quando comparados com pessoas negativas para HIV. O CCE estava associado à imunodeficiência, avaliado pela menor contagem de células T CD4 (Silverberg et al., 2013).

Um relato de caso do desenvolvimento de múltiplos hamartomas e CCE *in situ* cutâneos em um cão que recebia terapia imunossupressora prolongada com prednisona e ciclosporina também demonstrou marcação positiva para antígenos de papilomavírus (Callan et al., 2005). As lesões persistiram e novas lesões apareceram, mesmo após a interrupção do tratamento. O uso de estimuladores do sistema imune com sucesso para o tratamento de lesões neoplásicas iniciais, como o imiquimod para carcinoma *in situ* sustenta o papel do sistema imune para controlar o câncer de pele (Hauck e Oblak, 2020).

As exposições ambientais associadas com CCE incluem arsênico, hidrocarbonos aromáticos policíclicos (alcatrão, piche, fuligem), nitrosaminas e agentes alquilantes (Yuspa, 1986; Torchia et al., 2008; Que et al., 2018). Além disso, a exposição à radiação ionizante está associada com CCE mais agressivo, com altas taxas de recidiva e 10 a 30% de metástase (Edwards et al., 1989).

O estudo de Mohan et al. (2016) avaliou o risco de desenvolver outras neoplasias após o uso de Vismodegib (um tipo droga de terapia alvo) para o tratamento de carcinoma de células basais avançado. O estudo concluiu que os pacientes apresentavam um risco significativamente maior de desenvolver CCE, mas não outras neoplasias, e que o monitoramento da pele destes pacientes para o aparecimento de novas lesões é recomendado. Este medicamento ainda não está disponível para uso na veterinária, portanto estudos comparativos não podem ser realizados.

A presença de síndromes familiares raras pode predispor o indivíduo humano ao aparecimento de múltiplos CCE enquanto jovem (Que et al., 2018). Em geral, essas síndromes genéticas se enquadram em categorias amplas: aquelas que causam defeitos

da linhagem germinativa no reparo do DNA, levando ao aumento da instabilidade genômica; aquelas que afetam a pigmentação e aquelas que perturbam vias moleculares fundamentais envolvidas na patogênese do CCE (Jaju et al., 2016).

Muitas dessas síndromes genéticas que causam um risco maior de desenvolvimento de CCE também são caracterizadas por um maior risco de desenvolvimento de outras neoplasias malignas. Os achados cutâneos frequentemente são as primeiras manifestações clínicas da doença. O xeroderma pigmentosum é um grupo de desordens genéticas caracterizado por uma hipersensibilidade herdada aos efeitos danosos da radiação UV no DNA, devido a defeitos no reparo do DNA. Os pacientes têm um risco 1000 vezes maior de desenvolver neoplasias cutâneas, e aqueles que não são protegidos da radiação UV desenvolvem neoplasias cutâneas com a idade média de 8,5 anos (Jaju et al., 2016).

3.2. Eletroquimioterapia

EQT é um tratamento local contra o câncer que combina o uso de fármacos a pulsos elétricos gerados por um aparelho eletroporador. O procedimento consiste na aplicação de curtos campos elétricos de alta intensidade nas células, com consequente aumento transiente da permeabilidade da membrana plasmática a várias moléculas (Fig. 2) (Miklavcic et al., 2014).

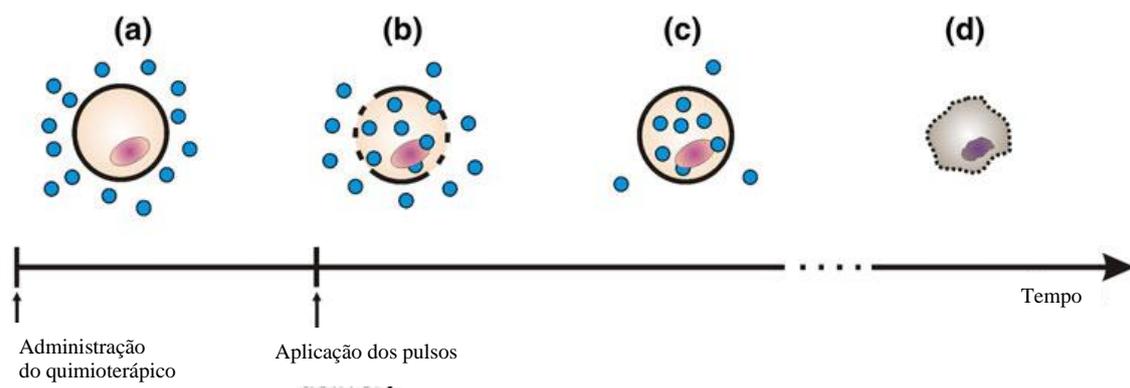


Figura 2 – Representação esquemática do conceito básico da EQT: a) após a administração, o quimioterápico circunda a célula; b) formação de poros após a aplicação dos pulsos, o quimioterápico entra na célula; c) a membrana se fecha, o quimioterápico fica aprisionado dentro da célula; d) o quimioterápico induz a morte celular (Modificado de Miklavcic et al., 2012).

A principal consequência da eletroporação é a permeabilização da membrana plasmática, com consequente aumento do transporte transmembrana. É sugerido que o efeito básico da permeabilização da membrana é a formação de defeitos ou poros, por isso, eletroporação (Rems e Miklavčič, 2016; Cemazar et al., 2018).

A permeabilização das células tumorais permite a passagem através da membrana celular e o efeito citotóxico direto da bleomicina ou cisplatina. No entanto, também existem efeitos antivasculares da EQT que podem contribuir substancialmente, especialmente em tumores vascularizados (Gehl e Geertsen, 2000; Curatolo et al., 2012). Este efeito é duplo, já que a aplicação dos pulsos elétricos causa vasoconstrição, induzindo o aprisionamento do quimioterápico (chamado de *vascular lock*), seguido de perturbação vascular devido à morte das células endoteliais nos vasos sanguíneos tumorais (Gehl et al., 2002; Sersa et al., 2008b; Markelc et al., 2013). Além disso, a destruição de células tumorais pode elicitar uma resposta imune que pode contribuir para a eficácia antineoplásica geral da EQT (Andersen et al., 2003; Calvet et al., 2014; Mozzillo et al., 2015; Sersa et al., 2015; Calvet e Mir, 2016; Falk et al., 2017).

Os seguintes parâmetros foram estabelecidos para eficácia máxima da eletroporação, sem induzir permeabilização irreversível: oito pulsos elétricos consecutivos, de onda quadrada uni ou bipolar, com 100 μ segundos (μ s) de duração, frequência de 1 hertz (Hz) ou 5 kHz e tensão de 1000 a 1300 V/cm (Mir, 2006; Sersa et al., 2006; Larkin et al., 2007; Cemazar et al., 2008).

Após a administração do quimioterápico, a área de tratamento deve ser uniformemente coberta por um campo elétrico adequado, uma consideração semelhante à da conduta cirúrgica (Gehl et al., 2018). Após aplicação dos pulsos, o eletrodo é reposicionado de forma a tratar todo o tumor. O campo elétrico cai muito rapidamente fora da área dos eletrodos, então a área a ser tratada pelos pulsos deve estar dentro dos eletrodos. Portanto, o padrão de aplicações necessário para cobrir todo o tumor também é importante. Sobreposição dos pulsos elétricos no tecido tumoral pode ser indicada para garantir tratamento adequado (Gehl et al., 2018).

A amplitude da corrente entre os eletrodos durante a eletroporação depende fortemente do posicionamento do eletrodo e da geometria tecidual (Fig. 3) (Langus et al., 2016).

EQT tem um alto índice terapêutico, ou seja, uma ação significativamente aumentada nos tumores tratados, com efeitos colaterais muito limitados nos tecidos normais (Gehl et al., 2018).

A administração intratumoral do quimioterápico é recomendada para pacientes com poucos tumores pequenos, enquanto a administração endovenosa é preferível para pacientes com tumores grandes e/ou múltiplos (Gehl et al., 2018).

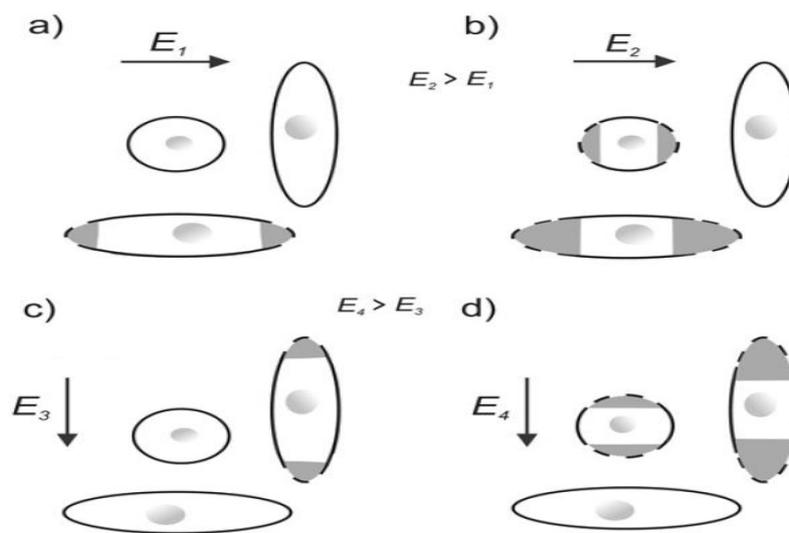


Figura 3 – Eletroporação da membrana plasmática das células de acordo com a intensidade e direção do campo elétrico e de acordo com o formato e orientação das células no espaço (Modificado de Corovic et al., 2009).

Bleomicina endovenosa é administrada na dose de 15000 UI/m^2 . A bleomicina é infundida em um curto período e oito minutos após a infusão, o quimioterápico já se difundiu nos tecidos tumorais e os pulsos elétricos podem ser aplicados. Uma recomendação prévia de finalizar o tratamento após 20 minutos expandiu para uma janela de tratamento de 40 minutos, baseado em experiência clínica em humanos (Gehl et al., 2018). Um estudo farmacocinético suporta essa recomendação (Groselj et al., 2016). É possível continuar a aplicar os pulsos após essa janela de tempo, se for julgado ser de interesse do paciente esperar por uma resposta terapêutica que pode de fato ainda estar presente após a janela de 40 minutos (Gehl et al., 2018).

Devido à sua natureza hidrofílica, bleomicina geralmente não se liga a proteínas plasmáticas, e sua entrada nas células é lenta e quantitativamente limitada em condições normais. Esta droga só penetra a membrana celular através de receptores proteicos, que

são transportados ao citosol por endocitose (Pron et al., 1999; Spugnini et al., 2016; Groselj et al., 2018). A deleção desta proteína receptora pelas células tumorais é o primeiro mecanismo de resistência à bleomicina (Spugnini et al., 2016).

O alvo primário para a ação citotóxica da bleomicina na célula é o DNA. Na presença de cofatores como oxigênio, Fe (II) e um agente redutor, a bleomicina se torna ativada e causa danos oxidativos na desoxirribose dos nucleotídeos, o que causa quebras no DNA que são vistas como lacunas cromossômicas, deleções e fragmentação do DNA, levando à apoptose celular (Chen et al., 2008; Spugnini et al., 2016; Groselj et al., 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos casos de carcinoma de células escamosas

Todos os procedimentos deste trabalho foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo 58/2018 (Anexo 1). O presente trabalho baseia-se em um estudo retrospectivo e prospectivo executado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG). Foram incluídos cães referenciados ao Hospital Veterinário da UFMG, entre 2012 e 2020 (prospectivo a partir de 2018), com diagnóstico histopatológico de CCE submetidos a EQT ou cirurgia associada ou não a EQT. Os critérios de exclusão foram insuficiência renal e tratamento prévio com bleomicina na dose cumulativa máxima. Os tutores assinaram Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para todos os animais tratados (Anexo 2).

Dados dos pacientes como idade, sexo e raça, localização das lesões, tratamentos realizados e sua resposta e recorrência do tumor foram registrados. Exames pré-cirúrgicos incluíram eletrocardiograma, hemograma e provas bioquímicas séricas (proteína total e frações, ureia, creatinina, fosfatase alcalina – FA, alanina aminotransferase – ALT, aspartato aminotransferase – AST e gama-glutamil-transferase – GGT) para avaliação do risco anestésico. Todos os casos incluídos no estudo apresentaram lesões de CCE confirmadas por histopatologia e os pacientes foram submetidos ao estadiamento clínico proposto mediante radiografia de tórax em três

incidências e citologia de linfonodos regionais que apresentaram alterações na forma, volume e/ou consistência. Linfonodos que não apresentaram alterações macroscópicas ou no exame citológico, não foram excisados para avaliação histopatológica.

Um total de 54 pacientes foram incluídos. Para as análises histopatológicas e imuno-histoquímicas, foram incluídos os animais cujos diagnósticos eram oriundos do Setor de Patologia Veterinária da UFMG.

4.2. Estadiamento clínico

O estadiamento clínico dos pacientes com CCE foi realizado de acordo com o sistema proposto por Bukhari et al. (2015) para CCE humano, o qual avalia o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e presença de metástases em órgãos distantes (M) (Tab. 1).

Tabela 1 - Estadiamento clínico para o carcinoma de células escamosas (adaptado de Bukhari et al., 2015)

Estadiamento	Tamanho do tumor primário	Metástase para o linfonodo	Metástase distante
0	Tis - Carcinoma <i>in situ</i>	N0	M0
I	T1 – tumor com 2 cm ou menos	N0	M0
II	T2 – tumor maior que 2 cm e menor que 5 cm	N0	M0
	T3 – tumor maior que 5 cm	N0	M0
III	T4 – tumor invade estruturas extradérmicas profundas (osso, músculo, cartilagem)	N0	M0
	Qualquer tamanho	N1	M0
IV	Qualquer tamanho	Qualquer N	M1

4.3. Formulações das drogas

O sulfato de bleomicina (Tecnomicina® – Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A. Pindamonhangaba, São Paulo) foi obtido em pó e diluído com soro fisiológico (3000 UI em 1,0 mL). A solução de bleomicina foi administrada pela via endovenosa em bolus

rápido na dose de 15000 UI/m². Para cada procedimento, uma nova solução de bleomicina foi preparada.

4.4. Protocolos de tratamento

A EQT das lesões de CCE foi realizada de acordo com o protocolo operacional padrão (SOP – *Standard Operating Procedure*) de EQT europeu, adaptado para a veterinária (Marty et al., 2006; Mir et al., 2006; Gehl et al., 2018). A monitoração dos pulsos com gravação digital é um passo importante para assegurar que os pulsos aplicados são obtidos de acordo com a programação do aparelho eletroporador (Cemazar et al., 2018). O aparelho eletroporador utilizado foi o VetCP125® (Fig. 4). Este aparelho não grava os pulsos elétricos aplicados, mas exibe o valor de voltagem aplicado a cada grupo de pulsos no display. Assim, foi possível assegurar, durante cada tratamento, que a voltagem aplicada era a mesma que a voltagem programada.

Os pulsos elétricos foram administrados através de um eletrodo com duas fileiras de agulhas paralelas de aço inoxidável, com uma distância interna entre as fileiras de 5 mm (Fig. 5), que foram introduzidas diretamente até os tecidos tumorais profundos, incluindo o tecido subcutâneo e áreas ao redor de até 2 cm para margens de segurança, para que todo o tumor fosse submetido ao campo elétrico. Oito pulsos de onda quadrada, com duração de 100 μsegundos cada, 1300 V de amplitude e frequência de 5 KHz foram gerados pelo aparelho eletroporador VetCp 125®.



Figura 4 - Aparelho eletroporador VetCP125® utilizado para realizar as sessões de eletroquimioterapia.



Figura 5 – Eletrodo em agulhas com duas fileiras de agulhas paralelas de aço inoxidável, com distância interna entre as fileiras de 5 mm.

De uma forma geral, para os animais submetidos à exérese cirúrgica, excisões elípticas foram realizadas na pele, respeitando margens laterais e profundas de 1 centímetro (Farese et al., 2020). A sutura foi realizada com fios absorvíveis de poliglecaprone ou polidioxanona, calibre 0 a 2-0, com padrão Sultan, para redução do espaço morto. As bordas da ferida foram aproximadas e coaptadas em um segundo plano com o mesmo tipo de fio, calibre 2-0 ou 3-0, mas com padrão de sutura contínuo simples. A sutura de pele foi realizada em padrão simples interrompido, com fios de náilon calibre 3-0. Em casos específicos foi necessária à amputação de membros, conforme a localização e tamanho do tumor, objetivando um tratamento eficaz, mas sempre preservando a qualidade de vida do paciente. Dependendo do estadiamento, apresentação e evolução clínica do paciente, este foi conduzido apenas para biópsia incisional associada a EQT (estadiamento inicial). Para os pacientes com lesões múltiplas e estágio avançado, uma excisão marginal, intencional, foi realizada, associada à EQT.

Todos os procedimentos de EQT foram realizados pela mesma pessoa. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por cirurgiões diferentes. A mensuração das lesões foi realizada antes do primeiro tratamento e a cada retorno, quando realizado apenas EQT. As mensurações também foram realizadas pela mesma pessoa.

Os pacientes foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de duas horas, a fim de evitar êmese transoperatória ou pós-operatória e pneumonia por aspiração (Selmi et al., 2009). O protocolo de anestesia geral foi definido pelo anestesista, conforme os exames pré-cirúrgicos.

Os tecidos removidos foram acondicionados em formalina 10% para o exame histopatológico e imuno-histoquímico subsequente.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos de tratamento, de acordo com tamanho e localização das lesões (Tab. 2):

Grupo cirurgia (n = 18) – Os cães do grupo de cirurgia foram submetidos à exérese ampla, com as margens laterais e profundas de 1 centímetro (Farese et al., 2020).

Grupo cirurgia e EQT (n = 26) – Os cães do grupo da cirurgia associada a EQT foram submetidos à exérese marginal intencional dos nódulos. Receberam 15000 UI/m² da solução de bleomicina (3000 UI/mL) pela via endovenosa e grupos de 8 pulsos de onda quadrada. Os pulsos elétricos foram administrados 5 minutos após a aplicação da bleomicina. Foram aplicados tantos grupos de pulsos elétricos quantos necessários para eletroporação de todo o leito da cirurgia. Após a EQT, foi realizada a redução e sutura da ferida cirúrgica.

Grupo EQT (n = 10) – Os cães do grupo da EQT receberam 15000 UI/m² da solução de bleomicina (3000 UI/mL) pela via endovenosa e grupos de 8 pulsos de onda quadrada. Os pulsos elétricos foram administrados 5 minutos após a aplicação da bleomicina. Foram aplicados tantos grupos de pulsos elétricos quantos necessários para eletroporação de toda a área tumoral.

Tabela 2 – Informações individuais de 54 cães com diagnóstico de carcinoma de células escamosas

ID	Sexo	Idade (anos)	Raça	Cor	Localização	Estadiamento clínico	Gradação (Broder)	Tratamento	Nº de sessões de EQT (quando aplicável)	Sobrevida global (dias)
1	F	14	Poodle	Branco	Vagina	3	2	Cirurgia	1	216
2	M	9	Cocker spaniel	Outros	Dígito	3	3	Cirurgia	1	Vivo (1566)
3	F	16	Poodle	Outros	Face	2	2	Cirurgia	0	103
4	M	8	Dogue de bordeaux	Outros	Cauda	2	2	Cirurgia	0	29
5	F	6	Beagle	Outros	Dorso	2	1	Cirurgia	0	Vivo (1872)
6	F	13	Labrador	Outros	Dígito	1	1	Cirurgia	0	Vivo (880)
7	F	12	Rottweiler	Outros	Dígito	3	3	Cirurgia	0	199
8	M	9	Beagle	Branco	Pescoço	3	1	Cirurgia	0	116

9	M	9	Bouvier de flandres	Outros	Dígito	2	3	Cirurgia	0	966
10	F	12	Pastor alemão	Outros	Dorso	4	-	Cirurgia	0	-
11	M	14	SRD	Outros	Pescoço	3	-	Cirurgia	0	59
12	F	12	SRD	Outros	MA	1	1	Cirurgia	0	171
13	M	12	Schnauzer	Outros	Dígito	2	2	Cirurgia	0	362
14	M	7	Pit bull	Outros	Traqueia		2	Cirurgia	0	38
15	M	10	Shihtzu	Outros	Dorso	1	2	Cirurgia	0	630
16	M	7	Chowchow	Outros	MA	2	2	Cirurgia	0	Vivo (719)
17	F	10	SRD	Outros	Cotovelo	1	-	Cirurgia	0	537
18	M	8	SRD	Branco	Abdômen , MP, prepúcio	3	-	Cirurgia	2	954
19	F	6	Boxer	Branco	Abdômen	2	1	Cirurgia + EQT	2	593
20	F	8	SRD	Branco	Flanco	3	2	Cirurgia + EQT	1	190
21	F	10	Pointer	Branco	Abdômen	3	3	Cirurgia + EQT	2	-
22	M	12	Bull terrier	Branco	Abdômen	2	3	Cirurgia + EQT	5	423
23	M		Boxer	Branco	Abdômen	2	3	Cirurgia + EQT	3	1477
24	F	12	Dálmata	Branco	Flanco	2	4	Cirurgia + EQT	1	884
25	M	7	SRD	Branco	Abdômen	2	1	Cirurgia + EQT	1	-
26	F	7	Boxer	Branco	Abdômen	2	2	Cirurgia + EQT	5	1681
27	F	1	SRD	-	Cavidade oral, abdômen, pálpebra	2	2	Cirurgia + EQT	1	Vivo (1887)
28	M	4	SRD	Branco	Abdômen , MP	3	3	Cirurgia + EQT	8	565
29	F	6	SRD	Branco	Abdômen	2	3	Cirurgia + EQT	1	547
30	F	6	Dálmata	Branco	Flanco	3	2	Cirurgia + EQT	5	616
31	F		SRD	Branco	Abdômen	2	3	Cirurgia + EQT	2	563
32	M	10	Pit bull	Branco	Abdômen	2	3	Cirurgia + EQT	3	593
33	M	8	Dachshund	Branco	Abdômen	1	3	Cirurgia + EQT	2	1432

34	F	3	SRD	Branco	Abdômen	3	2	Cirurgia + EQT	6	542
35	F	9	Bulldogue americano	Branco	Abdômen	3	3	Cirurgia + EQT	2	514
36	M	8	Dogo argentino	Branco	Prepúcio	2	3	Cirurgia + EQT	4	234
37	M	5	Dogo argentino	Branco	Abdômen	3	-	Cirurgia + EQT	4	169
38	F	10	Pit bull	Branco	Abdômen	3	-	Cirurgia + EQT	5	485
39	M	9	Boxer	Branco	MA, MP	-	-	Cirurgia + EQT	2	611
40	F	8	Dálmata	Branco	Abdômen	2	-	Cirurgia + EQT	2	Vivo (931)
41	F	4	Bull terrier	Branco	Abdômen	2	-	Cirurgia + EQT	1	243
42	F	12	Pit bull	Branco	Abdômen	1	-	Cirurgia + EQT	2	772
43	M	5	SRD	Branco	Prepúcio	3	-	Cirurgia + EQT	2	Vivo (1098)
44	F	7	SRD	Branco	Abdômen	2	-	Cirurgia + EQT	2	794
45	F	10	Golden retriever	Outros	Cotovelo	3	-	EQT	1	2
46	F	13	Pit bull	Branco	MP, flanco, vulva	2	-	EQT	2	76
47	M	-	Maltês	Branco	Quadril	3	-	EQT	1	161
48	F	11	SRD	-	Abdômen , pálpebra	1	-	EQT	1	762
49	M	14	Lhasa apso	Outros	Face	3	-	EQT	3	-
50	F	11	Golden retriever	Outros	Cotovelo	2	3	EQT	4	708
51	F		Schnauzer	Outros	Plano nasal	1	3	EQT	1	63
52	M	12	Bulldogue Inglês	Branco	Prepúcio	1	3	EQT	8	816
53	F	9	Pit bull	Branco	Abdômen	2	2	EQT	1	
54	F	13	Pointer	Branco	Abdômen	1	2	EQT	1	670

4.5. Análise histopatológica

Os diagnósticos histopatológicos e as análises imuno-histoquímicas foram revisados e realizados pelo Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG. Fragmentos do tumor primário foram fixados em formol a 10% tamponado, clivados e processados pela técnica rotineira de inclusão em

parafina (Luna, 1968). Seções histológicas de 4 µm foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e utilizadas para a análise histomorfológica e histomorfométrica do tumor primário. A identificação do tipo e subtipo histológico foi feita de acordo com Munday et al. (2017).

A graduação de Broder foi feita de acordo com a descrição de Goldschmidt e Goldschmidt (2017) (Fig. 6), em que o CCE bem diferenciado (grau 1) é caracterizado por células neoplásicas com citoplasma eosinofílico abundante, pontes intercelulares e massas laminadas concêntricas de queratina (pérolas córneas). O pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica são mínimos. A invasão da derme e subcutâneo é acompanhada de proliferação de tecido conjuntivo fibroso. CCE moderadamente diferenciado (graus 2 e 3) é caracterizado por células neoplásicas com citoplasma menos eosinofílico, núcleos mostrando maior pleomorfismo e hiperchromatismo, e um maior número de figuras de mitose, algumas das quais podem ser bizarras. Encontram-se menos pérolas córneas e as pontes intercelulares são de difícil identificação. A invasão é mais preeminente, com ilhas de células neoplásicas menores do que no CCE bem diferenciado. CCE pobremente diferenciado (grau 4) pode apresentar pouca diferenciação escamosa. O citoplasma é anfófilico e os núcleos são extremamente pleomórficos com hiperchromatismo e atividade mitótica intensa. As células neoplásicas são profundamente invasivas, frequentemente aparecendo como células únicas ou pequenos grupos de células em uma matriz desmoplásica (Goldschmidt e Goldschmidt, 2017).

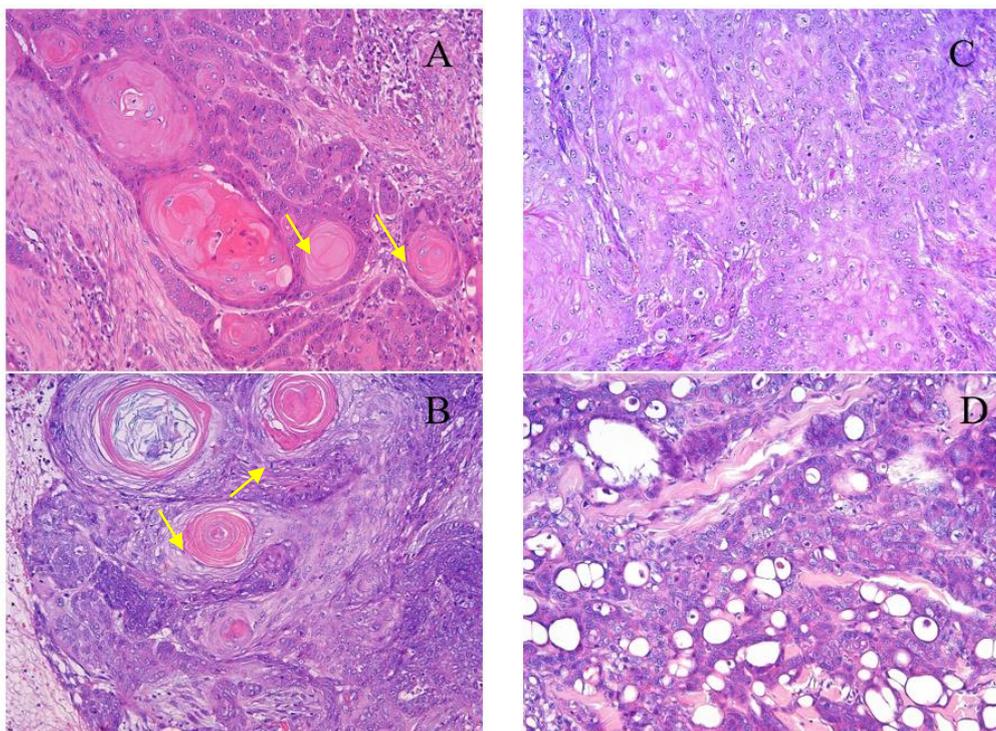


Figura 6 – Carcinoma de células escamosas grau 1 de Broder, apresentando células neoplásicas com citoplasma eosinofílico abundante, pontes intercelulares e massas laminadas concêntricas de queratina (pérolas córneas) (seta marela) (A); carcinoma de células escamosas grau 2 de Broder, apresentando células neoplásicas com citoplasma menos eosinofílico e pérolas córneas ainda frequentes (seta amarela) (B); carcinoma de células escamosas grau 3 de Broder, apresentando núcleos mostrando maior pleomorfismo e hiper cromatismo (C); carcinoma de células escamosas grau 4 de Broder apresentando pouca diferenciação escamosa, com citoplasma anofílico e núcleos extremamente pleomórficos. Hematoxilina-eosina, 20x.

A graduação de Bryne foi realizada de acordo com a Tabela 3, avaliando-se as seguintes características morfológicas: grau de queratinização, padrão de invasão, resposta do hospedeiro, pleomorfismo nuclear e número de mitoses por campo de maior aumento – 400x (HPF – *high powerfield*).

TABELA 3 – GRADUAÇÃO DE BRYNE (NEGAMINE ET AL., 2017)				
CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICA	PONTUAÇÃO			
	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (>50% das	Moderadamente queratinizado (20 – 50% das	Queratinização mínima (5-20% das células	Sem queratinização (0-5% das

	células)	células)		células)
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas bem delineadas	Cordões e/ou bandas sólidos infiltrativos	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Dissociação celular difundida em pequenos grupos e/ou células únicas (n<15)
Resposta do hospedeiro (infiltrado inflamatório linfoplasmocitário)	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
Pleomorfismo nuclear	Discreto (>75% de células maduras)	Moderadamente abundante (50-75% de células maduras)	Abundante (25-50% de células maduras)	Extremo (0-25% de células maduras)
Mitoses por HPF	0-1	2-3	4-5	>5
As pontuações de cada característica avaliada são adicionadas para uma pontuação máxima de 20. A graduação tumoral é baseada na pontuação total, sendo: grau I (6-10); grau II (11-15) e; grau III (16-20) (Negamine et al., 2017).				

Foi também avaliado o estágio de infiltração das células neoplásicas, graduado de 1-4 de acordo com a profundidade e tecidos acometidos, sendo: 1 - carcinoma *in situ*; 2 - invasão da derme ou submucosa; 3 - invasão de músculos, gânglios nervosos, glândulas e tecido adiposo adjacente; 4 - invasão profunda, incluindo de tecido ósseo (Ghanghoria et al., 2019).

4.6. Análise imuno-histoquímica

Para avaliação imuno-histoquímica, cortes histológicos de 4 µm foram obtidas dos blocos representativos de cada tumor e fixadas em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados e rehidratados em uma sequência de etanol progressivamente diluído. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato pH 6.0 para o Ki-67 e em tampão EDTA pH 9,0 para CD31 e COX-2. Para todos os anticorpos

a recuperação antigênica foi feita por calor em panela de pressão (120°C por 10 minutos). Tanto a peroxidase endógena quanto as proteínas inespecíficas foram bloqueadas com bloqueadores comerciais (Novolink Polymer Detection Systems, Leica). Os anticorpos primários foram incubados de acordo com os dados na Tab. 4. O anticorpo secundário (Novolink Polymer Detection Systems, Leica) foi incubado em câmara úmida por 30 minutos e a reação amplificada com o polímero (Novolink Polymer Detection Systems, Leica). A revelação da reação foi obtida com o cromógeno 3.3-diaminobenzidina tetrahydroclorido (Liquid DAB + Substrat Chromogen System, Dako Cytomation) e a contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris.

Tabela 4. – Relação de anticorpos primários

Anticorpo primário	Clone	Diluição	Fonte	Método de recuperação
COX-2	SP21	1:100	Lab Vision	4°C, 16 horas
CD31 (glicoproteína expressa em células endoteliais)	JC70A	1:100	Dako	4°C, 16 horas
MIB-1		1:50	Dako	4°C, 16 horas

A avaliação da marcação de COX-2 foi semi-quantitativa, conforme preconizado por Lavalle et al. (2009), com o escore de distribuição definido pela estimativa da porcentagem de células positivas em cinco campos, no aumento de 400x (Fig. 7). O escore final, de 0 a 12, foi obtido pela multiplicação dos valores obtidos para distribuição e para intensidade. Para distribuição, os valores variam de 0 a 4, sendo 0 para 0% de células marcadas; 1 para entre zero e 10% de células marcadas; 2 para entre 11 e 30% de células marcadas; 3 para entre 31 e 60% de células marcadas; e 4 para mais de 61% de células marcadas. Para intensidade, os valores variam de 0 a 3, sendo que 0 equivale a ausência de marcação; 1 equivale a marcação fraca; 2 equivale a marcação

moderada; e 3 equivale a marcação forte. Como controles positivos foram utilizadas amostras de tecidos de cães previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário por PBS 1X.

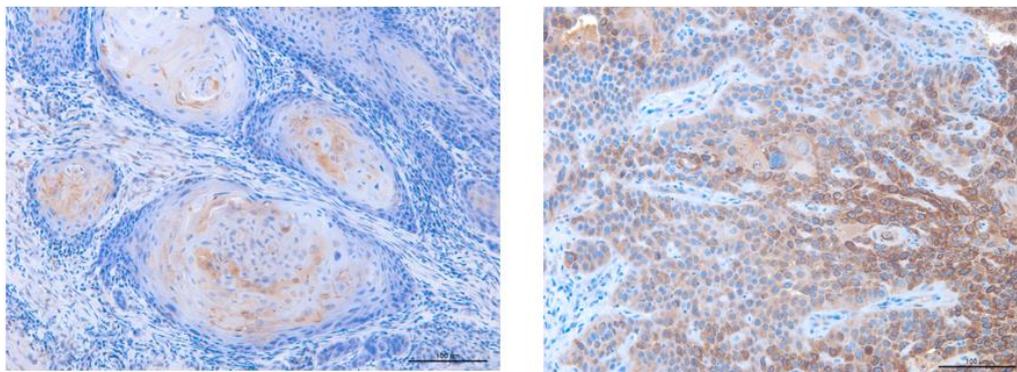


Figura 7 – Padrões de expressão de COX-2 em carcinoma de células escamosas, sendo escore baixo (A) e escore alto (B). COX-2 (monoclonal; 1:100), Hematoxilina de Harris, 40x.

Para avaliação da densidade de microvasos, qualquer célula isolada marcada ou grupos de células, claramente separadas de grupos adjacentes, com ou sem lúmen, foram considerados como um vaso individual, semelhante à metodologia empregada em trabalhos anteriores (Fig. 8) (Weidner et al., 1991; Cassali, 2000; Lavalle et al., 2009). Áreas de fibrose, necrose e inflamação, bem como vasos com parede muscular, foram excluídos da contagem. Os microvasos foram contados em três áreas mais vascularizadas (*hot spots*) em campos de aumento 200x (que correspondem à cerca de 0,76 mm²), a partir das quais se obteve a média. Como controle positivo foram utilizadas amostras de tecidos de cães previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário por PBS 1X.

Para estabelecer o índice de proliferação celular foram contadas 500 células aleatórias em campos com maior marcação (*hot spots*) e avaliada a porcentagem de células com núcleos marcados (Fig. 9). Como controle positivo foram utilizadas amostras de tecidos de cães previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário por PBS 1X.

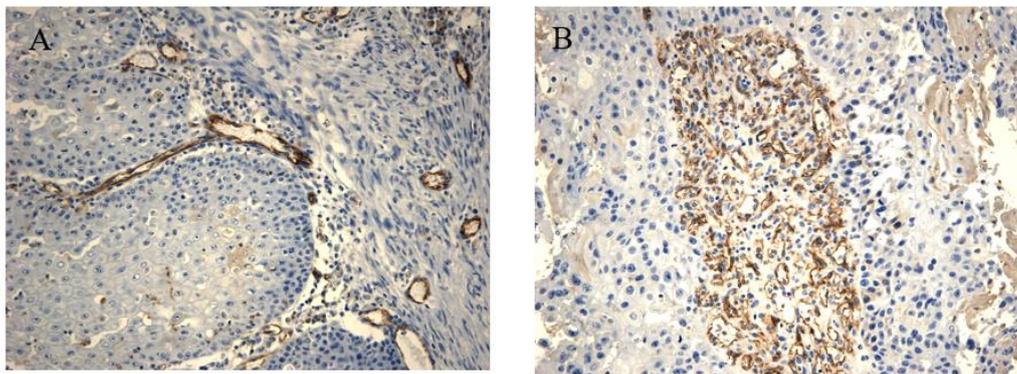


Figura 8 – Padrões de expressão de CD-31 em carcinoma de células escamosas, sendo escore baixo (A) e escore alto (B). JC70A (1:100), Hematoxilina de Harris, 40x.

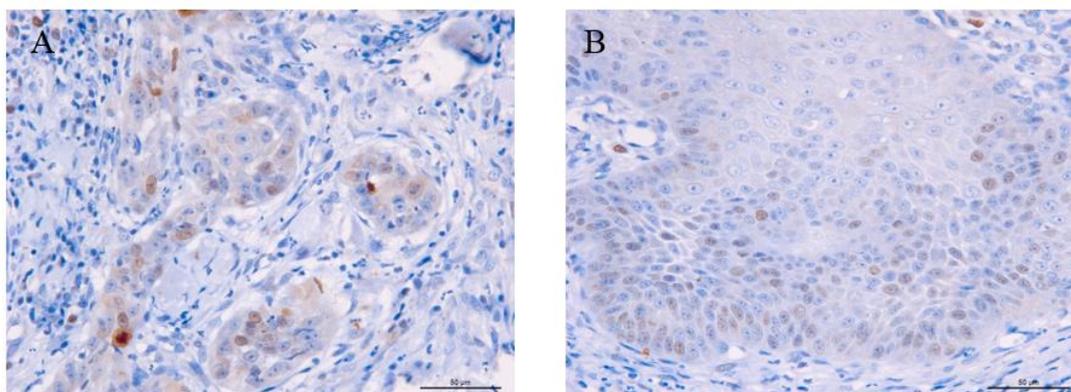


Figura 9 – Padrões de expressão de ki-67 em carcinoma de células escamosas, sendo escore baixo (A) e escore alto (B). MIB-1 (monoclonal; 1:50), Hematoxilina de Harris, 40x.

4.7. Avaliação da resposta, intervalo livre de doença e sobrevida específica

O acompanhamento dos pacientes foi realizado através do monitoramento dos retornos periódicos destes ao HV-UFMG e do contato com os proprietários através de ligações telefônicas.

A resposta ao tratamento foi avaliada de acordo com os critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos 30 dias após o procedimento (*RECIST Guidelines*) (Eisenhauer et al., 2009). O termo resposta completa (RC) significa desaparecimento das lesões nos retornos subsequentes, quando comparado com as lesões na primeira avaliação. Resposta parcial (RP) é uma redução de pelo menos 30% do diâmetro das lesões. Doença progressiva (DP) é o aumento de pelo menos 20% das lesões ou o aparecimento de uma ou mais novas lesões. Doença estável (DE) é quando não há redução suficiente para qualificar como resposta parcial, nem aumento suficiente para

qualificar como doença progressiva. Resposta objetiva (RO) é a somatória dos pacientes com resposta completa e resposta parcial.

O intervalo livre de doença (ILD) foi definido (em dias) para os animais em remissão completa como o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor ou EQT até o aparecimento de recidiva ou metástases. A citologia foi utilizada para confirmação do diagnóstico no caso de doença progressiva com aparecimento de novas lesões.

O tempo de sobrevida específica foi definido (em dias) como sendo o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor ou EQT até a data de óbito do animal pela doença. Os animais que vieram a óbito por razões desconhecidas, causas não relacionadas ao tumor ou que deixaram de ser acompanhados foram considerados censurados.

4.8. Análise estatística

As variáveis qualitativas sexo, idade, raça, cor, estadiamento, localização e deiscência foram avaliadas entre os grupos cirurgia e EQT (associada ou não a cirurgia) e a associação foi verificada através do teste Qui-Quadrado de independência, ou teste exato de Fisher para baixas frequências esperadas (menores que 5).

A associação entre cor do pelo do animal e a localização do tumor (se em área exposta ou não ao sol) foi verificada através do teste Qui-Quadrado de independência, ou teste exato de Fisher para baixas frequências esperadas (menores que 5).

As possíveis diferenças entre os grupos de acordo com a localização do tumor (se em área exposta ao sol ou não) em relação às variáveis: grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, figuras de mitose por HPF, padrão de invasão, estágio de invasão, infiltrado linfoplasmocitário, graduação de Broder, graduação de Bryne, total de pontos de Bryne, subtipos histológicos, escore de COX-2, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67) foram testadas usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As curvas de sobrevida entre os grupos de acordo com a localização do tumor (se em área exposta ao sol ou não) para figuras de mitose por 10 HPF, escore de COX-2, subtipos histológicos, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67) foram desenhadas segundo metodologia descrita por Kaplan e Meier (1958). A curva de

sobrevida também foi realizada para testar diferenças entre os animais tratados com cirurgia ou EQT (associada ou não a cirurgia). A função da sobrevida foi estimada a partir da tabulação do número de pacientes sob risco nos tempos em que ocorreram os óbitos. As diferenças entre as curvas de sobrevida foram testadas pelo teste logrank. Animais cujos óbitos foram causados por outros fatores ou cujo motivo era desconhecido, foram tratados como censurados. Modelo de regressão de Taxas de Falhas Proporcionais ou Modelo Semiparamétrico de Cox (Cox, 1972) também foram ajustados para as variáveis quantitativas.

A correlação entre o estadiamento e as variáveis grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, figuras de mitose por 10 HPF, figuras de mitose bizarras, padrão de invasão, estágio de invasão, infiltrado linfoplasmocitário, graduação de Broder, graduação de Bryne, escore de COX-2, subtipos histológicos, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67) foi calculada usando a correlação não-paramétrica de Spearman.

A matriz de correlação entre figuras de mitose por 10 HPF, escore de COX-2, subtipos histológicos, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67) foi calculada através da correlação não-paramétrica de Spearman para avaliar a associação entre variáveis quantitativas, ou com o teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar a associação entre uma variável quantitativa e outra qualitativa.

Avaliação se a sobrevida específica ou o intervalo livre de doença poderiam ser supostos pelas variáveis: idade, grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, figuras de mitose por 10 HPF, figuras de mitose bizarras, padrão de invasão, estágio de invasão, infiltrado linfoplasmocitário, graduação de Broder, graduação de Bryne, escore de COX-2, subtipos histológicos, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67). Ajustaram-se modelos de regressão de Taxas de Falhas Proporcionais ou Modelo Semiparamétrico de Cox (Cox, 1972) para cada uma das variáveis preditivas, em relação a duas variáveis resposta: sobrevida específica e intervalo livre de doença. Para as variáveis significativas foram desenhadas curvas de sobrevida segundo a metodologia descrita por Kaplan e Meier (1958).

Foram consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste foi $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Critérios clínicos

Foram incluídos 54 cães neste estudo, com idade entre 1 e 14 anos (média 9,16 anos) (Tab. 2). Destes 57,4% (31/54) eram fêmeas e 42,6% (23/54) machos. Os animais do Grupo Cirurgia foram marginalmente mais velhos do que os animais dos Grupos Cirurgia + EQT e EQT ($p = 0,085$) (Fig. 10). A idade média está compatível com o relatado por Almeida et al. (2001) que encontrou uma idade média de 8.4 anos ao estudar CCE em 40 cães.

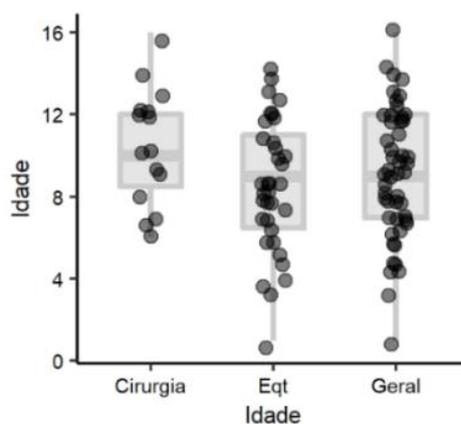


Figura 10 – Distribuição da idade entre os animais tratados com cirurgia e os animais tratados com EQT, associada ou não a cirurgia ($p = 0,085$).

Os tumores podem surgir em uma variedade de locais anatômicos, o que foi observado no presente estudo (Tab. 2) e corrobora com os trabalhos de Buckman et al. (1998); Salashe, (2000); Almeida et al. (2001); Sozmen et al. (2020). O CCE é a segunda neoplasia maligna mais comum na cavidade oral dos cães, no entanto não foi observado nenhum caso de CCE oral (Todoroff e Brodey, 1979; Liptak e Withrow, 2013).

A raça mais comum foi SRD (sem raça definida), responsável por 25,9% (14/54) dos casos, seguido de Pit Bull (11,1% - 6/54), Boxer (7,4% - 4/54) e Dálmata (5,55% - 3/54). Cinco dos seis cães da raça Pit Bull e todos os cães da raça Boxer eram brancos (Tab. 2) (Anexo 3). À exceção do SRD, estas raças não são as mais prevalentes em nosso meio, o que mostra uma predisposição dos animais de pelagem branca para o desenvolvimento do CCE cutâneo, principalmente no Brasil, um país de clima tropical, com alta incidência solar (Fig. 11) (IBGE, 2015).

CCE é uma das neoplasias malignas mais frequentes em cães, representando a segunda neoplasia cutânea mais comum nesta espécie. Acredita-se que os tumores que se desenvolvem em pele pouco ou não pigmentada são induzidos pelo dano provocado pela exposição crônica à luz UV. Vários pesquisadores têm descrito essa incidência (Bevier e Goldschmidt, 1981; Nikula et al. 1992; Goldschmidt e Shofer, 1998; Kraegel e Madewell, 2000; Almeida et al., 2001; Scott et al., 2001; Gross et al., 2009; Poggiani et al., 2012; Dos Anjos et al., 2019).



Figura 11 – Cão da raça Pit Bull de pele e pelagem claras, apresentando múltiplas lesões de CCE no abdômen, pele avermelhada, espessada e ressecada devido à exposição solar (dano actínico).

65,4% (34/54) dos animais do estudo apresentaram pelagem branca. Houve uma associação significativa entre cor do pelo do animal e tumores em locais com exposição ao sol. Os tumores em locais expostos ao sol (abdômen, flanco, prepúcio, pálpebra, face medial de membro torácico - MT e membro pélvico - MP) ocorreram exclusivamente em animais de pelagem branca. Já 81,8% dos animais de pelagem não branca (18/22)

tiveram ocorrência de tumores em locais não expostos ao sol (dígito, cotovelo, vagina, quadril, dorso, cauda, pescoço e traqueia) ($p = 0,001$) (Fig. 12).

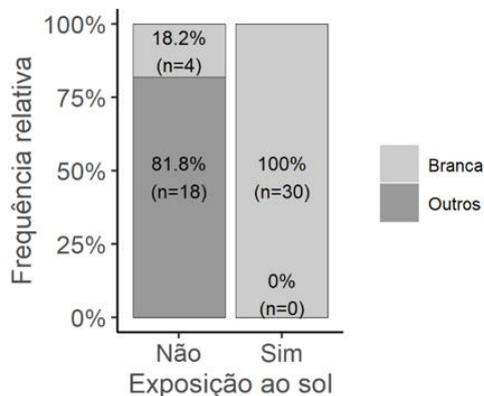


Figura 12 – 100% dos animais com tumores em locais relacionados à exposição solar apresentavam pelagem branca, enquanto 81.8% dos animais com tumores em locais não relacionados à exposição solar apresentavam pelagem não branca ($p = 0,001$).

CCE é o tumor mais comum no dígito dos cães (Wobeser et al., 2007). Neste estudo 9,3% (5/54) dos animais apresentaram CCE em dígito e 20% (1/5) destes apresentaram metástase para o linfonodo regional, o que está de acordo com a literatura de que o CCE em dígito tem uma prevalência de metástase que varia de 5 a 25% (Liu e Hohn, 1968; O'Brien et al., 1992; Marino et al., 1995; Wobeser et al., 2007). A média de idade dos pacientes com CCE em dígito foi de 11 anos, o que está de acordo com o observado por Belluco et al. (2013), que encontraram uma média de idade de 10,2 anos.

Há uma predisposição racial para cães pretos de raças grandes para o CCE em dígito (Paradis et al., 1989; O'Brien et al., 1992; Lee Gross et al., 2005; Wobeser et al., 2007). Observou-se no presente estudo, que os cinco animais com CCE em dígito apresentavam pelagem escura e três eram de raças grandes (Rottweiler, Bouvier de Flandres e Labrador) (Fig. 13) (Tab. 2). As raças mais comumente representadas no estudo de Belluco et al. (2013) foram Rottweiler e Schnauzer e 94% dos cães deste estudo tinham pelagem escura (preta, cinza ou preta e canela), mesmo nos animais de pequeno porte acometidos, confirmando que há uma conexão entre o desenvolvimento deste tipo de tumor e a cor escura da pelagem. Novas investigações na genética e microambiente tumoral podem levar a uma melhor compreensão da carcinogênese do

CCE em dígito, que difere da carcinogênese por radiação UV do CCE cutâneo (Belluco et al., 2013).



Figura 13 – Cão, Cocker Spaniel, pelagem preta: observa-se CCE no dígito.

A graduação do CCE é baseada na diferenciação histológica do tumor (Goldschmidt et al., 1998). No presente estudo, os animais com CCE em dígito foram classificados como grau 1, 2 ou 3 de Broder. Belluco et al. (2013) observaram diferentes graus de diferenciação em um mesmo tumor. Portanto, o sistema de graduação atual pode não ser um marcador útil para definir o prognóstico do CCE em dígito, como sugerido por Meleo (1997).

Na avaliação de sobrevida, os animais com tumores em locais com exposição solar não atingiram a mediana e os animais com tumores em locais não relacionados com a exposição solar tiveram uma mediana de 362 dias ($p = 0,001$) (Fig. 14). Além disso, os animais com tumores em locais não relacionados com a exposição ao sol tiveram um risco de óbito 4,5 vezes maior em relação aos animais com tumores em locais relacionados com exposição ao sol ($HR = 4,50$, $p = 0,004$, $IC: 1,60-12,69$). Este resultado é compatível com o relatado por vários pesquisadores, de que o CCE canino pode ter um comportamento completamente diferente, dependendo da sua localização. (Weiss e Frese, 1974; Buckman et al., 1998; Salashe, 2000; Almeida et al., 2001; Maiolino et al., 2002; Sozmen et al., 2020). Acredita-se que este comportamento diferente se deve à diferença na carcinogênese, relacionada com a exposição ao sol para os animais de pele e pelos claros (Bevier e Goldschmidt, 1981; Nikula et al. 1992;

Goldschmidt e Shofer, 1998; Kraegel e Madewell, 2000; Almeida et al., 2001; Scott et al., 2001; Gross et al., 2009; Poggiani et al., 2012; Dos Anjos et al., 2019). Portanto, os autores acreditam que devem ser consideradas entidades diferentes, com tratamentos e prognósticos distintos.

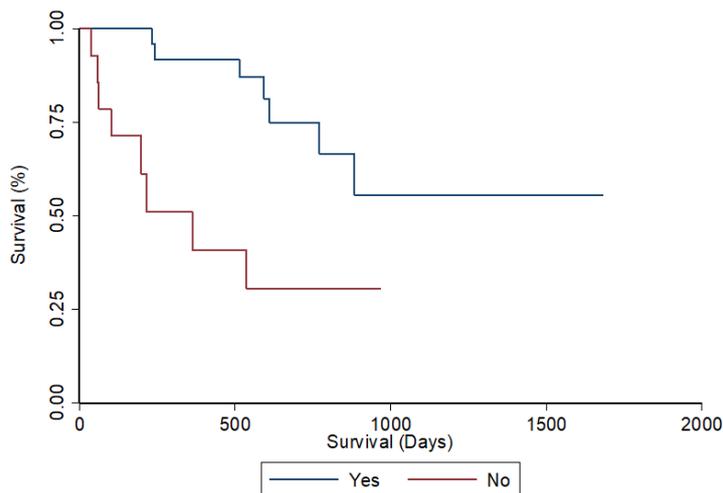


Figura 14 – Representação gráfica da sobrevivência global dos 54 animais com CCE, conforme a localização do tumor. Animais com tumores em locais relacionados com a exposição ao sol (n = 32), animais com tumores em locais não relacionados com a exposição ao sol (n = 22) (p = 0,001).

Em relação ao tratamento de animais com CCE em locais relacionados à exposição solar, só havia um animal do Grupo Cirurgia, que foi excluído da análise. Os animais do Grupo Cirurgia + EQT atingiram a mediana com 884 dias e os animais do grupo EQT não atingiram a mediana (p = 0,698) (Fig. 15). O ILD foi de 547 dias para os animais do Grupo Cirurgia + EQT e de 415 para os animais do Grupo EQT (p = 0,9012) (Fig. 16). Os animais do Grupo Cirurgia + EQT foram submetidos a um tratamento multimodal menos invasivo e mutilante, preservando a qualidade de vida e com resposta semelhante à cirurgia, conforme também relatado por Hauck e Oblak (2020).

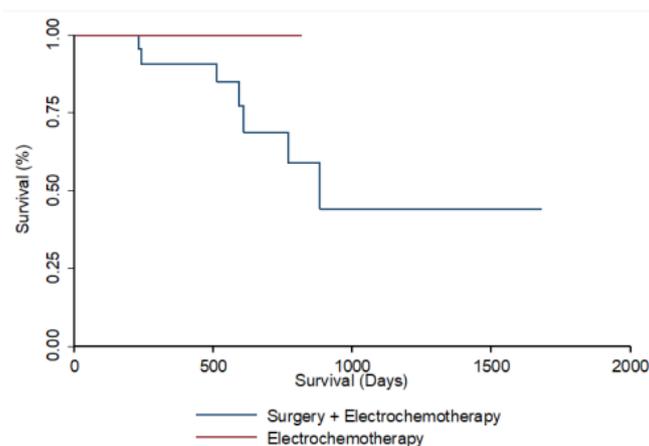


Figura 15 – Representação gráfica da sobrevida específica dos 32 animais com CCE em locais relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia + EQT (n = 26); EQT (n = 5) (p = 0,698).

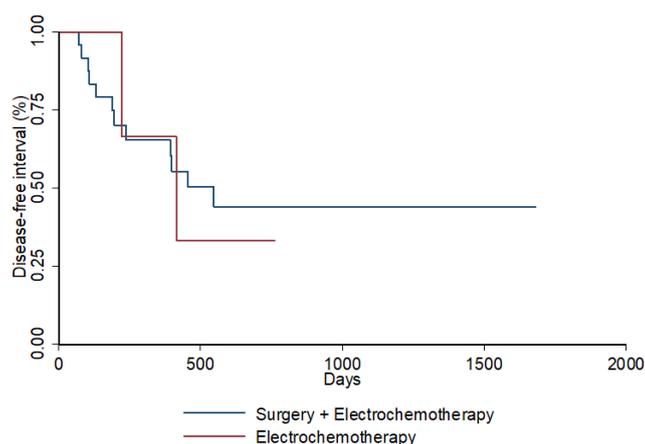


Figura 16 – Representação gráfica do intervalo livre de doença dos 32 animais com CCE em locais relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia + EQT (n = 26); EQT (n = 5) (p = 0,9012).

No grupo de animais com CCE em locais não relacionados à exposição solar, os animais do Grupo Cirurgia atingiram a mediana com 537 dias e os animais do grupo EQT não atingiram a mediana (p = 0,8207) (Fig. 17). A mediana do ILD foi de 945 dias para os animais do Grupo Cirurgia e 148 dias para os animais do Grupo EQT (Fig. 18) (p = 0,0241). Nenhum animal com tumor em local não relacionado à exposição solar foi tratado com cirurgia associada a EQT. Dos três animais do Grupo EQT, o animal 45 foi a óbito 2 dias após a sessão de EQT e apresentava tumor maior que 5 cm, mas não foi

realizada necropsia do animal para determinar o motivo do óbito e o animal 47 foi diagnosticado com leishmaniose refratária aos tratamentos, o que pode ter interferido com a resposta à EQT, já que a leishmaniose pode alterar a resposta imune (Campillo e Vázquez, 2002; Barbiéri, 2006). Nossa experiência sugere que cirurgia como modalidade de tratamento isolada pode ser uma melhor opção no tratamento de CCE não relacionado a exposição solar desde que seja possível a obtenção de margens limpas.

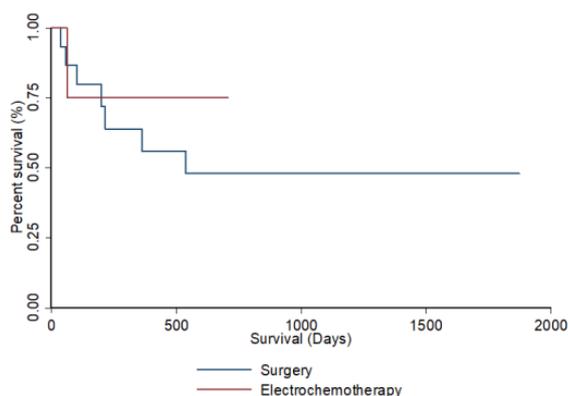


Figura 17 – Representação gráfica da sobrevida global dos 22 animais com CCE em locais não relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia (n = 17); EQT (n = 5) (p = 0,8207).

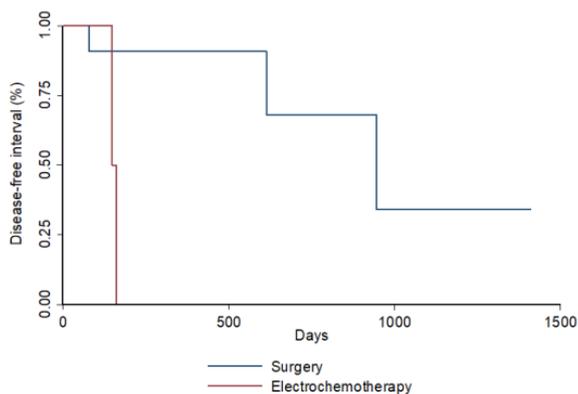


Figura 18 – Representação gráfica do intervalo livre de doença dos 22 animais com CCE em locais não relacionados à exposição solar, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia (n = 17); EQT (n = 5) (p = 0,0241).

Quando se comparou a sobrevida entre as modalidades terapêuticas, os animais do Grupo Cirurgia atingiram a mediana com 362 dias, os do Grupo Cirurgia + EQT atingiram a mediana com 884 dias e os animais do Grupo EQT não atingiram a mediana ($p = 0,0545$) (Fig. 19). A associação de cirurgia com EQT conferiu um benefício 32% maior em relação à abordagem somente cirúrgica ($HR = 0,32$, $p = 0,038$, $IC = 0,11-0,94$). A relação quanto ao benefício do tratamento entre animais do Grupo EQT com os animais do Grupo Cirurgia não foi significativa. De acordo com a revisão de literatura realizada, este é o primeiro estudo a avaliar a associação da cirurgia com a EQT para o tratamento do CCE canino. O protocolo de tratamento foi estabelecido de acordo com variáveis individuais (tamanho, localização e número de lesões), dentre as modalidades terapêuticas disponíveis, inclusive com associação destas, visando o melhor resultado possível para cada animal. Tratamentos locais são necessários para se conseguir intervalos livre de doença e sobrevida específica mais longos para o CCE. Qualidade de vida e preservação da função têm um papel cada vez mais importante para as diferentes opções de tratamento (Di Monta et al., 2017).

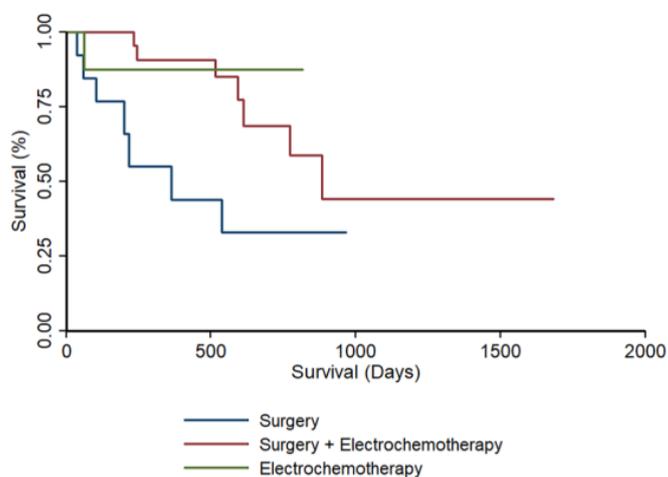


Figura 19 – Representação gráfica da sobrevida dos 54 animais com CCE, conforme a modalidade de tratamento: cirurgia ($n = 18$); cirurgia + EQT ($n = 26$); EQT ($n = 10$) ($p = 0,0545$).

Quando se compara a sobrevida de acordo com o número de sessões de EQT, os animais que não foram submetidos a nenhuma sessão (Grupo Cirurgia) atingiram a mediana com 362 dias, os animais submetidos a uma sessão atingiram a mediana com 884 dias e os animais submetidos a duas ou a três ou mais sessões não atingiram a

mediana ($p = 0,0001$) (Fig. 20). Os animais submetidos a duas sessões de EQT tiveram um risco de óbito 23% menor do que os animais tratados apenas com cirurgia ($HR = 0,23$, $p = 0,042$, $IC: 0,05-0,94$) e os animais submetidos a três ou mais sessões de EQT tiveram um risco de óbito 15% menor do que os animais tratados apenas com cirurgia ($HR = 0,15$, $p = 0,021$, $IC: 0,30-0,74$).

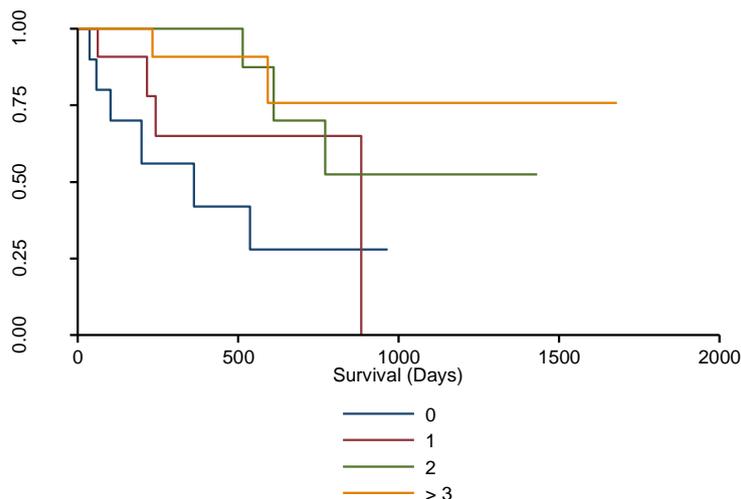


Figura 20 – Representação gráfica da sobrevivência global dos 54 animais com CCE, conforme o número de sessões de EQT: nenhuma sessão ($n = 15$); uma sessão ($n = 14$); duas sessões ($n = 12$); três ou mais sessões ($n = 13$) ($p = 0,0001$).

Dentre os animais deste estudo, 40,7% (22/54) apresentavam múltiplas lesões e 50% dos tumores apresentavam-se em estadió T3 (tumores maiores do que 5 cm). 44,4% (24/54) dos pacientes apresentavam históricos de lesões há 6 meses ou mais, alguns com lesões há mais de 3 anos. Destes, 45,8% (11/24) já haviam sido submetidos a tratamentos em outras clínicas, antes de serem encaminhados para o serviço de Oncologia do HV-UFMG.

Thomson (2007) sugere que a melhor chance de cura do CCE canino é a excisão cirúrgica com margens limpas. No entanto, muitos pacientes têm tumores múltiplos no momento do diagnóstico, o que dificulta a abordagem cirúrgica. Portanto, novas técnicas são necessárias para melhorar o resultado de cães com CCE cutâneo (Dos Anjos et al., 2019). Gargiulo et al. (2012) recomendaram fortemente o uso da EQT como uma terapia neoadjuvante nos casos de câncer de cabeça e pescoço não-melanoma

humanos em que o procedimento cirúrgico de primeira linha seria muito agressivo. Em casos com tumores múltiplos, as vantagens significativas da EQT quando comparada com cirurgia convencional é que tumores numerosos podem ser tratados ao mesmo tempo e apresenta bons resultados cosméticos, já que seu efeito em tecidos normais é mínimo, conforme descrito por Baltás et al. (2017). Assim, conforme observado também em vários relatos, a razão para o aumento no uso da EQT nas clínicas se deve às características favoráveis do tratamento, como alta eficácia, segurança, simplicidade, baixa toxicidade, possível aplicação ambulatorial e relação custo-benefício (Snoj et al., 2005; Marty et al., 2006; Sersa et al., 2008a; Colombo et al., 2008; Snøj et al., 2009; Moller et al., 2009; Testori et al., 2011; Mali et al., 2013).

Além do tipo histológico, radioterapia prévia e tumores grandes foram negativamente correlacionados com a resposta ao tratamento (Clover et al., 2020; Sersa et al., 2021). Os resultados de Mali et al. (2013) mostraram que a EQT foi menos efetiva em tumores maiores do que 3 cm, em comparação com tumores menores do que 3 cm. Por outro lado, a taxa de ausência de resposta mais do que dobrou em tumores maiores, quando comparados com tumores menores. Geralmente é aceito que lesões menores do que 3 cm tem uma resposta melhor do que lesões maiores do que 3 cm (Mir et al., 2006; Mali et al., 2013; Gehl et al., 2018; Edhemovic et al., 2020); no entanto, o valor de corte de 3 cm é discutível (Sersa et al., 2021).

A primeira explicação possível para a diminuição da eficácia da EQT em tumores maiores do que 3 cm que deve ser considerada é a concentração inadequada de quimioterápico no tumor devido ao “timing” da aplicação dos pulsos elétricos. A segunda razão, muito provável, da redução da eficácia da EQT em tumores grandes é a exposição insuficiente do tumor ao quimioterápico, devido à distribuição heterogênea do fluxo sanguíneo. Foi relatado que a periferia do tumor é consideravelmente melhor perfundida do que a porção central, portanto, sugerindo que a concentração da droga no centro do tumor pode ser menor do que na periferia. A terceira explicação possível pode ser a cobertura insuficiente de todo o volume tumoral com um campo elétrico suficientemente alto (Sersa et al., 2002; Sersa et al., 2003b; Sersa et al., 2008b; Mali et al., 2013).

Estudos clínicos desenvolvidos por Quaglini et al. (2008); Campana et al. (2009) e Gehl et al. (2018), relataram que o resultado da EQT em tumores grandes pode

ser melhorado com repetidos tratamentos. Além disso, re-tratamento com EQT não é recomendado apenas para se conseguir uma melhor resposta em tumores grandes, mas também em tumores pequenos não-responsivos à primeira sessão de EQT. De acordo com Mali et al. (2013), a melhor maneira de tratar tumores grandes deve incluir um plano de tratamento individualizado, o que foi realizado no presente estudo.

Silveira et al. (2010), estudando a EQT em neoplasias epiteliais ou mesenquimais em pele ou mucosa de cães observaram que o número de sessões de EQT necessárias para a remissão neoplásica integral oscilou entre os animais (uma a três). A maioria dos cães apresentou regressão tumoral completa (n = 30) (88,3%). Apenas quatro neofomações (11,7%) não apresentaram resposta satisfatória após duas sessões, três delas eram CCE.

Dos Anjos et al. (2019) observaram uma redução no tamanho de CCEs após o tratamento com EQT, mesmo em cães com tumores pobremente diferenciados. Quatro lesões (em quatro pacientes diferentes) apresentaram progressão da doença. Destas quatro lesões, duas tinham tumores com volumes grandes. De acordo com os seus resultados, estes autores afirmam que a EQT pode ser uma boa opção terapêutica para tumores pequenos, enquanto tumores grandes podem necessitar de mais de uma sessão de EQT (Dos Anjos et al., 2019).

Os pacientes dos Grupos Cirurgia + EQT e EQT toleraram bem a EQT e nenhum efeito colateral local ou sistêmico importante foi observado. Contrações musculares foram observadas durante a aplicação dos pulsos elétricos, mas não eram mais observadas assim que se interrompia a aplicação dos pulsos elétricos. Após o tratamento, nenhum dos animais apresentou infecção local ou sistêmica. Este resultado está de acordo com o que é relatado na literatura para EQT isoladamente ou em adjuvância (Tozon et al., 2005; Spugnini et al., 2007; Kodre et al., 2009; Spugnini et al., 2019)

Apenas os animais do Grupo Cirurgia + EQT foram avaliados com relação à deiscência, sendo que 61,5% (16/26) destes animais não apresentaram deiscência, enquanto 34,6% (9/26) apresentaram deiscência leve e apenas 3,8% (1/26) apresentaram deiscência moderada (Fig. 21). Este foi o efeito colateral mais importante observado. Spugnini et al. (2007) observaram 13,6% (3/22) de deiscência grave, em que houve atraso na cicatrização e necessidade de debridamento cirúrgico ao avaliar a resposta ao

tratamento de sarcomas de tecido mole em cães. Os três pacientes tinham tumores grandes.



Figura 21 – Cão da raça Dogo Argentino apresentando CCE na região do prepúcio (16a), resultado após cirurgia conservativa com EQT (16b) e aspecto da deiscência 30 dias após o procedimento (16c).

Para a maioria dos animais do Grupo EQT, necrose tumoral foi observada na primeira semana após a EQT, com a formação de uma crosta superficial da segunda à quarta semana após o tratamento, que se desprendia naturalmente em cinco a oito semanas. Em alguns casos, os nódulos regrediam sem nenhum sinal de necrose, principalmente nos nódulos pequenos. Isso também foi observado por Kodre et al. (2009) ao avaliar a EQT no tratamento de mastocitomas cutâneos caninos e Silveira et al. (2010) em tumores epiteliais e mesenquimais na pele ou mucosa dos cães.

O animal 45 foi a óbito 2 dias após a sessão de EQT e apresentava tumor maior que 5 cm, mas não foi realizada necropsia do animal. No entanto, é necessário cuidado já que alguns efeitos colaterais graves à destruição maciça do tumor podem acontecer, como síndrome da lise tumoral e tromboembolismo pulmonar causado pela liberação de fatores protrombóticos pelos tumores, conforme descrito por Spugnini e Porrello, (2003) e Spugnini et al. (2016).

Quando se considera o RECIST, 61,2% (30/49) dos animais apresentaram resposta completa (RC), 28,6% (14/49) apresentaram resposta parcial (RP) e 10,2% (5/49) apresentaram doença progressiva (DP), totalizando 89,8% (44/49) de resposta objetiva (RO). Os animais que tiveram RC atingiram a mediana do ILD com 945 dias, os animais com RP atingiram a mediana com 196 dias e os animais com DP atingiram a mediana com 79 dias ($p = 0,0001$) (Fig. 22). Os pacientes dos grupos Cirurgia + EQT e EQT apresentaram 51,5% (17/33) de RC e 39,4% (13/33) de RP, totalizando 90,9%

(30/33) de RO. Este resultado está de acordo com a literatura, em que a EQT apresenta RO de 70 a 94% em lesões cutâneas, subcutâneas e mucocutâneas primárias e metastáticas (Mir et al., 1997; Marty et al., 2006; Quaglino et al., 2008; Kodre et al., 2009; Spugnini et al., 2009; Silveira et al., 2010; Spugnini et al., 2010; Sersa et al., 2012).

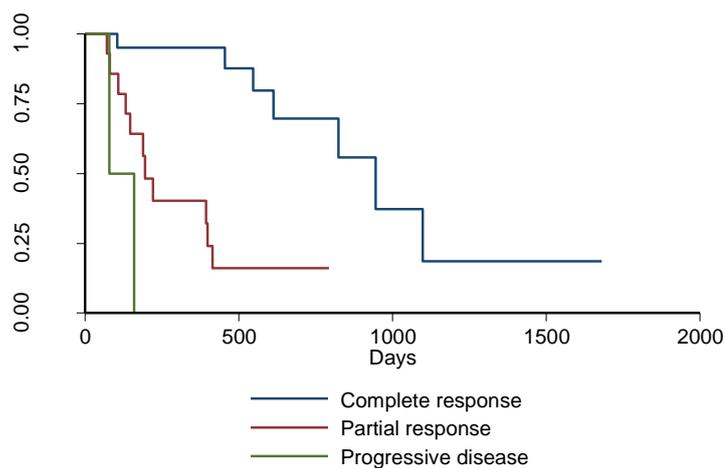


Figura 22 – Representação gráfica do ILD dos 49 animais com CCE, conforme o RECIST ($p = 0,0001$).

O fator prognóstico mais importante em todas as neoplasias humanas é o estadiamento clínico no momento do diagnóstico, que é a extensão anatômica da doença. Usando uma variedade de definições que indicam a disseminação anatômica do tumor, é possível classificar cada tumor em uma categoria que está associada com um resultado diferente (Ruffini et al., 2018).

Considerando o estadiamento clínico proposto para o CCE canino, adaptado de Bukhari et al. (2015) para CCE humano, não houve diferença nas proporções das classificações de estadiamento entre os grupos ($p = 0,213$) (Fig. 23) e o estadiamento não influenciou na sobrevivência dos animais (sobrevivência média dos pacientes de 584 dias) ($p = 0,67$) (Fig. 24). Os animais com estadiamento 1 foram preferencialmente tratados apenas com EQT e os animais com estadiamento 3 foram tratados preferencialmente com cirurgia ou com cirurgia associada a EQT. Este resultado demonstra o benefício da multimodalidade terapêutica, já que era esperado que os animais em estadiamento mais avançado apresentassem uma sobrevivência menor, mas como foram tratados com a associação de terapias locais, foi possível prolongar esta sobrevivência. Além disso,

considerando-se a população do estudo, de pacientes com longo histórico de evolução e estadio avançado, ainda foi possível conseguir uma sobrevida média bastante longa.

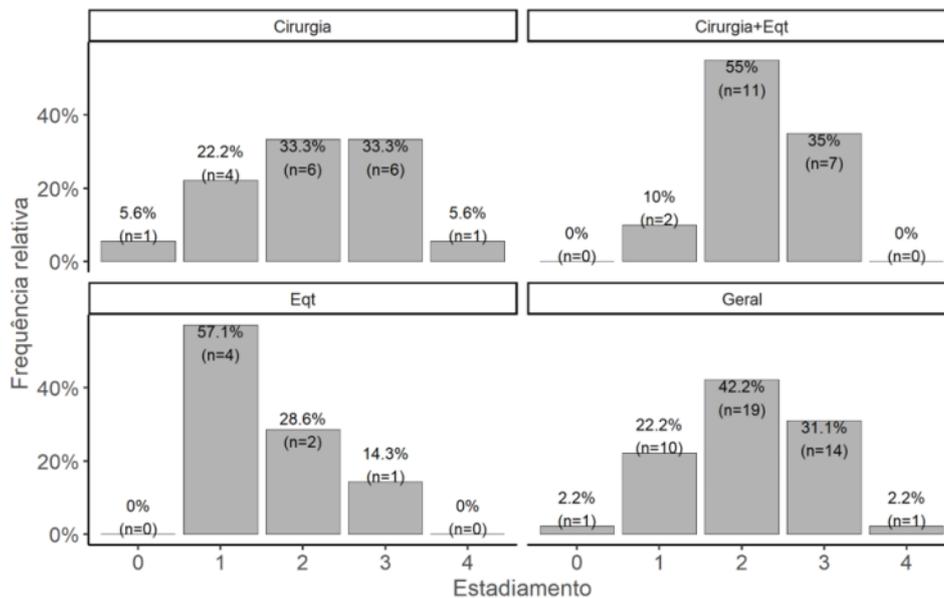


Figura 23 – Distribuição dos animais de acordo com o estadiamento em cada grupo de tratamento ($p = 0,213$).

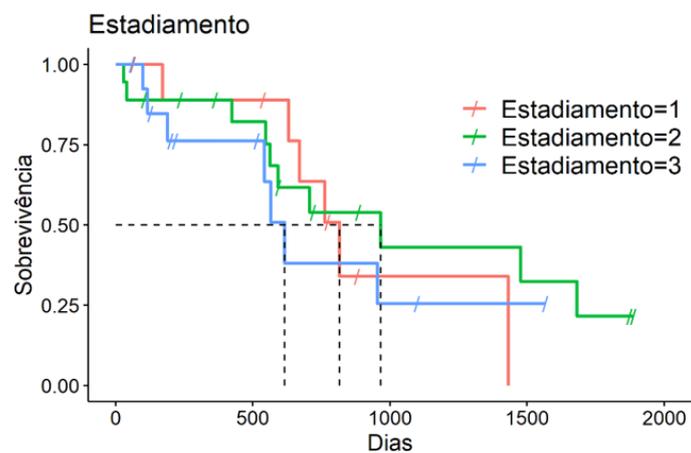


Figura 24 – Representação gráfica da sobrevida global dos 52 animais com CCE, conforme o estadiamento ($p = 0,67$).

Foram verificadas relações significativas entre estadiamento e idade ($p = 0,028$) e estadiamento e grau queratinização ($p = 0,05$) (Fig. 25). Animais mais jovens e tumores com menor grau de queratinização apresentaram estadiamento mais avançado. Não foram verificadas relações significativas entre estadiamento e estágio de invasão,

padrão de invasão, graduação de Broder, graduação de Bryne, escore de COX-2, subtipo histológico, pleomorfismo nuclear, figuras de mitose por 10 HPF, figuras de mitose bizarras, infiltrado linfoplasmocitário, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67) (Fig. 26).

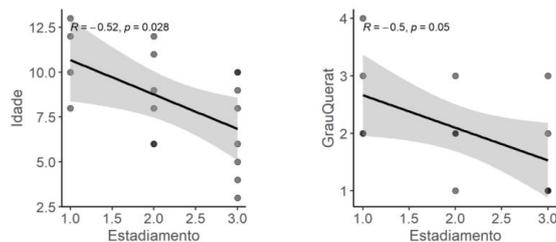


Figura 25 – O estadiamento clínico proposto para o CCE canino apresentou correlação com a idade ($p = 0,028$) e com o grau de queratinização ($p = 0,05$).

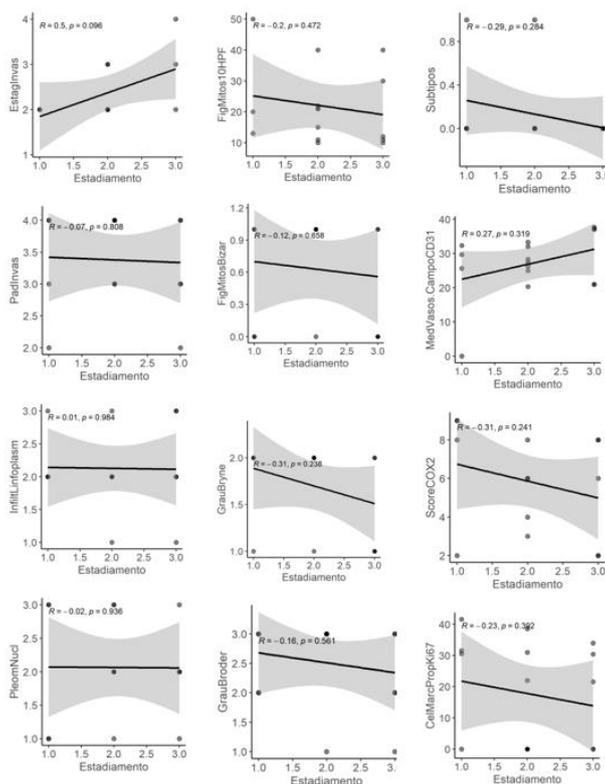


Figura 26 – O estadiamento clínico proposto para o CCE canino não apresentou correlação significativa com as variáveis: estágio de invasão, padrão de invasão, graduação de Broder, graduação de Bryne, escore de COX-2, subtipo histológico, pleomorfismo nuclear, figuras de mitose por 10 HPF, figuras de mitose bizarras, infiltrado linfoplasmocitário, média de número de vasos por campo (avaliado com a marcação de CD31) e taxa de proliferação (avaliado com a marcação de ki-67).

No presente estudo, 34,6% (18/52) dos animais apresentaram metástase para o linfonodo regional e/ou metástase à distância no momento do diagnóstico ou em algum momento ao longo do período de acompanhamento. A estes pacientes, foi oferecida complementação terapêutica com quimioterapia sistêmica (quatro ciclos de carboplatina a cada 21 dias, na dose de 300 mg/m²). Quando se avaliou o ILD de acordo com a presença ou ausência de metástase, os animais sem metástase atingiram a mediana com 945 dias, enquanto os animais com metástase atingiram a mediana com 394 dias ($p = 0,0304$) (Fig. 27).

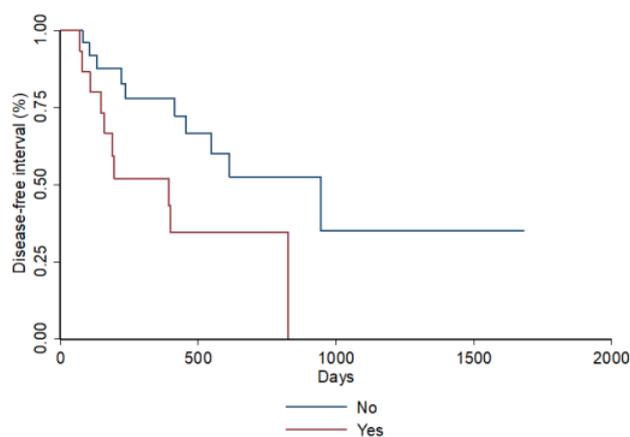


Figura 27 – Representação gráfica do ILD dos 52 animais com CCE, conforme a presença ou ausência de metástase ($p = 0,0304$).

Dos 31 animais com CCE cutâneo em áreas de exposição ao sol, 11 (35,5%) apresentaram metástase para o linfonodo regional e/ou metástase à distância no momento do diagnóstico ou em algum momento ao longo do período de acompanhamento (Fig. 28). Este valor difere do que é normalmente relatado na literatura, em que o CCE é um tumor localmente invasivo com uma taxa de metástase baixa (13%), semelhante à de CCE cutâneo em humanos (5%) (Withrow e Straw, 1990; Kirpensteijn et al., 1994; Rogers et al., 1995; Lascelles et al., 2000, Dos Anjos et al., 2019). As metástases normalmente ocorrem nos linfonodos locoregionais (Brougham et al., 2012; Schmults et al., 2013; Karia et al., 2014; Dos Anjos et al., 2019).

Dos 21 animais com CCE em áreas não relacionadas à exposição solar, 7 (33,3%) apresentaram metástase para o linfonodo regional e/ou metástase à distância no momento do diagnóstico ou em algum momento ao longo do período de acompanhamento.

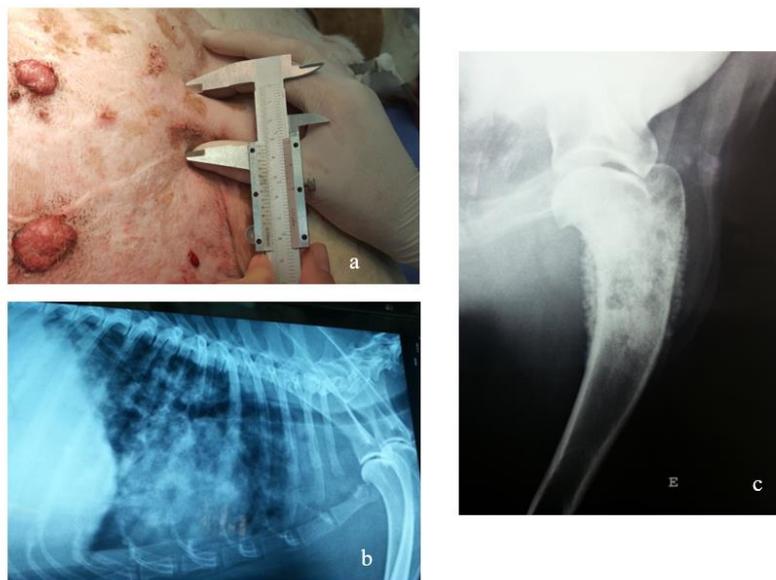


Figura 28 – Metástases de cães com CCE cutâneo em locais relacionados com exposição solar. a) Metástase em linfonodo axilar. b) Metástase pulmonar. c) Metástase óssea.

Quando se avaliou a sobrevida dos casos com metástase, os animais com tumores em locais relacionado com a exposição ao sol atingiram a mediana com 772 dias, enquanto os animais com tumores em locais não relacionados com a exposição ao sol atingiram a mediana com 199 dias ($p = 0,0373$) (Fig. 29).

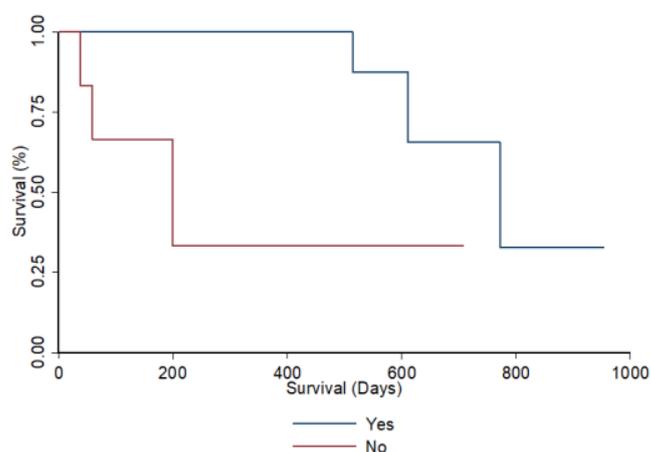


Figura 29 – Representação gráfica da sobrevida dos 18 animais com metástase de CCE, conforme a localização do tumor, se está em área relacionada com a exposição solar ou não ($p = 0,0373$).

Quando se avaliou os casos com metástase de acordo com o número de sessões de EQT, os animais do grupo 1 (zero sessões) atingiram a mediana com 59 dias, os animais que receberam duas sessões atingiram a mediana com 772 dias e os animais que receberam uma ou três sessões ou mais sessões não atingiram a mediana ($p < 0,0001$) (Fig. 30).

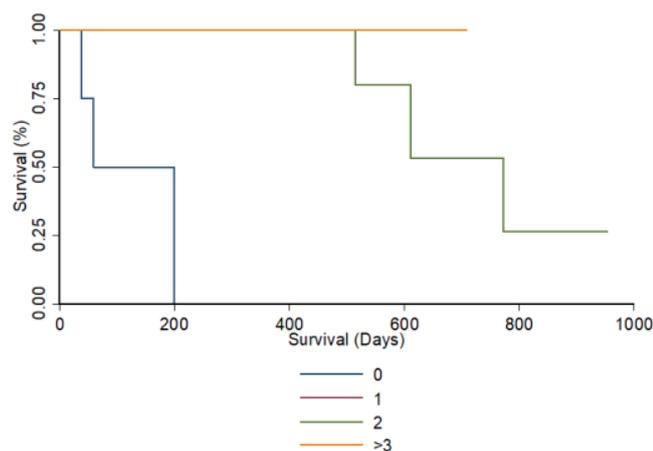


Figura 30 – Representação gráfica da sobrevivência dos 18 animais com metástase de CCE, conforme o número de sessões de EQT ($p < 0,0001$).

Dos Anjos et al. (2019) avaliaram CCE de cães tratados com EQT, e relataram que metástase para os linfonodos não foi um fator prognóstico em cães com CCE cutâneo. No entanto, os autores tiveram um número pequeno de cães com metástase para os linfonodos, o que dificultou as análises. De acordo com a literatura (Lascelles et al., 2000; Gross et al., 2009; Brodzki et al., 2014; Dos Anjos et al., 2019), o número e tamanho das lesões parece ser mais importante do que o envolvimento dos linfonodos locais. Este resultado pode ser explicado pelo comportamento do CCE cutâneo que é mais localmente invasivo do que metastático (Gross et al., 2009; Dos Anjos et al., 2019). 50% dos tumores deste estudo apresentavam-se em estágio T3 (tumores maiores do que 5 cm). 44,4% (24/54) dos pacientes apresentavam históricos de lesões há 6 meses ou mais, alguns com lesões há mais de 3 anos. Destes, 45,8% (11/24) já haviam sido submetidos a tratamento em outras clínicas, antes de serem encaminhados para o serviço de Oncologia do HV-UFMG. Com a multimodalidade terapêutica, foi possível intervir na evolução da doença, e os pacientes que antes seriam encaminhados para eutanásia por não se conseguir um controle local adequado da doença foram tratados

associando-se a EQT com a cirurgia, permitindo o controle local com qualidade de vida e prolongando a sobrevida global. Assim, observa-se o aumento na taxa de metástases, pois se trata de um tumor maligno com capacidade metastática. Mesmo os animais em estadio avançado (com metástase), tiveram uma sobrevida bastante expressiva (mediana de 772 dias para os tumores em locais relacionados com a exposição ao sol e mediana de 199 dias para os tumores em locais não relacionados com a exposição ao sol), o que mais uma vez demonstra, no presente estudo, o benefício da multimodalidade terapêutica.

5.2. Critérios histopatológicos e imuno-histoquímicos

Considerando a graduação histopatológica, 16,2% (6/37) foram bem diferenciados (grau 1 de Broder), 81,1% (30/37) foram moderadamente diferenciados (graus 2 e 3 de Broder) e 2,7% (1/37) foram pobremente diferenciados (grau 4 de Broder) (Goldschmidt e Goldschmidt, 2017). Este resultado difere do encontrado por Dos Anjos et al. (2019), que encontraram 83,3% (15/18 lesões) classificadas como CCE bem diferenciado e 16,6% (3/18 lesões) classificadas como CCE pobremente diferenciado. Esta diferença provavelmente se deve ao longo tempo de evolução destes pacientes até serem encaminhados ao HV-UFMG. Os animais com tumores grau 1 atingiram a mediana com 593 dias, os animais com tumores grau 2 atingiram a mediana com 103 dias e os animais com tumores grau 3 e 4 não atingiram a mediana ($p = 0,03$) (Fig. 31). A maioria dos cães com grau 3 e 4 foi tratada com EQT, associada ou não a cirurgia (Tab. 5), favorecendo a multimodalidade terapêutica para melhor controle do CCE, principalmente de graduação mais alta. O grau de diferenciação histopatológico é um critério prognóstico importante e útil para CCE cutâneo humano (UICC, 1997). Em uma grande revisão de literatura humana, Rowe et al. (1992) mostraram um aumento maior que duas vezes na taxa de recorrência local (13,6% para 28,6%) e um aumento de mais de três vezes na taxa de metástase (9,2% para 32,8%) para carcinomas pobremente diferenciados (graus 3 e 4 de Broder) quando comparados com tumores bem ou moderadamente diferenciados de grau 1 e 2 de Broder. No entanto, também é sabido que lesões bem diferenciadas são capazes de metastatizar. Assim, e ainda segundo Rowe et al. (1992) e Peter e Haustein (1998), não se pode basear o prognóstico em apenas um critério para o CCE cutâneo.

As graduações de Bryne ($p = 0,072$) e Broder ($p = 0,083$) apresentaram resultados marginalmente significativos, sendo que os tumores em locais relacionados à exposição solar tiveram graduações mais altas do que os tumores não relacionados à exposição solar (Fig. 32). É provável que se aumentarmos o tamanho amostral estas diferenças se tornem significativas.

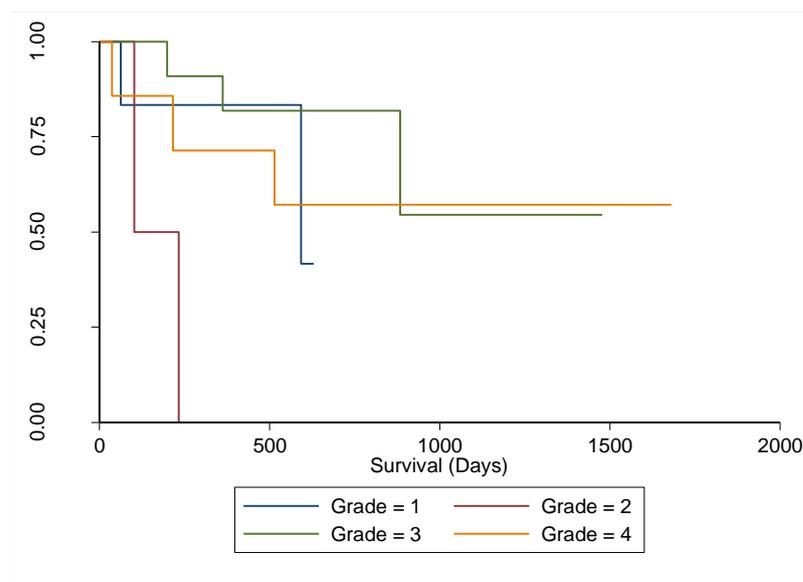


Figura 31 – Representação gráfica da sobrevida global dos 37 animais com CCE, conforme a graduação histopatológica ($p = 0,03$).

Tabela 5 – Frequência (número e porcentagem) de animais tratados de acordo com o grau histológico ($p > 0,05$).

Graduação	Tratamento (0 - cirurgia; 1 - cirurgia e eqt; 2 - eqt)			Total
	0	1	2	
1	4 50.00 28.57	3 37.50 16.67	1 12.50 20.00	8 100.00 21.62
2	2 50.00 14.29	2 50.00 11.11	0 0.00 0.00	4 100.00 10.81
3	5 31.25 35.71	9 56.25 50.00	2 12.50 40.00	16 100.00 43.24
4	3 33.33 21.43	4 44.44 22.22	2 22.22 40.00	9 100.00 24.32
Total	14 37.84 100.00	18 48.65 100.00	5 13.51 100.00	37 100.00 100.00

Pearson chi2(6) = 2.1934 Pr = 0.901
Fisher's exact = 0.942

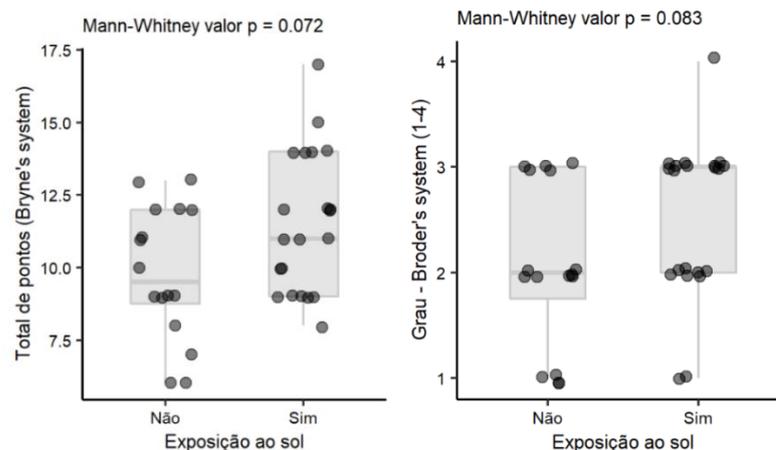


Figura 32 - Os tumores em locais relacionados à exposição solar tiveram total de pontos de Bryne ($p = 0,072$) e graduação de Broder ($p = 0,083$) marginalmente maiores do que os tumores em locais não relacionados à exposição solar.

O padrão de invasão ($p = 0,018$) e o pleomorfismo nuclear ($p = 0,026$) também apresentaram diferenças significativas entre os grupos, sendo que o grupo com lesões em áreas de exposição ao sol apresentou valores significativamente maiores do que o grupo com lesões em áreas sem exposição ao sol (Fig. 33). Apesar de apresentar fatores prognósticos mais agressivos, foi verificada uma diferença significativa na sobrevida entre o grupo com tumores relacionados à exposição solar quando comparado com o grupo com tumores não relacionados à exposição solar, sendo que o grupo exposto ao sol apresentou uma sobrevida maior ($p = 0,001$) (Fig. 14). Os autores acreditam que isso se deve à programação terapêutica individualizada dos pacientes, com a associação da cirurgia com a EQT.

O estágio de invasão foi avaliado considerando-se: I – carcinoma *in situ*; II – invasão da derme ou submucosa; III – invasão de músculos, gânglios nervosos, glândulas e tecido adiposo adjacente e; IV – invasão profunda, incluindo de tecido ósseo. Quando se avaliou o ILD de acordo com o estágio de invasão, os animais com estágio II atingiram a mediana com 547 dias, os animais com estágio III atingiram a mediana com 189 dias ($p < 0,0001$). Havia apenas um animal com estágio IV de invasão e, portanto, não foi possível calcular a mediana (Fig. 34). 25% (2/8) dos animais com estágio de invasão 3 ou 4, apresentaram metástase no momento do diagnóstico ou ao longo do período de evolução, o que está de acordo com Khanna et al. (2002) e Gross et

al. (2009) de que as lesões com invasão muscular, cartilaginosa ou óssea, apresentam um potencial metastático de aproximadamente 20%.

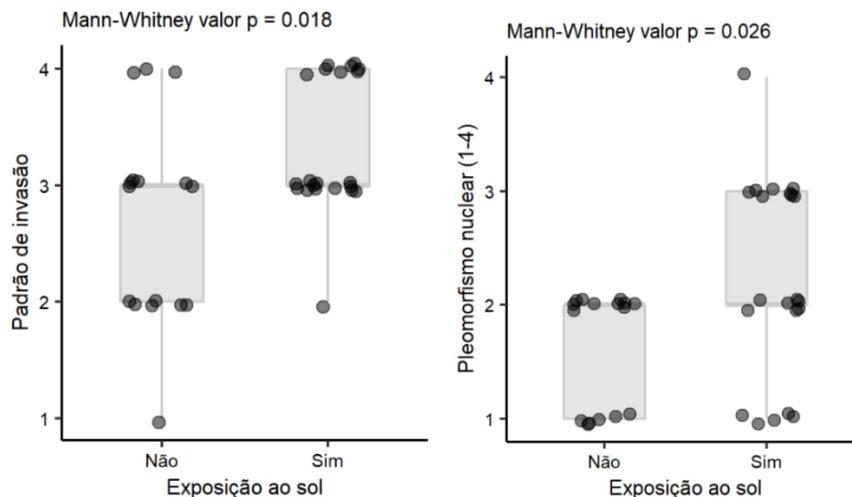


Figura 33 – Os tumores em locais relacionados à exposição solar tiveram valores de padrão de invasão ($p = 0,018$) e de pleomorfismo nuclear ($p = 0,026$) significativamente maiores do que os tumores em locais não relacionados à exposição solar.

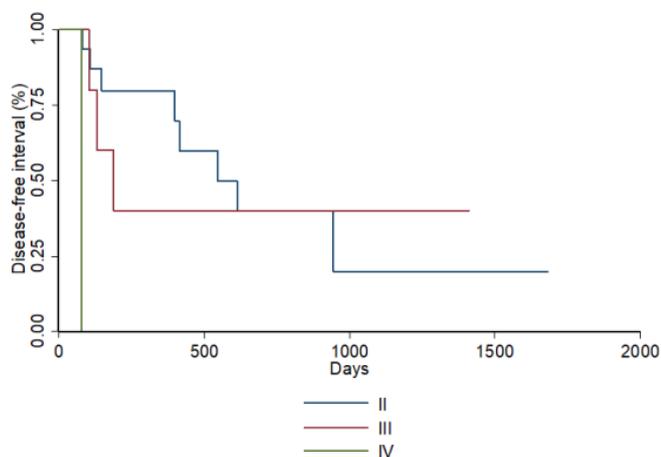


Figura 34 – Representação gráfica do ILD dos 27 animais com CCE, conforme o estágio de invasão ($p < 0,0001$).

Grau de queratinização, número de mitoses por 10 HPF, infiltrado linfoplasmocitário, estágio de invasão, subtipo, grau de Bryne, média de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD31), escore de COX-2 e taxa de proliferação (avaliada pela marcação com ki-67) não mostraram diferença

estatisticamente significativa quando se comparou os tumores em locais relacionados com exposição solar com os tumores em locais não relacionado à exposição solar (Fig. 35).

O número de figuras de mitose não se correlacionou com a média de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD31), nem com o escore de COX-2 (Fig. 36). A média de número de vasos por campo não se correlacionou com a taxa de proliferação (avaliada pela marcação com ki-67) nem com o escore de COX-2 (Fig. 37). A taxa de proliferação (avaliada pela marcação com ki-67) não se correlacionou com o escore de COX-2 (Fig. 38).

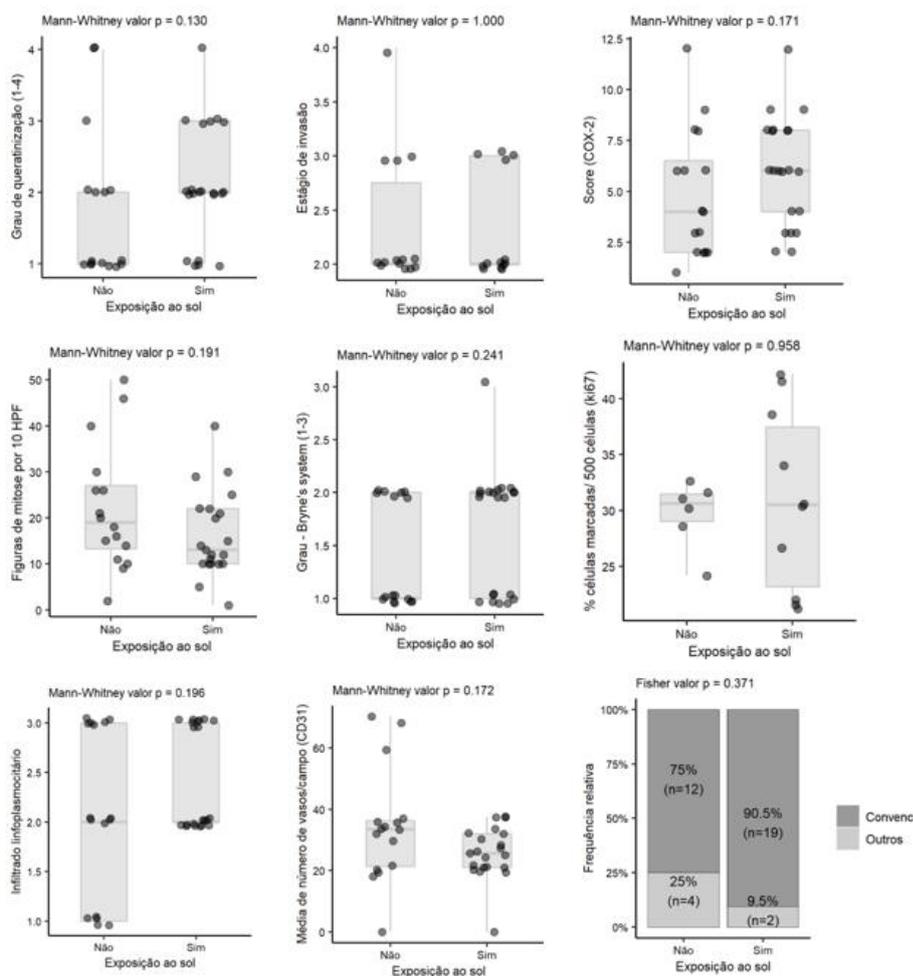


Figura 35 – Avaliação dos tumores em locais relacionados com a exposição solar ou não com relação a grau de queratinização, figuras de mitose por 10 HPF, infiltrado linfoplasmocitário, estágio de invasão, graduação de Bryne, número de vasos por campo (CD31), escore de COX-2, taxa de proliferação (ki-67), subtipo. Não houve significância estatística para essas variáveis.

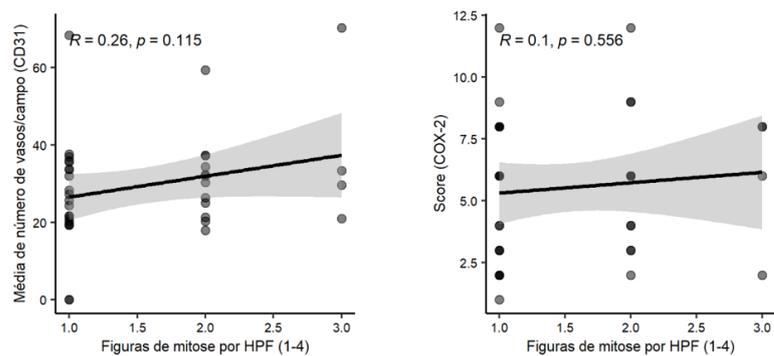


Figura 36 – Avaliação da correlação do número de figuras de mitose com a média de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD31) e com o escore de COX-2.

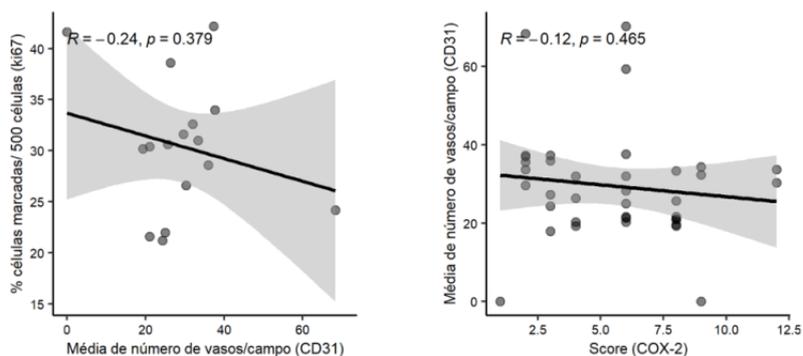


Figura 37 – Avaliação da correlação do número de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD31) com o escore de COX-2 e com a taxa de proliferação (avaliado pela marcação com ki-67).

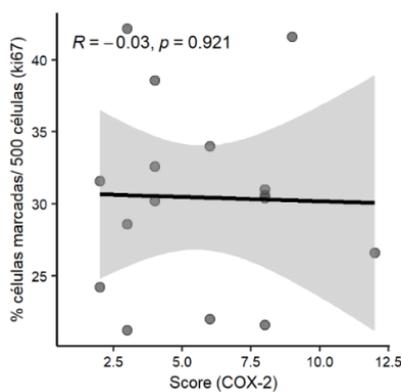


Figura 38 – Avaliação da correlação do escore de COX-2 com a taxa de proliferação (avaliado pela marcação com ki-67).

Acredita-se que as prostaglandinas têm um papel no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer (Howe, 2007). O primeiro passo na síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico é regulado por uma por uma enzima sintetase de prostaglandina, chamada de cicloxigenase (COX) (Almeida et al., 2001). A COX-1 modula respostas fisiológicas como a regulação da homeostase vascular e renal (Buckman et al., 1998). A COX-2 usualmente está ausente na maioria dos tecidos normais, mas pode ser induzida em resposta a promotores tumorais, carcinógenos, citocinas e fatores de crescimento. O aumento na expressão de COX-2 foi demonstrado em várias neoplasias caninas, assim como seu papel na carcinogênese (Nardi et al., 2005; Lavallo et al., 2009; Poggiani et al., 2012).

Semelhante ao relatado por Almeida et al. (2001) e Bardagi et al. (2012), todos os tumores avaliados mostraram imunoreatividade para COX-2. A extensão e intensidade da marcação com COX-2 variaram entre os tumores e não houve correlação entre localização e escore de COX-2 (Fig. 35). Os tumores se originaram de diferentes localizações anatômicas, sem predileção de expressão de COX-2 para um local específico, porque todos os casos contiveram células marcadas. Além disso, 56,7% (21/37) dos tumores avaliados apresentaram escore de COX-2 elevado. A expressão de COX-2 em todos os tumores e expressão elevada em mais da metade dos tumores indica o valor preditivo do escore de COX-2 e a necessidade de se avaliar o uso de inibidores de COX-2 no tratamento e prevenção de CCE não só cutâneo, mas nas outras localizações também.

No estudo de Poggiani et al. (2012), também não foi observada correlação entre a expressão de COX-2 e a proliferação celular avaliada pela marcação com ki-67 e estes autores sugerem que estes dois marcadores não devem ser usados como uma ferramenta prognóstica em cães com CCE (Poggiani et al., 2012). No entanto, os autores acreditam que este resultado mais provavelmente se deve ao baixo número amostral e que mais estudos são necessários para confirmar o valor prognóstico da expressão de COX-2 e ki-67 em CCE canino.

Angiogênese, a formação de microvasculatura, é essencial para o crescimento e metástase de tumores malignos (Folkman, 1995). A expressão aumentada de VEGF foi correlacionada com o grau histológico em muitos tumores humanos (Du et al., 2003; Tse et al., 2004). Além disso, a relação entre o grau de angiogênese e outros parâmetros

como taxa de proliferação e taxa de apoptose tumorais foi extensivamente estudada no câncer humano (Koide et al., 1999). Na literatura veterinária, a associação entre angiogênese, taxa de proliferação e taxa de apoptose foi avaliada em alguns tumores caninos (Martin De Las et al., 1999; Maiolino et al., 2000; Maiolino et al., 2001; Restucci et al., 2000; Restucci et al., 2002; Restucci et al., 2003; Rawlings et al., 2003; Restucci et al., 2004; Lavalle et al., 2009).

No presente estudo, 94,6% dos tumores avaliados apresentaram expressão de CD31. Al-Dissi et al. (2007), detectaram VEGF em 89% dos CCE caninos e houve uma correlação moderada entre o grau histológico e a expressão de VEGF e VEGFR-2; no entanto, não foi observada correlação entre iMVD e expressão de VEGF nem entre iMVD e grau histológico. A ausência de diferenças na expressão CD31 entre os diferentes graus histológicos pode ser devido ao pequeno tamanho das amostras (Al-Dissi et al., 2007).

As discrepâncias do significado prognóstico da angiogênese em tumores pode ser explicada pelo fato de que vários anticorpos podem ser usados para marcar vasos em um tecido, e a escolha do anticorpo vai influenciar o número de microvasos disponíveis para contagem (Maiolino et al., 2001). O anticorpo monoclonal JC70 que reconhece a glicoproteína de membrana CD31 foi escolhido por ser um marcador de endotélio mais sensível e por não reagir com endotélio linfático (Kuzu et al., 1992; Charpin et al., 1997; Maiolino et al., 2001). Além disso, a maioria das lesões de CCE são proliferativas e frequentemente ulceradas (Evans e Shofer, 1988; Nemeč et al., 2012), o que também foi observado nas lesões do presente estudo. A lesão ulcerativa resulta em intenso processo inflamatório que não se correlaciona bem com as características morfológicas do CCE. Em outras palavras, ulceração é um fator importante de confundimento para a interpretação da inflamação nesses casos. 86,5% (32/37) dos tumores avaliados apresentaram infiltrado inflamatório intenso, não sendo possível avaliar campos sem inflamação. Como a inflamação pode causar neovascularização, a avaliação da neovascularização tumoral ficou prejudicada, não sendo possível estabelecer a correlação com a graduação tumoral (Coussens e Werb, 2002; Balkwill et al., 2005; Visser e Coussens, 2006; Brasileiro Filho et al., 2006).

Um fator importante a se considerar quando se avalia o CCE cutâneo é a proliferação celular, que é mensurada por marcadores de proliferação. Entre os

marcadores de proliferação, ki-67 é um dos mais utilizados em estudos. Durante a proliferação celular, a proteína ki-67 é expressa em diferentes fases do ciclo celular, incluindo as fases G1, S, G2 e M (Scase et al., 2006; Bergkvist et al., 2011; Pereira et al., 2013; Brodzki et al., 2014; Dos Anjos et al., 2019). Portanto, é altamente sensível para identificar células em proliferação.

Ki-67 foi avaliado em muitos tumores caninos (Griffey et al., 1999; Martin De Las et al., 1999; Roels et al., 1999; Philips et al., 2000; Zarchetti et al., 2003; Scase et al., 2006; Kadthur et al., 2011; Poggiani et al., 2012; Horta et al., 2018). A expressão de ki-67 é um indicador prognóstico útil em mastocitoma e tumores de mama caninos (Kadthur et al., 2011; Horta et al., 2018). No câncer de pulmão canino, CCE diferiu de outros tipos histológicos por ter índices de proliferação significativamente maiores (Griffey et al., 1999).

A expressão aumentada de ki-67 foi correlacionada com doença metastática, pequeno ILD e baixa sobrevida em cães e humanos (Batinac et al., 2006; Scase et al., 2006; Bergkvist et al., 2011; khodaeiani et al., 2013; Pereira et al., 2013; Brodzki et al., 2014; Xie et al., 2016; Dos Anjos et al., 2019). No trabalho de Dos Anjos et al. (2019), o índice mitótico médio foi de 4,94 (0 a 34) e os autores observaram uma relação entre o índice mitótico e a sobrevida global. Animais com índices mitóticos menores que 4.9 tiveram uma sobrevida maior do que os animais com índices mitóticos maiores que 4.9 (Dos Anjos et al., 2019). No estudo de Al-Dissi et al., (2007), houve uma correlação entre a expressão de VEGF e VEGFR-2 e a taxa de proliferação em CCE, mas não houve diferença na média da taxa de proliferação com o nível da expressão de VEGF ou VEGFR-2. A correlação entre a angiogênese (avaliada pela marcação com CD31) e a taxa de proliferação também não foi observada no presente estudo.

Dos tumores avaliados, 56,7% (21/37) não apresentaram marcação para ki-67. Este foi um estudo realizado com casuística e, portanto, não houve um controle do processamento do material coletado, o que pode ter influenciado na qualidade da análise imuno-histoquímica. Devido ao baixo número amostral, não foi possível conseguir um resultado estatisticamente significativo para este fator prognóstico.

Dos tumores avaliados, 83,8% (31/37) foram classificados como subtipo convencional, enquanto 16,2% (6/37) foram classificados em outros subtipos (verrucoso - 1, papilar - 3 e basalóide - 2). Não houve diferença na sobrevida entre o subtipo

convencional e os outros subtipos ($p = 0,43$), no entanto, os tumores classificados como outros subtipos tiveram valores significativamente maiores de taxa de proliferação avaliada pela porcentagem de células marcadas por ki-67 ($p = 0,078$) e figuras de mitose por HPF ($p = 0,020$) (Fig. 39). Não houve diferença entre o subtipo convencional e os outros subtipos com relação a score de cox-2 ($p = 0,195$) e número de vasos ($p = 0,902$) (Fig. 40).

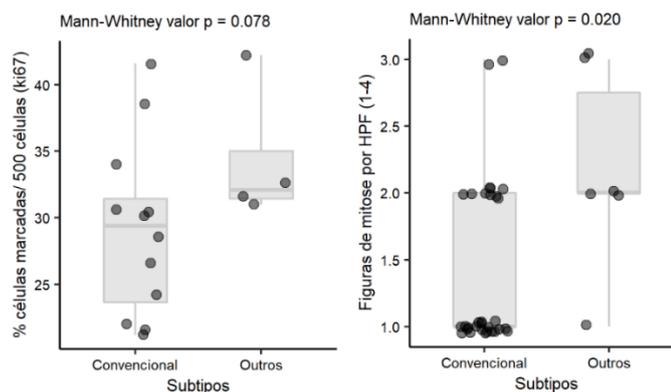


Figura 39 – Os tumores de subtipo convencional tiveram valores significativamente menores de ki-67 ($p = 0,078$) e figuras de mitose ($p = 0,020$) do que os tumores de outros subtipos.

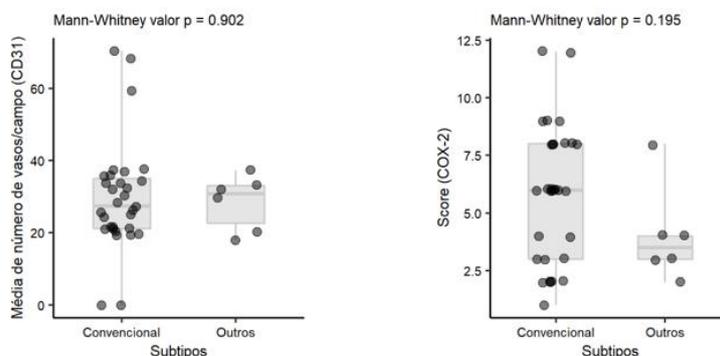


Figura 40 – Avaliação da correlação do subtipo histológico com o escore de COX-2 e com a média de número de vasos por campo (avaliado pela marcação com CD-31).

6. CONCLUSÕES

Eletroquimioterapia (EQT) é um procedimento de curta duração e prático em sua execução, não apresentando toxicidade atribuível à administração de bleomicina, com bom custo-benefício e poucas complicações trans e pós-terapêuticas. Representa uma

escolha favorável em termos de efetividade, evitando cirurgia agressiva e fornecendo um efeito antineoplásico com bom resultado estético e preservação da função.

A multimodalidade terapêutica se mostrou eficiente a fim de se obter o melhor controle do carcinoma de células escamosas (CCE) em cães, e deve ser planejada individualmente, de acordo com as características de cada paciente. Não houve diferença nas proporções das classificações de estadiamento entre os grupos e o estadiamento não influenciou na sobrevida dos animais (sobrevida média dos pacientes de 584 dias). Considerando-se a população do estudo, foi possível conseguir uma sobrevida média bastante significativa.

O CCE em cães tem um comportamento biológico variável, de acordo com a localização. Os CCE cutâneos em locais relacionados com exposição ao sol apresentaram características histopatológicas mais agressivas, mas apresentaram maior sobrevida. A associação de cirurgia com EQT conferiu um benefício 32% maior em relação à abordagem somente cirúrgica. A repetição de sessões de EQT favorece a resposta em pacientes com lesões grandes. As metástases podem ocorrer, quando há um tempo de evolução da doença suficientemente longo.

Não foi possível estabelecer critérios prognósticos para o CCE canino. Mais estudos são necessários para se compreender a importância da graduação, escore de COX-2, angiogênese e taxa de proliferação no estadiamento e evolução do CCE canino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DISSI, A. N.; HAINES, D. M.; SINGH, B.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Associated with Tumor Cell Proliferation in Canine Cutaneous Squamous Cell Carcinomas and Trichoepitheliomas. *Veterinary Pathology*, v. 44, p. 823–830, 2007.

ALMEIDA, E. M. P.; PICHÉ, C.; SIROIS, J.; DORÉ, M. Expression of Cyclooxygenase-2 in Naturally Occurring Squamous Cell Carcinomas in Dogs. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 49, p. 867–875, 2001.

ANDERSEN, M. H.; GEHL, J.; REKER, S.; et al. Dynamic changes of specific T cell responses to melanoma correlate with IL-2 administration. *Seminars in Cancer Biology*, v. 13, p. 449–459, 2003.

ARBABI, S.; ROSENGART, M. R.; GARCIA, I.; et al. Epithelial cyclooxygenase-2 expression: a model for pathogenesis of colon cancer. *The Journal of Surgical Research*, v. 97, p. 60–4, 2001.

ARDUINO, P. G.; CARROZZO, M.; CHIECCHIO, A.; et al. Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 66, p. 1570-1579, 2008.

AULER, P. A.; GAMBA, C. O.; HORTA, R. S.; et al. Metastatic well differentiated squamous cell carcinoma in the prepuce of a dog: a report of clinicopathological, immunophenotypic and therapeutic approach. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p.1317-1322, 2014.

AXELSSON, K.; LJUNG, B. E.; MOORE, D. H.; et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 87, p. 997–1008, 1995.

BAAK, J. P. A.; KURVER, P. H. J.; DE SNOO-NIEWLAAT, A. J. E.; et al. Prognostic indicators in breast cancer - morphometric methods. *Histopathology*, v. 6, p. 327±339, 1982.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*, v. 7, p. 211-217, 2005.

BALTÁS, E.; KIS, E.; NAGY, N.; et al. Electrochemotherapy for Non-melanoma Skin Cancer in a Child with Xeroderma Pigmentosum. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 97, p. 962-964, 2017.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology*, v. 28, p. 329-337, 2006.

BARDAGÍ, M.; FONDEVILA, D.; FERRER, L. Immunohistochemical detection of COX-2 in feline and canine actinic keratoses and cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, v. 146, p. 11-17, 2012.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon, p. 107-208, 2005.

BATINAC, T.; ZAMOLO, G.; COKLO, M.; et al. Expression of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Pathology, Research and Practice*, v. 202, p. 599–607 2006.

BEAM, S. L.; RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; et al. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. *Veterinary Pathology*, v.40, p.496-500, 2003.

BERGKVIST, G. T.; ARGYLE, D. J.; MORRISON, L.; et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ki67 in feline oral squamous cell carcinomas (FOSCC). *Veterinary Comparative Oncology*, v. 9, p. 106–117, 2011.

BEVIER, D. F.; GOLDSCHMIDT, M. H. Skin tumors in the dog. Part I: Epithelial tumors and tumor-like lesions. *Compendium Continuous Education*, v. 3, p. 389–98, 1981.

BLACK, M. M.; SPEER, F. D. Nuclear structure in cancer. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, v. 105, p. 97-102, 1957.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo: Patologia*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v. 14, p. 309-354, 1970.

BREGMAN, C. L.; HIRTH, R. S.; SUNDBERG, J.P.; et al. Cutaneous neoplasms in dogs associated with canine oral papillomavirus vaccine. *Veterinary Pathology*, v. 24, p. 477–487, 1987.

BRODZKI, A.; LOPUSZYŃSKI, W.; BRODZKI, P.; TATARA, M. Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with Ki-67 in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. *Folia Biologica (Kraków)*, v. 62, p. 235–241, 2014.

BROUGHAM, N. D.; DENNETT, E. R.; CAMARON, R.; TAN, S. T. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *Journal of Surgical Oncology*, v. 106, p. 811–815, 2012.

BUCKMAN, S. Y.; GRESHAM, A.; HALE, P.; et al. COX-2 Expression Is Induced by UVB Exposure in Human Skin: Implications for the Development of Skin Cancer. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 723-729, 1998.

BUCKOWSKI, J. A.; WARTENBERG, D. An alternative approach for investigating the carcinogenicity of indoor air pollution: Pets as sentinels of environmental cancer risk. *Environmental Health Perspectives*, v. 105, p.1312, 1997.

BUCKOWSKI, J. A.; WARTENBERG, D.; GOLDSCHMIDT, M. Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 54, p. 579, 1998.

BUKHARI, M. H.; SABA, K.; QAMAR, S.; et al. Histopathological and Immunohistochemistry Observations Based Bukhari Grading for Squamous cell carcinoma. *Acta Medica International*, v. 2, p. 54-60, 2015.

BUNDGAARD, T.; SORENSEN, F. B.; GAIHEDE, M.; et al. Stereologic, histopathologic, flow cytometric, and clinical parameters in the prognostic evaluation of 74 patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Cancer*, v. 70, p. 1-13, 1992.

CALLAN, M. B.; PREZIOSI, D.; MAULDIN, E. Multiple papillomavirus-associated epidermal hamartomas and squamous cell carcinomas *in situ* in a dog following chronic treatment with prednisone and cyclosporine. *Veterinary Dermatology*, v. 16, p. 338–345, 2005.

CALVET, C. Y.; FAMIN, D.; ANDRE, F. M.; et al. Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. *Oncoimmunology*, v.3, p. e28131, 2014.

CALVET, C. Y.; MIR, L. M. The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy. *Cancer Metastasis Review*, v. 35, p. 165–177, 2016.

CAMPANA, L. G.; MOCELLIN, S.; BASSO, M.; et al. Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. *Annals of Surgical Oncology*, v. 16, p. 191–199, 2009.

CAMPILLO, M.; VÁSQUEZ, F. Parasitosis sistémicas – Leishmaniosis canina. In: MCGRAW, H. (Ed.), *Parasitología Veterinaria*, 3ª ed, cap. 36, p. 652-665, 2002.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of Cell Physiology*, v. 190, p. 279-286, 2002.

CASSALI, G. D., Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários de cadela. Aspectos comparativos com neoplasias de mama humana, Tese doutorado, Belo Horizonte: Escola de Veterinária-Universidade Federal de Minas Gerais, 2000, 73p.

CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G.; et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, p. 826–831, 2008.

CEMAZAR, M.; SERSA, G.; FREY, W.; et al. Recommendations and requirements for reporting on applications of electric pulse delivery for electroporation of biological samples. *Bioelectrochemistry*, v. 122, p. 69–76, 2018.

CHAMBERS, V. C.; EVANS, C. A. Canine oral papillomatosis. I. Virus assay and observations on the various stages of the experimental infection. *Cancer Research*, v. 19, p. 1188–1195, 1959.

CHARPIN, C.; GARCIA, S.; BOUVIER, C.; et al. CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemistry in invasive ductal carcinomas. Correlation with patient follow-up. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 107, p. 534–541, 1997.

CHATZISTAMOU, I.; RODRIGUEZ, J.; JOUFFROY, T.; et al. Prognostic significance of tumor shape and stromal chronic inflammatory infiltration in squamous cell carcinomas of the oral tongue. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 39, p. 667-671, 2010.

CHEN, J.; GHORAI, M. K.; KENNEY, G.; STUBBE, J. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Research*, v. 36, p. 3781–90, 2008.

CHOY, H.; MILAS, L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *Journal of National Cancer Institute*, v. 95, p.1440-1452, 2003.

CLARK, G. M.; ZBOROWSKI, D. M.; CULBERTSON, J. L.; et al. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 1, p. 837–846, 2006.

CLARK, G. M. Prognostic factors versus predictive factors: Examples from a clinical trial of erlotinib. *Molecular Oncology*, v. 1, p. 406–412, 2008.

CLARKE, B. S.; MANNION, P. A.; WHITE, R.A. Rib metastases from a non-tonsillar squamous cell carcinoma in a dog. *Journal of Small Animal Clinical Practice*, v. 52, p. 163-167, 2011.

CLOVER, A. J. P.; DE TERLIZZI, F.; BERTINO, G.; et al. Electrochemotherapy in the treatment of cutaneous malignancy: outcomes and subgroup analysis from the cumulative results from the pan-European International Network for Sharing Practice in

Electrochemotherapy database for 2482 lesions in 987 patients (2008-2019). *European Journal of Cancer*, v. 138, p. 30-40, 2020.

COLOMBO, G. L.; DI MATTEO, S.; MIR, L. M.; Cost-effectiveness analysis of electrochemotherapy with the Cliniporator™ vs other methods for the control and treatment of cutaneous and subcutaneous tumors. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 4, p. 541-548, 2008.

COROVIC, S.; BESTER, J.; MIKLAVCIC, D. An e-learning application on electrochemotherapy. *BioMedical Engineering OnLine*, v. 8, p. 1-15, 2009.

COSTA, C.; SOARES, R.; REIS-FILHO, J. S.; et al. Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v. 55, p. 429-434, 2002.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: *Patologia estrutural e funcional*. 6º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 79-100, 2000.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, p. 860-867, 2002.

COX, D. R. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, v. 34, p. 187-202, 1972.

CUNHA, R. M. C.; HORTA, R. S.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B. Cyclooxygenase-2 expression in epithelial neoplasms and its relevance as a targeted therapy in dogs. *Ciencia Rural [online]*, v. 46, p. 1050-1052, 2016.

CUNHA, R. M. C.; LAVALLE, G. E.; REIS, D. C.; et al. Assessment of electrochemotherapy effects on the development of Ehrlich solid tumor in swiss mice

using a novel electroporator device. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, p. 1581-1590, 2017.

CURATOLO, P.; QUAGLINO, P.; MARENCO, F.; et al. Electrochemotherapy in the treatment of Kaposi sarcoma cutaneous lesions: a two-center prospective phase II trial. *Annals of Surgical Oncology*, v. 19, p. 192–198, 2012.

DANG, C.; KEHLER, A.; PAWLITA, M.; et al. E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *British Journal of Dermatology*, v. 155, p. 129-136, 2006.

DE ROSA, G.; VETRANI, A.; ZEPPA, P.; et al. Comparative morphometric analysis of aggressive and ordinary basal cell carcinoma of the skin. *Cancer*, v. 65, p. 544-549, 1990.

DE MATOS, F. R.; LIMA, E.; QUEIROZ, L. M.; et al. Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v. 70, p. 1703-1710, 2012.

DI MONTA, G.; CARACÒ, C.; SIMEONE, E.; et al. Electrochemotherapy efficacy evaluation for treatment of locally advanced stage III cutaneous squamous cell carcinoma: a 22-cases retrospective analysis. *Journal of Translational Medicine*, v. 15, p. 82, 2017.

DOS ANJOS, D. S.; BUENO, C.; MAGALHÃES, L. F.; et al. Electrochemotherapy induces tumor regression and decreases the proliferative index in canine cutaneous squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, v. 9, p.15819, 2019.

DRAY, T. G.; HARDIN, N. J.; SOFFERMAN, R. A. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, v. 104, p. 724–729, 1995.

DU, J. R.; JIANG, Y.; ZHANG, Y. M.; FU, H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World Journal of Gastroenterology*, v. 9, p. 1604–1606, 2003.

DUNNING, D. Oral cavity. Tongue, lips, cheeks, pharynx and salivary glands. In: SLATTER, D. *Textbook of Small Animal Surgery*, 3rd ed, Saunders, Philadelphia, p. 553-572, 2003.

EDHEMOVIC, I.; BRECELJ, E.; CEMAZAR, M.; et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases: a prospective phase II study. *Journal of Surgical Oncology*, v. 46, p. 1628-33, 2020.

EDWARDS, M. J.; HIRSCH, R. M.; AMES, F. C.; et al. Squamous cell carcinoma arising in previously burned or irradiated skin. *The Archives of Surgery*, v. 124, p. 115-117, 1989.

EISENHAUERA, E. A.; THERASSEB, P.; BOGARTSC, J.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, v. 45, p. 228–47, 2009.

EVANS, S. M.; SHOFER, F. Canine oral nontonsillar squamous cell carcinoma. Prognostic factors for recurrence and survival following orthovoltage radiation therapy. *Veterinary Radiology*, v. 29, p. 133-137, 1988.

FALK, H.; LAMBAA, S.; JOHANNESSEN, H. H.; et al. Electrochemotherapy and calcium electroporation inducing a systemic immune response with local and distant remission of tumors in a patient with malignant melanoma – a case report. *Acta Oncologica*, v. 56, p. 1126–1131, 2017.

FARESE, J. P.; LIPTAK, J. M.; WITHROW, S. J. Surgical Oncology. In: VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. (Eds). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis, Missouri, p. 164-351, 2020.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL R. M.; VILAFRANCA, M. Immunohistochemical Detection of CD31 Antigen in Normal and Neoplastic Canine Endothelial Cells. *Journal of Comparative Pathology*, v. 112, p. 319-326, 1995.

FISHER, S. M. Prostaglandins and cancer. *Frontiers in Bioscience*, v. 2, p. 482-500, 1997.

FOLKMAN, J., Tumor angiogenesis factor. *Cancer research*, v. 34, p. 2109-2113, 1974.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, p. 4-6, 1990.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, v. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FOX, S. B. Tumour angiogenesis and prognosis. *Histopathology*, v. 30, p. 294-301, 1997.

FU, W.; COCKERELL, C. J. The actinic (solar) keratosis: A 21st-century perspective. *Archives of Dermatological Research*, v. 139, p. 66-70, 2003.

FULTON, A. J.; NEMEC, A.; MURPHY, B. G.; et al. Risk factors associated with survival in dogs with nontonsillar oral squamous cell carcinoma: 31 cases (1990-2010). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 243, p. 696-702, 2013.

GARGIULO, M.; PAPA, A.; CAPASSO, P.; et al. Electrochemotherapy for non-melanoma head and neck cancers: clinical outcomes in 25 patients. *Annals of Surgery*, v. 255, p. 1158–64, 2012.

GASPARINI, G.; WEIDNER, N.; MALUTA, S.; et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, v. 55, p. 739–744, 1993.

GEHL, J.; GEERTSEN, P. F. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Research*, v. 10, p. 585–589, 2000.

GEHL, J.; SKOVSGAARD, T.; MIR, L. M. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1569, p. 51–58, 2002.

GEHL, J.; SERSA, G.; MATTHIESSEN, L. W.; et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncologica*, v. 57, p. 874-882, 2018.

GHANGHORIA, S.; JAISWAL, S.; KIYAWAT, P.; GHANGHORIA, A. Comparison of Anneroth's and Broder's grading systems in oral squamous cell carcinoma - A 5 year study. *Journal of Medical Science and Clinical Research*, v. 7, p. 700-706, 2019.

GOLDSCHMIDT, M. H.; DUNSTAN, R. W.; STANNARD, A. A.; et al. *Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals*, 2nd series, v. 3, p. 21. Armed Forces Institute of Pathology, 1998.

GOLDSCHMIDT, M. H.; GOLDSCHMIDT, K. H. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: MEUTEN, D. J. (Ed). *Tumors in domestic animals*. 5th Edition. John Wiley & Sons, Inc.: Oxford, p. 88, 2017.

GOLDSCHMIDT, M. H.; KENNEDY, J. S.; KENNEDY, D. R.; et al. Severe papillomavirus infection progressing to metastatic squamous cell carcinoma in bone marrow-transplanted X-linked SCID dogs. *Journal of Virology*, v. 80, p.6621–6628, 2006.

GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. Squamous cell carcinoma. In: GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. (ed). *Skin tumors of the dog and cat*. Oxford, Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1998.

GREWE, M.; TREFZER, U.; BALLHORN, A.; et al. Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV)-B radiation-induced prostaglandin-E2 synthesis by human epidermoid carcinoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 101, p. 528–531, 1993.

GRIFFEY, S. M.; KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *Journal of Comparative Pathology*, v. 120, p. 321–332, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, v. 140, p. 883–899, 2010.

GROSELJ, A.; KRZAN, M.; KOSJEK, T.; et al. Bleomycin pharmacokinetics of bolus bleomycin dose in elderly cancer patients treated with electrochemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 77, p. 939–947, 2016.

GROSELJ, A.; KRANJC, S.; BOSNJAK, M.; et al. Vascularization of the tumours affects the pharmacokinetics of bleomycin and the effectiveness of

electrochemotherapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 123, p. 247–256, 2018.

GROSS, T. L.; BRIMACOMB, B. H. Multifocal intraepidermal carcinoma in a dog histologically resembling Bowen's disease. *American Journal of Dermatopathology*, v. 8, p. 509-515, 1986.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. *Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis*. Blackwell Science, Oxford, p. 581-603, 2009.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research*, v. 571, p. 107–120, 2005.

HARGIS, A. M. A review of solar-induced lesions in domestic animals. *Compendium of Continuous Education*, v. 3, p. 287, 1981.

HARTEVELT, M. M.; BAVINCK, J. N.; VANDENBROUCKE, J. P.; et al. Incidence of skin cancer after renal transplantation in the Netherlands. *Transplantation*, v. 49, p. 506-509, 1990.

HAUCK, M. L.; OBLAK, M. L. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: Saunders, p. 352-365, 2020.

HENRY, C. J. The etiology of cancer. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: Saunders, 2013.

HORTA, R. S.; LAVALLE, G. E.; MONTEIRO, L. N.; et al. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Veterinary Pathology*, v. 55, p. 212-223, 2018.

HOWE, R. L. Inflammation and Breast Cancer. Cyclooxygenase/Prostaglandin Signaling and Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, v. 9, p. 210- 219, 2007.

HRUZA, L. L.; PENTLAND, A. P. Mechanisms of UV-induced inflammation, *Journal of Investigative Dermatology*, v. 100, S35–S41, 1993.

HUSAIN, S. S.; SZABO, I. L.; TAMAWSKI, A. S. NSAID Inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action. *American Journal of Gastroenterology*, v. 97, p. 542–53, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Vamos conhecer o Brasil – Relevo e clima. Disponível em <http://7a12.ibge.gov.br/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/relevo-e-clima>. Acesso em: 7 out. 2015

ITOH, S.; MATSUI, K.; FURUTA, I.; TAKANO, Y. Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. *Oral Oncology*, v. 39, p. 829–35, 2003.

JAJU, P. D.; RANSOHOFF, K. J.; TANG, J. Y.; SARIN, K. Y. Familial skin cancer syndromes - Increased risk of nonmelanotic skin cancers and extracutaneous tumors. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 74, p. 437-451, 2016.

JENSEN, P.; MOLLER, B.; HANSEN, S. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 40, p. 177-186, 1999.

KADTHUR, J. C.; RAO, S.; SONNAHALLIPURA, B. M.; et al. Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 4, p. 36-40, 2011.

KAHN, S. G.; BICKER, D. R.; MUKHTAR, H.; et al. Ras p21 farnesylation in ultraviolet B radiation-induced tumors in the skin of SKH-1 hairless mice. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 102, p. 754-758, 1994.

KANGROTONDO, C. H.; MILLER, C. C.; MORRISON, A. R.; et al. Enhanced keratinocyte prostaglandin synthesis after UV injury is due to increased phospholipase activity. *American Journal of Physiology*, v. 264, p. 396–C401, 1993.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American statistical association*, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

KARIA, P. S.; JAMBUSARIA-PAHLAJANI, A.; HARRINGTON, D. P.; et al. Evaluation of American Joint Committee on Cancer, International Union Against Cancer, and Brigham and Women's Hospital tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 32, p. 327–334, 2014.

KERN, M. A.; SCHUBERT, D.; SAHI, D.; et al. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Journal of Hepatology*, v. 36, p. 885–94, 2002.

KHANNA, M.; FORTIER-RIBERDY, G.; SMOLLER, B.; et al. Reporting tumor thickness for squamous cell carcinoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 29, p. 321-323, 2002.

KHODAEIANI, E.; FAKHRJOU, A.; AMIRNIA, F.; et al. Immunohistochemical Evaluation of p53 and Ki67 expression in Skin Epithelial Tumors. *Indian Journal of Dermatology*, v. 58, p. 181–187, 2013.

KIRKHAM, N. Tumors and cysts of the epidermis. In: ELDER, D. E.; ELENITSAS, R. E.; JAWORSKY, C.; et al (ed). *Lever's Histopathology of the skin*, 8th ed, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 712-717, 1997.

KIRPENSTEIJN, J.; WITHROW, S. J.; STRAW, R. C. Combined resection of the nasal planum and premaxilla in three dogs. *Veterinary Surgery*, v. 23, p. 341–346, 1994.

KNAPP, D. W.; GLICKMAN, N. W.; MOHAMMED, S. I.; et al. Antitumor effects of piroxicam in spontaneous canine invasive urinary bladder cancer, a relevant model of human invasive bladder cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 507, p. 377–80, 2002.

KODRE, V.; CEMAZAR, M.; PECAR, J.; et al. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo*, n. 23, p. 55-62, 2009.

KOIDE, N.; NISHIO, A.; KONO, T.; et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology*, v. 46, p. 952–958, 1999.

KOSOVSKY, J. K.; MATTHIESEN, D. T.; MARRETTA, S. M.; et al. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Veterinary Surgery*, v. 20, p. 397-401, 1991.

KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. Tumors of the skin. In ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat*. 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, p. 524–528, 2000.

KUZU, I.; BICKNELL, R.; HARRIS, A. L.; et al. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p. 143–148, 1992.

KUZU, I.; BICKNELL, R.; FLETCHER, C. D. M.; GATTER, K. C. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Laboratory Investigations*, v. 69, p. 322-328, 1993.

LANA, S. E.; OGILVIE, G. K.; WITHROW, S. J.; et al. Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 33, p. 329-332, 1997.

LANGUS, J.; KRANJC, M.; KOS, B.; et al. Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-11, 2016.

LARKIN, J. O.; COLLINS, C. G.; AARONS, S.; et al. Electrochemotherapy – Aspects of preclinical development and early clinical experience. *Annals of Surgery*, v. 245, p. 469-479, 2007.

LARSEN, S. R.; JOHANSEN, J.; SORENSEN, J. A.; KROGDAHL, A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 38, p. 657-662, 2009.

LASCELLES, B. D. X.; PARRY, A. T.; STIDWORTHY, M. F.; et al. Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs. *The Veterinary Record*, v. 147, p. 473-476, 2000.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F. et al. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. *Veterinary Pathology*, v. 6, p. 1275-1280, 2009.

LAVALLE, G. E.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D. Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors. *In Vivo*, v. 26, p. 375-379, 2012.

LEE GROS, T.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; et al. Nailbed epithelial tumors. In: *Skin Diseases of the Dog and Cat*. Oxford, UK: Blackwell, p. 932, 2005.

LIAO, C. T.; HUANG, S. F.; CHEN, I. H.; et al. Tongue and buccal mucosa carcinoma: is there a difference in outcome? *Annals of Surgical Oncology*, v. 17, p. 2984-2991, 2010.

LINDELOF, B.; SIGURGEIRSSON, B.; STERN, R. S.; et al. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *British Journal of Dermatology*, v. 143, p. 513-519, 2000.

LIPTAK, J. M.; WITHROW, S. J. Cancer of the gastrointestinal tract. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: Saunders, p. 381-431, 2013.

LIU, S. K.; HOHN, R. B. Squamous cell carcinoma of the digit of the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 153, p. 411-424, 1968.

LOWE, N. J.; WEINGARTEN, D.; WORTZMAN, M. Sunscreens and phototesting. *Clinical Dermatology*, v. 6, p. 40-49, 1988.

LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York: McGraw Hill, 1968.

LUPULESCU, A. Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, v. 54, p. 83-94, 1996.

MADERO, V. M.; PÉREZ, G. O. Electrochemotherapy for treatment of skin and soft tissue tumours. Update and definition of its role in multimodal therapy. *Clinical and Translational Oncology*, v. 13, p. 18-24, 2011.

MAEDA, H.; AKAIKE, T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry*, v. 63, p. 854-865, 1998.

MAIOLINO, P.; DE VICO, G.; RESTUCCI, B. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Basal Cell Tumours and in Squamous Cell Carcinomas of Canine Skin. *Journal of Comparative Pathology*, v. 123, p. 141–145, 2000.

MAIOLINO, P.; PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Angiogenesis in Squamous Cell Carcinomas of Canine Skin: An Immunohistochemical and Quantitative Analysis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 125, p. 117–121, 2001.

MAIOLINO, P.; RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; DE VICO, G. Nuclear Morphometry in Squamous Cell Carcinomas of Canine Skin. *Journal of Comparative Pathology*, v. 127, p. 114-117, 2002.

MALARKEY, D. E.; HOENERHOFF, M.; MARONPOT, R. R. Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C.G.; WALLIG, M. A. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. 3 ed, Elsevier, p. 107–146, 2013.

MALI, B.; MIKLAVCIC, D.; CAMPANA, L. G.; et al. Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. *Radiology and Oncology*, v. 47, p. 32-41, 2013.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; et al. Cancer-related inflammation. *Nature*, v. 454, p. 436-444, 2008.

MARINO, D. J.; MATTHIESEN, D. T.; STEFANACCI, J. D.; et al. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981–1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 207, p. 726–728, 1995.

MARKELC, B.; SERSA, G.; CEMAZAR, M. Differential mechanisms associated with vascular disrupting action of electrochemotherapy: intravital microscopy on the level of single normal and tumor blood vessels. *PLoS One*, v. 8, p. e59557, 2013.

MARTIN DE LAS, M. J.; MILLAN, Y.; RUIZ-VILLAMOR, E.; et al. Apoptosis and mitosis in tumours of the skin and subcutaneous tissues of the dog. *Research in Veterinary Science*, v. 66, p. 139–146, 1999.

MARTY, M.; SERSA, G.; GARBAY, J. R.; et al. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer, Supplements* 4, p. 3-13, 2006.

MELEO, K. A. Tumors of the skin and associated structures. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 27, p. 73–94, 1997.

MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research*, v. 571, p. 91–106, 2005.

MIKLAVCIC, D.; SERSA, G.; BRECELJ, E.; et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 50, p. 1213–1225, 2012.

MIKLAVCIC, D.; MALI, B.; KOS, B.; et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomedical Engineering OnLine*, v. 13, p. 1-20, 2014.

MIR, L. M.; DEVAUCHELLE, P.; QUINTIN-COLONNA, F.; et al. First clinical trial of cat soft tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, v. 76, p. 1617-1622, 1997.

MIR, L.M. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer Supplements*, v. 4, p. 38-44, 2006.

MIR, L.M.; GEHL, J.; SERSA, G.; et al. 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™ by

means of invasive or noninvasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplement*, v. 4, p. 14–25, 2006.

MITMAKER, B.; BEGIN, L. R.; GORDON, P. H. Nuclear shape as a prognostic discriminant in colorectal carcinoma. *Diseases of Colon and Rectum*, v. 34, p. 249-259, 1991.

MOHAMMED, S. I.; COFFMAN, K.; GLICKMAN, N. W.; et al. Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, v. 64, p. 1–4, 2001.

MOHAN, S. V.; CHANG, J.; LI, S.; et al. Increased risk of cutaneous squamous cell carcinoma after vismodegib therapy for basal cell carcinoma. *JAMA Dermatology*, v. 152, p. 527-532, 2016.

MOLLER, M. G.; SALWA, S.; SODEN, D. M.; O’SULLIVAN, G. C. Electrochemotherapy as an adjunct or alternative to other treatments for unresectable or in-transit melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 9, p. 1611–1630, 2009.

MORA, R. G.; PERNICIARO, C. Cancer of the skin in blacks. I. A review of 163 black patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 5, p. 535-543, 1981.

MORPHOPOULOS, G.; PEARSON, M.; RYDER, W. D.; et al. Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Journal of Pathology*, v. 180, p. 44–49, 1996.

MORRISON, W. B. Canine and feline mammary tumors. In: MORRISON, W. B., *Cancer in dogs and cats; medical and surgical management*. 1° ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 39, p. 591-598, 1998.

MOZZILLO, N.; SIMEONE, E.; BENEDETTO, L.; et al. Assessing a novel immunology-based combination therapy: ipilimumab plus electrochemotherapy. *Oncoimmunology*, v. 4, p. e1008842, 2015.

MUKARATIRWA, S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: Rationale and relevance. A review. *Veterinary Quarterly*, v. 27, p. 52-64, 2005.

MUNDAY, J. S.; LOHR, C. V.; KIUPEL, M. Tumors of the Alimentary Tract. In: MEUTEN, D. J. (Ed). *Tumors in domestic animals*. Fifth Edition. John Wiley & Sons, Inc.: Oxford, p. 499, 2017.

MUTSAERS, A. J. Antiangiogenic and metronomic therapy. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: Saunders, cap. 14, p. 229-237, 2013.

NAPPI, O.; PETTINATO, G.; WICK, M. R. Adenoic (acantholytic) squamous cell carcinoma of the skin. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 16, p. 114-121, 1989.

NARDI, A. B.; DALECK, C. R.; SOUZA, C. H. M.; et al. Cyclo- oxygenase-2 Expression in Mammary Tumors in Dogs and Its Correlation to Histologic and Biologic Behavior. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 3, p. 56-57, 2005.

NEMEC, A.; MURPHY, B.; KASS, P. H.; VERSTRAETE, F. J. M. Histological Subtypes of Oral Non-tonsillar Squamous Cell Carcinoma in Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v. 147, p. 111-120, 2012.

NESS, R. B.; COTTREAU, C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of National Cancer Institute*, v. 91, p. 1459-1467, 1999.

NIKULA, K. J.; BENJAMIN, S. A.; ANGLETON, G. M.; et al. Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs. *Radiation Research*, v. 129, p. 11-18, 1992.

O'BRIEN, M. G.; BERG, J.; ENGLER, S. J. Treatment by digital amputation of subungual squamous cell carcinoma in dogs: 21 cases (1987–1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 201, p. 759–761, 1992.

OHSHIMA, H. Genetic and epigenetic damage induced by reactive nitrogen species: implications in carcinogenesis. *Toxicology Letters*, v. 140-141, p. 99-104, 2003.

OMENE, C.; TIERSTEN, A. The Differences between Male and Female Breast Cancer. In: *Principles of Gender-Specific Medicine*, 2nd ed, 2010.

PAGANO, J. S.; BLASER, M.; BUENDIA, M. A.; et al. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Seminars in Cancer Biology*, v. 14, p. 453-471, 2004.

PAGE, C.; ROSE, M.; YACOUB, M.; PIGOTT, R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *American Journal of Pathology*, v. 141, p. 673-683, 1992.

PARADIS M.; SCOTT, D. W.; BRETON L. Squamous cell carcinoma of the nail bed in three related giant schnauzers. *Veterinary Records*, v. 125, p. 322–324, 1989.

PARUMS, D. V.; CORDELL, J. L.; MICKLEM, F.; et al. JC 70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *Journal of Clinical Pathology*, v. 43, p. 752-757, 1990.

PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, D. T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L. P. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *Journal of the Canadian Dental Association*, v. 73, p. 339-344, 2007.

PEREIRA, R. S.; SCHWEIGERT, A.; MELO, G. D.; et al. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach of immunohistological diagnostic and prognostic. *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 83, 2013.

PETTER, G; HAUSTEIN, U. F. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatology Surgery*, v. 26, p. 521-530, 2000.

PIENTA, K. J.; COFFEY, D. S. Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. *Cancer*, v. 68, p. 2012-2016, 1991.

POGGIANI, S. S. C.; HATAYDE, M. R.; LAUFER-AMORIM, R.; WERNER, J. Expression of Cyclooxygenase-2 and Ki-67 in Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, v. 2, p. 41-47, 2012.

PRON, G.; MAHROUR, N.; ORLOWSKI, S.; et al. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical Pharmacology*, v. 57, p. 45–56, 1999.

QUAGLINO, P.; MORTERA, C.; OSELLA-ABATE, S.; et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Annals of Surgical Oncology*, v. 15, p. 2215-2222, 2008.

QUE, S. K. T.; ZWALD, F. O.; SCHMULTS, C. D. Cutaneous squamous cell carcinoma – Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 78, p. 237-247, 2018.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2019. URL <https://www.R-project.org/>.

RAWLINGS, N. G.; SIMKO, E.; BEBCHUK, T.; et al. Localization of integrin alpha(v)beta3 and vascular endothelial growth factor receptor-2(KDR/ Flk-1) in cutaneous and oral melanomas of dog. *Histology and Histopathology*, v. 18, p. 819–826, 2003.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. *Oral Pathology. Clinical Pathologic Correlations*, 5th ed, Philadelphia: WB Saunders, St Louis, p. 52-74, 2008.

REMS, L.; MIKLAVCIC, D. Tutorial: electroporation of cells in complex materials and tissue. *Journal of Applied Physics*, v. 119, p. 201101-1 – 201101-21, 2016.

RESTUCCI, B.; BORZACCHIELLO, G.; MAIOLINO, P.; et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 130, p. 99–104, 2004.

RESTUCCI, B.; DE VICO, G.; MAIOLINO, P. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 37, p. 297–301, 2000.

RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; PACIELLO, O.; et al. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *Journal of Comparative Pathology*, v. 128, p. 252–259, 2003.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, v. 39, p. 488–493, 2002.

RISTIMAKI, A.; SIVULA, A.; LUNDIN, J.; et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Research*, v. 62, p. 632-635, 2002.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v. 121, p. 13–24, 1999.

ROGERS, K. S.; HELMAN, R.G.; WALKER, M. A. Squamous cell carcinoma of the canine nasal planum: eight cases (1988-1994). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 31, p. 373-378, 1995.

ROWE, D. E.; CARROLL, R. J.; DAY, C. L. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip: implications for treatment modality selection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 26, p. 976–90, 1992.

RUFFINI, E.; WEDER, W.; LUIGI, P.; et al. Thymic Tumors. In: PASS, H. I.; BALL, D.; SCAGLIOTTI, G. V. IASLC (ed). *IASLC Thoracic Oncology*, Elsevier, 2nd ed, 2018.

SAKAI, H.; YAMANE, T.; YANAI, T.; et al. Expression of Cyclin Kinase Inhibitor p27 in Skin Tumours of Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v. 125, p. 153–158, 2001.

SALASHE, S. J. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 42, p. 4–7, 2000.

SCASE, T. J.; EDWARDS D.; MILLER, J.; et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, p. 151–158, 2006.

SCHMULTS, C. D.; KARIA, P. S.; CARTER, J. B.; et al. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatology*, v. 149, p. 541–547, 2013.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6th ed, WB Saunders, Philadelphia, p. 1256, 2001.

SELMI, A. L.; LINS, B. T.; CESAR, F. B.; et al. A comparison of the analgesic efficacy of vedaprofeno, carprofen or ketofen after ovariohysterectomy in bitches. *Ciência Rural*, v. 39, p. 785-790, 2009.

SERSA, G.; KRZIC, M.; SENTJURC, M.; et al. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *British Journal of Cancer*, v. 87, p. 1047–1054, 2002.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Therapy*, v. 1, p. 133-142, 2003a.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; Tumor blood flow modifying effects of electrochemotherapy: a potential vascular targeted mechanism. *Radiology and Oncology*, v. 37, p. 43–48, 2003b.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; et al. Electrochemotherapy of tumours. *Radiology and Oncology*, v. 40, p. 163-174, 2006.

SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M., et al. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, v. 34, p. 232-240, 2008a.

SERSA, G.; JARM, T.; KOTNIK, T.; COER, A.; PODKRAJSEK, M.; SENTJURC, M.; et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *British Journal of Cancer*, v. 98, p. 388, 2008b.

SERSA, G.; CUFER, T.; PAULIN, S. M.; et al., Electrochemotherapy of chest wall breast cancer recurrence. *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, p. 379-386, 2012.

SERSA, G.; TEISSIE, J.; CEMAZAR, M.; et al. Electrochemotherapy of tumors as *in situ* vaccination boosted by immunogenelectrotransfer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 64, p. 1315–1327, 2015.

SERSA, G.; URSIC, K.; CEMAZAR, M.; et al. Biological factors of the tumour response to electrochemotherapy: Review of the evidence and a research roadmap. *European Journal of Surgical Oncology*, xxx (xxxx) xxx (article in press), 2021.

SHACTER, E.; WEITZMAN S. A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*, v. 16, p. 217-226, 2002.

SIITONEN, S. M.; HAAPASALO, H. K.; RANTALA, I. S.; et al. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Modern Pathology*, v. 8, p. 745–752, 1995.

SILVEIRA, E. J.; GODOY, G. P.; LINS, R. D.; et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *International Journal of Surgical Pathology*, v. 15, p. 376-383, 2007.

SILVEIRA, L. M. G.; MACIEL, C. H.; CUNHA, F. M., et al. Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de cães. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 47, p. 55-66, 2010.

SILVERBERG, M. J.; LEYDEN, E.; WARTON, E. M.; et al. HIV infection status, immunodeficiency, and the incidence of non-melanoma skin cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 105, p. 350–360, 2013.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, p. 145-182, 2000.

SNOJ, M.; RUDOLF, Z.; CEMAZAR, M.; et al. Successful sphincter-saving treatment of anorectal malignant melanoma with electrochemotherapy, local excision and adjuvant brachytherapy. *Anticancer Drugs*, v. 16, p. 345–348, 2005.

SNOJ, M.; CEMAZAR, M.; SRNOVRSNIK, T.; et al. Limb sparing treatment of bleeding melanoma recurrence by electrochemotherapy. *Tumori*, v. 95, p. 398–402, 2009.

SORENMO, K., Canine mamary gland tumors. *Veterinary Clinical of North America: Small Animal Practice*, v. 33, p. 573- 596, 2003.

SORENSEN, F. B. Quantitative analysis of nuclear size for objective malignancy grading: a review with emphasis on new, unbiased stereological methods. *Laboratory Investigation*, v. 66, p. 4-23, 1992.

SOZMEN, M.; DEVRIM, A. K.; SUDAGIDAN, M.; et al. Expression of angiogenic growth factors in canine squamous cell cancers. *Biotechnic & Histochemistry*, p. 1-10, 2020.

SPUGNINI, E. P.; PORRELLO, A. Potentiation of chemotherapy in companion animals by application of biphasic electric pulses. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 22, p. 571-580, 2003.

SPUGNINI, E. P.; VINCENZI, B.; CITRO, G.; et al. Adjuvant Electrochemotherapy for the Treatment of Incompletely Excised Spontaneous Canine Sarcomas. *In Vivo*, n. 21, p. 819-822, 2007.

SPUGNINI, E. P.; VICENZI, B.; BETTI, G.; et al. Surgery and electrochemotherapy of a high- grade soft tissue sarcoma in a dog. *Veterinary Record*, v. 162, p. 186-188, 2008a.

SPUGNINI, E. P.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N.; et al. Adjuvant Electrochemotherapy for Incompletely Excised Anal Sac Carcinoma in a Dog. *In Vivo*, v. 22, p. 47-50, 2008b.

SPUGNINI, E. P.; VINCENZI, B.; CITRO, G.; et al. Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: a preliminary report. *The Veterinary Journal*, n. 179, p. 117-120, 2009.

SPUGNINI, E. P.; FILIPPONI, M.; ROMANI, L.; et al. Electrochemotherapy treatment for bilateral pleomorphic rhabdomyosarcoma in a cat. *Journal of Small Animal Practice*, n. 51, p. 330-332, 2010.

SPUGNINI, E. P.; AZZARITO, T.; FAIS, S.; FANCIULLI, M.; BALDI, A. Electrochemotherapy as first line cancer treatment: Experiences from veterinary medicine in developing novel protocols. *Current Cancer Drug Targets*, v. 16, p. 43–52, 2016.

SPUGNINI, E. P.; VINCENZI, B.; AMADIO, B.; BALDI, A. Adjuvant electrochemotherapy with bleomycin and cisplatin combination for canine soft tissue sarcomas: A study of 30 cases. *Open Veterinary Journal*, v. 9, p. 88–93, 2019.

STOKKING, L. B.; EHRHART, E. J.; LICHTENSTEIGER, C. A.; et al. Pigmented epidermal plaques in three dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, p. 411–417, 2004.

SUBBARAMAIAH, K.; NORTON, L.; GERALD, W.; et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 18649-18657, 2002.

TEIFKE, J. P.; LOHR, C. V.; SHIRASAWA, H. Detection of canine oral papillomavirus-DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing

skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive *in situ* hybridization. *Veterinary Microbiology*, v. 60, p. 119–130, 1998.

TESTORI, A.; FARIES, M. B.; THOMPSON, J. F.; et al. Local and intralesional therapy of in-transit melanoma metastases. *Journal of Surgical Oncology*, v. 104, p. 391–396, 2011.

THOMSON, M. Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum in Cats and Dogs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 22, p. 42-45, 2007.

THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; GANSLER, T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Foundation Symposium*, v. 256, p. 6-21, 2004.

TODOROFF, R. J.; BRODEY, R. S. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 175, p. 567–571, 1979.

TORCHIA, D.; MASSI, D.; FABBRI, P.; et al. Multiple cutaneous precanceroses and carcinomas from combined iatrogenic/-professional exposure to arsenic. *International Journal of Dermatology*, v. 47, p. 592-593, 2008.

TOSI, P.; LUZI, P.; BAAK, J. P. N. Nuclear morphometry as an important prognostic factor in stage I renal cell carcinoma. *Cancer*, v. 58, p. 2512-2518, 1986.

TOZON, N.; KODRE, V.; SERSA, G.; et al. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Research*, v. 25, p. 839-846, 2005.

TROSKO, J. E.; TAI, M. Adult stem cell theory of the multi-stage, multi-mechanism theory of carcinogenesis: role of inflammation on the promotion of initiated stem cells. In: DITTMAR, T.; ZAENKER, K. S.; SCHIMIDT, A. *Infection and inflammation: impacts on oncogenesis*. Karger, v. 13, p. 45-65, 2006.

TSE, G. M.; LUI, P. C.; LEE, C. S.; et al. Stromal expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor grade and microvessel density in mammary phyllodes tumors: a multicenter study of 185 cases. *Human Pathology*, v. 35, p. 1053–1057, 2004.

TURINI, M. E.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annual Review of Medicine*, v. 53, p. 35-37, 2002.

UICC, International Union Against Cancer. WITTEKIND, C.; WAGNER, G. (ed). *TNM. Klassifikation maligner Tumoren*. Berlin: Springer-Verlag, p. 109–14, 1997.

VIEIRA, F. L.; GUIMARAES, M. A.; AARESTRUP, F. M. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health*, v. 8, p. 25, 2008.

VISSER, K. E.; COUSSENS, L. M. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. In: DITTMAR, T.; ZAENKER, K. S.; SCHIMIDT, A. *Infection and inflammation: impacts on oncogenesis*, Karger, p. 118-138, 2006.

VOS, J. P.; BURM, A. G. D.; FOCKER, A. P.; et al. Piroxicam and carboplatin as a combination treatment of canine oral non-tonsillar squamous cell carcinoma: a pilot study and a literature review of a canine model of human head and neck squamous cell carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 3, p. 16–24, 2005.

WALDER, E. J. Comparative aspects of nonmelanoma skin cancer. *Clinical Dermatology*, v. 13, p. 569-578, 1995.

WALLACE, J.; MATTHIESEN, D. T.; PATNAIL, A. K. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Veterinary Surgery*, v. 21, p. 337-341, 1992.

WEIDNER, N., SEMPLE, J. P., WELCH, W. R., FOLKMAN, J., Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 334, p. 1- 8, 1991.

WEIDNER, N.; CARROLL, P. R.; FLAX, J.; et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *American Journal of Pathology*, v. 143, p. 401–409, 1993.

WEIDNER, N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: The evidence continues to grow. *Journal of Pathology*, v. 184, p. 119–122, 1998.

WEIDNER, N. Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship. *Journal of Pathology*, v. 189, p. 297–299, 1999.

WEISS, E.; FRESE, K. Tumours of the skin. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 50, p. 79-100, 1974.

WEITZMAN, S. A.; GORDON, L. I. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*, v. 76, p. 655-663, 1990.

WERNER, A. Top 5 sun-induced skin lesions in dogs. *Clinician's Brief*, p. 21-24, 2014.

WHITE, R. A. S. Mandibulectomy and maxillectomy in the dog – long-term survival in 100 cases. *Journal of Small Animal Practice*, n. 32, p. 69-74, 1991.

WILLIAMS, L. S.; MANCUSO, A. A.; MENDENHALL, W. M.; et al. Perineural spread of cutaneous squamous and basal cell carcinoma: CT and MR detection and its impact on patient management and prognosis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 15, p. 1061-1069, 2001.

WITHROW, S. J.; STRAW, R. C. Resection of the nasal planum in nine cats and five dogs. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 26, p. 219–222, 1990.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. Why Worry About Cancer in Companion Animals? In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: Saunders, p. XV e XVI, 2013.

WOBESER, B. K.; KIDNEY, B. A.; POWERS, B. E.; et al. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Veterinary Pathology*, v. 44, p. 355–361, 2007.

WONG, G.; GUPTA, R.; DIXON, K. M. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D and three low calcemic analogs decrease UV-induced DNA damage via the rapid response pathway. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 14, p. 567-570, 2004.

XIANG, F.; LUCAS, R.; NEALE, R.; et al. Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978-2012: empirical relationships. *JAMA Dermatology*, v. 150, p. 1063-1071, 2014.

XIE, S.; LIU, Y.; QIAO, X.; et al. What is the Prognostic Significance of Ki-67 Positivity in Oral Squamous Cell Carcinoma?, *J. Cancer*, v. 7, p. 758–767, 2016.

YU, D. S.; CHEN, H. I.; CHANG, S. Y. The expression of cyclooxygenase in transitional cell carcinoma cell lines: its correlation with tumor differentiation, invasiveness and prostanoids production. *European Urology*, v. 44, p. 491–4, 2003.

YUAN, H.; GHIM, S.; NEWSOME, J.; et al. An epidermotropic canine papillomavirus with malignant potential contains an E5 gene and establishes a unique genus. *Virology*, v. 359, p. 28–36, 2007.

YUSPA, S. H. Cutaneous chemical carcinogenesis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 15, p. 1031-1044, 1986.

ZATTERSTROM, U. K.; BRUN, E.; WILLEN, R.; et al. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck*, v. 17, p. 312–318, 1995.

ZAUGG, N.; NESPECA, G.; HAUSER, B.; et al. Detection of novel papillomaviruses in canine mucosal, cutaneous and *in situ* squamous cell carcinomas. *Veterinary Dermatology*, v. 16, p. 290–298, 2005.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*, v. 384, p. 260-265, 2009.

8. PRODUTIVIDADE NO PERÍODO DO DOUTORADO

8.1. Atividades e produção científica relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia

- Coautoria e apresentação do trabalho “Plasmocitoma Extramedular Oral: Estudo Retrospectivo de 3 Cães” na forma de pôster no IX Oncovet, no período de 28 de abril a 1 de maio de 2017.
- Coautoria do artigo “Electrochemotherapy treatment of oral extramedullary plasmacytoma of the tongue: a retrospective study of three dogs” publicado na revista Ciência Rural, 2017.
- Coautoria e apresentação do trabalho “Eletroquimioterapia com cisplatina no tratamento de carcinoma de células escamosas oral em anta (*Tapirus terrestris*): relato de caso” na forma de pôster no 43º Congresso da Associação de Zoológicos e Aquários do Brasil, Belo Horizonte, no período de 21 a 25 de maio de 2019.
- Palestrante no II Encontro Latino-americano de Eletroquimioterapia Veterinária, com a palestra de tema “1º caso de eletroquimioterapia em *Tapirus Terrestris*”, São Paulo, 23 de novembro de 2019, totalizando 1 hora.

8.2. Atividades e produção científica não relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia

- Ouvinte no IX Oncovet, São Paulo, no período de 28 de abril a 1 de maio de 2017.
- Coautoria do trabalho “Utilização Da Imunocitoquímica pela Técnica do ‘Cellblock’ em Linfoma Felino” na forma de pôster no IX Oncovet, no período de 28 de abril a 1 de maio de 2017.
- Ouvinte no ONCO IN RIO - 2ª edição, Fortaleza, no período de 20 e 21 de abril de 2018, totalizando 20 horas.
- Coautoria do artigo “Effective Treatment of a Dog with Insulinoma”, publicado na revista Scholars Journal of Applied Medical Sciences, 2018.

- Ouvinte no IV Encontro de Patologia Mamária, Belo Horizonte, no período de 29 e 30 de abril de 2019.
- Ouvinte no X ONCOVET, Belo Horizonte, no período de 1 a 3 de maio de 2019, totalizando 24 horas.
- Ouvinte no ESVONC Annual Congress, Frankfurt, no período de 23 a 25 de maio 2019, totalizando 7,5 horas.
- Coautoria e apresentação do trabalho “Immunophenotypic profiles of canine mammary tumors” na forma de pôster no ESVONC Annual Congress, no período de 23 a 25 de maio 2019.
- Ouvinte no curso Atualização em Oncologia de Cães e Gatos, Belo Horizonte, no período de 9 e 10 de novembro de 2019, totalizando 20 horas.
- Ouvinte no Colóquio Científico ABROVET, São Paulo, no período de 12 e 13 de dezembro de 2020, totalizando 8 horas.
- Coautoria do artigo “Histomorphological and Immunophenotypic Characterization of Feline Injection Site-Associated Sarcoma”, publicado na revista *Acta Scientiae Veterinariae*, 2021.
- Coautoria do artigo “Treatment of Canine Oral Melanoma with Adjuvant Chemotherapy and Immunotherapy”, publicado na revista *Acta Scientiae Veterinariae*, 2021.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1 – Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da eletroquimioterapia associada ou não a cirurgia sobre a evolução do carcinoma de células escamosas em cães de acordo com o estadiamento e correlação com a sobrevida", protocolo do CEUA: 59/2018 sob a responsabilidade de Roberto Baracat de Araujo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 11/06/2018.

Vigência da Autorização	11/06/2018 a 10/06/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Cão / diversos
Nº de animais	32
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	indiferente
Origem	tutores
*Espécie/linhagem	Cão / indiferente
Nº de animais	32
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	indiferente
Origem	tutores

Considerações posteriores:

11/06/2018	Aprovado na reunião do dia 11/06/2018. Validade: 11/06/2018 à 10/06/2023
------------	--

Belo Horizonte, 30/01/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceu/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@ppq.ufmg.br

9.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Minas Gerais
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Você, _____ é convidado (a), como tutor (a) ou responsável do (a) paciente _____, da espécie canina, raça _____, sexo _____, com _____ anos de idade, a incluir o animal referido na pesquisa intitulada “Carcinoma de células escamosas em cão: eletroquimioterapia associada ou não a cirurgia e correlação com a sobrevida”.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar a eficácia da eletroquimioterapia para o carcinoma de células escamosas canino deve-se à reduzida resposta, dessa neoplasia, aos tratamentos convencionais, em casos avançados. A eletroquimioterapia é um tratamento local com poucos efeitos colaterais sistêmicos. O objetivo deste projeto é aumentar o intervalo livre de doença e sobrevida do paciente com carcinoma de células escamosas canino em estadiamento avançado, tendo em vista as respostas de curta duração observadas para os tratamentos convencionais. O tratamento com eletroquimioterapia será realizado no Hospital Veterinário, quantas sessões forem necessárias, no entanto o paciente deverá retornar ao Hospital para reavaliação clínica.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Existe um desconforto e risco mínimo para o paciente que será submetido a eletroquimioterapia sob anestesia geral.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES: Caso você não concorde com os termos dessa pesquisa, o tratamento convencional será oferecido normalmente, sem o benefício da eletroquimioterapia e envolvimento dos pesquisadores. Tratamentos paliativos também podem ser oferecidos para garantirem conforto ao paciente que não receber o tratamento antitumoral.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Caso sejam observadas alterações no exame clínico ou exames complementares, relacionados ao procedimento de eletroquimioterapia, o paciente será acompanhado e encaminhado para tratamento adequado no Hospital Veterinário.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar, inclusive sobre a metodologia. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade, e do seu animal de estimação, com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames clínicos e laboratoriais serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você e seu animal de estimação não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Hospital Veterinário da UFMG e a outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará nenhum custo adicional, exceto aquele necessário para o tratamento do paciente e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não estão previstos nenhuma forma de compensação ou indenização, caso o paciente ou proprietário sofra algum dano decorrente dessa pesquisa.

DECLARAÇÃO DO TUTOR OU RESPONSÁVEL PELO PACIENTE: Eu, _____ fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Roberto Baracat de Araújo e a co-orientadora Dra. Gleidice Eunice Lavalle certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante Rúbia Monteiro de Castro

Cunha, o professor orientador Roberto Baracat de Araújo ou a co-orientadora Dra. Gleidice Eunice Lavallo no telefone (31) 3409-2276 ou o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, situado à Av. Antônio Carlos Magalhães, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

9.3. Anexo 3 – Distribuição das raças de acordo com o tratamento

