

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DE
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES
SUBMETIDOS À ELETROQUIMIOTERAPIA**

**Cynthia Marchiori Bueno
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DE
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES
SUBMETIDOS À ELETROQUIMIOTERAPIA**

Cynthia Marchiori Bueno

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária

2017

B928 Bueno, Cynthia Marchiori
a Avaliação da resposta tecidual de carcinomas de células
escamosas em cães submetidos à eletroquimioterapia / Cynthia
Marchiori Bueno. -- Jaboticabal, 2017
xi, 30 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Andrigo Barbosa De Nardi

Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Carlos Henrique
Maciel Brunner

Bibliografia

1. Angiogênese. 2. Carcinoma espinocelular. 3.
Eletroporação. 4. Reparação tecidual I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES SUBMETIDOS À ELETROQUIMIOTERAPIA

AUTORA: CYNTHIA MARCHIORI BUENO

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE MACIEL BRUNNER

Departamento de Clínica Médica / UNIP / São Paulo/SP

Jaboticabal, 01 de agosto de 2017

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CYNTHIA MARCHIORI BUENO- Nascida em Batatais- SP, no dia 18 de Abril de 1983, filha de José Lopes Bueno e Regina Sueli Marchiori. Formou-se em Medicina Veterinária em Dezembro de 2012 pela Universidade de Franca-UNIFRAN. Durante a graduação foi bolsista de 3 iniciações científica, pesquisando sobre avaliação da caspase-3 nos adenomas e carcinomas mamários, e da avaliação da COX-2 nos adenomas e carcinomas mamários sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, utilização do 2-octyl cianoacrilato na ovariectomia de coelhas, comparativamente ao fio de náilon sob orientação da Profa. Dr^a Cristiane dos Santos Honsho, com diploma de honra ao mérito pelo melhor trabalho avaliado pela comissão científica “Avaliação da caspase-3 nos adenomas e carcinomas mamários”. Ingressou no programa de aprimoramento em cirurgia veterinária de pequenos animais da Unesp de Jaboticabal no ano 2013. Em março de 2015 ingressou no mestrado pelo programa de Cirurgia Veterinária com ênfase em oncologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi.

“Jamais creia que os animais sofrem menos do que os humanos. A dor é a mesma para eles e para nós. Talvez pior, pois eles não podem ajudar a si mesmos.”

— Dr. Louis J. Camuti

DEDICATÓRIA

Ao meu grande, único e verdadeiro amor Marcelo “Preto”, a minha rainha Regina, ao meu pai José Lopes, meu príncipe Arthur e minhas princesas Simone, Rita, Naiana e Ana Beatriz

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi, meu mestre desde a época da graduação, oferecendo-me a oportunidade de ser sua orientada em duas iniciações científicas, o imenso prazer de mais uma vez ser meu orientador em dois anos de residência e nesta jornada de pós-graduação, mais uma vez me orientando. Obrigada por dividir todo seu conhecimento comigo, sempre disposto a ensinar com seu jeito calmo e sereno. Sem seu apoio, querido e eterno professor, nada disso seria possível;

A generosa, bondosa, justa e rigorosa Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans, por ter me apresentado a eletroquimioterapia e muito obrigada do fundo do meu coração por tudo que me ensinou durante esses dois anos, minha eterna gratidão por toda a sua contribuição com esta pesquisa, mas obrigada mesmo pela oportunidade de conviver ao lado de uma pessoa com o caráter tão alvo como o seu;

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Maciel Brunner pela confiança em ceder o equipamento de eletroporação LC BK-100 para esta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, por todo seu auxílio nesta pesquisa, sem seu apoio e imenso conhecimento muitas coisas não teriam sido possíveis;

Ao amigo que este mestrado me deu Denner Santos dos Anjos por todos os áudios de whatsapp respondidos, todos os laudos discutidos, todas as aulas de busca de artigos, todos os ensinamentos, amizade e muita lua de mel;

A Profa. Dra. Geórgia Móde Magalhães e a Profa. Larissa Magalhães pelo auxílio com esta pesquisa;

Ao Prof. Daniel Kan Honsho, por ter aberto carinhosamente às portas do Hospital Veterinário da Universidade de Franca, para que grande parte desta pesquisa fosse realizada;

Ao Sr. José Luiz de Souza por ter cedido gentilmente seu trabalho confeccionando

com total capricho e conhecimento invejável todos os cortes histológicos desta pesquisa;

A toda equipe da Oncologia, Anestesiologia e Cirurgia do Hospital Veterinário da Unesp- Jaboticabal e Universidade de Franca- Unifran, por todos os casos atendidos em conjunto para que este trabalho fosse concluído;

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da Unesp - Jaboticabal e Universidade de Franca - Unifran, a eles meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Certificado de Comissão de Ética	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1 Seleção dos animais	8
4.2 Eletroquimioterapia.....	8
4.3 Mensuração do volume tumoral.....	9
4.4 Remissão tumoral.....	9
4.5 Coleta e armazenamento das amostras	9
4.6 Avaliação Histopatológica	10
4.7 Avaliação Imuno-histoquímica	10
4.8 Análise Estatística.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÃO.....	21
7. REFERÊNCIAS.....	22
8. Apêndice 1.....	29

CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA

 Universidade
de Franca

Av. Dr. Armando Salles Oliveira, 201
14404 600
Franca SP
T 55 16 3711 8888
F 55 16 3711 8886

Franca, 6 de outubro de 2015.

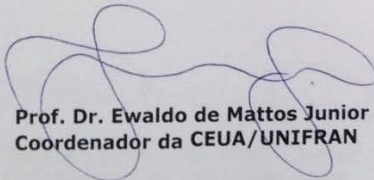
DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**Avaliação da resposta tecidual de diferentes neoplasias após eletroquimioterapia em cães**", protocolo nº **033/15**, de autoria da pesquisadora **Sabryna Gouveia Calazans**, por estar de acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi deliberado **APROVADO ad-referendum** no dia 25 de setembro de 2015.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria da CEUA/UNIFRAN o **RELATÓRIO FINAL** até **30 de março de 2017**.

A Declaração de Aprovação para publicação desse projeto será expedida pela CEUA/UNIFRAN, somente, **APÓS APROVAÇÃO DO RELATÓRIO FINAL**.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Ewaldo de Mattos Junior
Coordenador da CEUA/UNIFRAN



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES SUBMETIDOS À ELETROQUIMIOTERAPIA

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a segunda neoplasia maligna cutânea que mais acomete os cães. Apesar da cirurgia consistir na terapia de eleição, a eletroquimioterapia (EQT) vem sendo cada vez mais utilizada. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a resposta tecidual em CCE cutâneo em cães após 21 dias da EQT. Desta maneira, este é o primeiro estudo a avaliar as modificações nos fatores angiogênicos e reparação tecidual induzidas pela EQT em CCE cutâneo de em cães. Foram avaliados 11 cães, totalizando-se 18 lesões, antes da EQT (D0) e 21 dias após (D21). O protocolo de EQT consistiu na aplicação de sulfato de bleomicina seguida por cloridrato de doxorrubicina utilizando eletroporador LC BK-100. Foram determinados volume tumoral, índice mitótico, necrose microscópica, quantificação das fibras colágenas do tecido conjuntivo (pela coloração de Tricrômico de Masson) e a expressão imuno-histoquímica de fatores angiogênicos VEGF e CD31. Observou-se que a média do volume tumoral foi significativamente inferior ao 21º dia (D21: $21,99 \pm 37,55$) após a realização da EQT (D0: $29,52 \pm 40,95$) ($p=0,044$). Contudo, não foram encontradas diferenças para as demais variáveis ($p>0,05$). Conclui-se que, em CCE de cães, a EQT não foi capaz de alterar o índice mitótico, a necrose microscópica e as estruturas de colágeno, além dos fatores angiogênicos VEGF e CD31, após 21 dias do tratamento. Apesar disso, no mesmo momento de avaliação, redução significativa do volume tumoral pode ser observada. Sugerem-se estudos adicionais que incluam momentos de avaliação adicionais antecedendo o 21º dia, assim como a investigação de outros marcadores angiogênicos e de reparação tecidual em CCE cutâneos de cães submetidos à EQT.

Palavras-chaves: angiogênese, carcinoma espinocelular, eletroporação, reparação tecidual

EVALUATION OF TISSUE ALTERATION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN DOGS SUBMITTED TO ELECTROCHEMOTHERAPY

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common cutaneous malignant neoplasm in dogs. Electrochemotherapy (ECT) is a recent technique in veterinary medicine that constitutes an alternative and effective form to treat SCC in dogs and cats. The aim of this study was to evaluate modifications in the angiogenic factors and tissue repair induced by ECT after 21 days of ECT. Eleven dogs were evaluated (18 lesions), before (D0) and after (D21) ECT. The ECT protocol consisted of the application of bleomycin sulfate followed by doxorubicin hydrochloride using the BK-100 LC electroporator. Tumor volume, mitotic index, microscopic necrosis, quantification of connective tissue collagen fibers (by Masson's trichrome staining) and immunohistochemical expression of angiogenic factors by VEGF and CD31 were determined. It was observed a significant reduction in size of the tumor volume after ECT (D0: 29.52 ± 40.95 ; D21: 21.99 ± 37.55) ($p = 0.044$). However, no differences were found in D0 and D21 for mitotic index, microscopic necrosis, collagen structures and angiogenic factors ($p > 0.05$). In conclusion, ECT is an effective technique to treat cutaneous SCC in dogs, however cell proliferation, necrosis and angiogenic factors were not affected after 21 days of ECT, suggesting a prior moment to be evaluated. Further studies on other angiogenic markers and tissue repair in cutaneous SCCs of dogs submitted to ECT are necessary.

Keywords: Angiogenesis, electroporation, epidermoid carcinoma, tissue repair

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a segunda neoplasia maligna cutânea que mais acomete os cães, sendo predispostos aqueles de pelagem clara e frequentemente expostos ao sol (GROSS et al 2005; MULLER; KIRK 2013).

Já foram descritas inúmeras modalidades terapêuticas para animais com CEC, como cirurgia, criocirurgia, radioterapia, terapia fotodinâmica e eletroquimioterapia (MULLER; KIRK, 2013; SPUGNINI et al., 2016). Apesar da ressecção cirúrgica representar a terapia de eleição, esta pode promover danos estéticos indesejáveis e causar insatisfação ou rejeição por parte dos tutores após o resultado cosmético final. Além disso, uma vez que o CEC frequentemente acomete regiões abdominal, inguinal, membros e prepúcio, sua exérese pode ser muitas vezes mutiladora, sobretudo em casos de lesões múltiplas ou extensas, o que aumenta o risco de complicações pós-operatórias e pode prejudicar a capacidade funcional de membros, órgãos e outras estruturas (WHITROW; STRAW, 1990; RUSLANDER; KASER-HOTZ; SARDINAS, 1997; LASCELLES et al., 2000).

Dentro deste contexto, a eletroquimioterapia (EQT) vem sendo cada vez mais utilizada em cães acometidos por CCE, sem induzir significativos danos estéticos ou comprometimento de estruturas adjacentes (SILVEIRA et al., 2010). A EQT consiste na associação de fármacos antineoplásicos com a eletroporação, que permite o aumento da concentração do medicamento antitumoral no interior da célula, potencializando sua citotoxicidade (MIR et al., 1991; SERSA; CEMAZAR; MIKLAVCIC, 1995).

Ainda que a EQT tenha demonstrado eficácia em diferentes tipos de tumores em cães (TOZON et al., 2005; SILVEIRA et al., 2010; SUZUKI et al., 2016), pouco se sabe sobre as alterações teciduais ocasionadas por este tratamento (SPUGNINI et al., 2007). Desta maneira, este é o primeiro estudo a avaliar as modificações nos fatores angiogênicos e reparação tecidual induzidas pela EQT em CCE cutâneo de em cães.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta tecidual em CCE cutâneo em cães após 21 dias da EQT.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a EQT:

- Induz redução no volume tumoral;
- Influencia o índice mitótico e necrose microscópica, pelo exame histopatológico;
- Altera estruturas de colágeno, avaliadas pela coloração de Tricrômico de Masson.
- Modifica a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de angiogênese VEGF e CD31;

3. REVISÃO DE LITERATURA

O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna, que pode acometer diversas espécies, incluindo a humana (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). É uma das neoplasias cutâneas mais frequentes em cães (ALMEIDA et al., 2001).

Entre as neoplasias cutâneas induzidas por raios solares em cães e gatos, o CCE está entre os tumores de maior prevalência (VILAR-SAAVEDRA et al., 2014). Desta forma, animais que possuem pelagem clara, com pouca quantidade de pelos e expostos longos períodos a luz solar, são considerados predispostos (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; FERREIRA et al., 2009). No cão, os locais mais comumente acometidos pelo CCE são flanco, abdome e leito ungueal (GROSS, 2005).

As lesões do CCE em cães podem ser únicas ou múltiplas, macroscopicamente se apresentam alopecicas, descamativas e erosivas, em forma de placas ou nódulos, com superfície irregular e que sangram com facilidade (MEDLEAU; HNILICA, 2006). Podem apresentar comportamento invasivo localmente, causando deformidades anatômicas com frequência e apresentam baixa capacidade metastática, sendo os linfonodos regionais, os locais mais acometidos (GRANDI; RONDELLI, 2016).

A ressecção cirúrgica, quando realizada com amplas margens de segurança, é a principal modalidade de tratamento para o CCE, proporcionando maiores chances de cura para o paciente (GRAHAN 2005; THONSON, 2007). Em estádios avançados, podem ser necessárias cirurgias extensas para alcançar margens adequadas, o que pode ocasionar danos estéticos e funcionais (SCHMIDT et al., 2005). Além da cirurgia, a quimioterapia adjuvante deve ser empregada para promover remissões mais duradouras (KUHNEL; KESSLER, 2014). Porém, o tratamento quimioterápico utilizado isoladamente não é suficiente para induzir remissões completas (FERREIRA et al., 2009; GRANDI; RONDELLI, 2016).

Outras modalidades de tratamento incluem terapia fotodinâmica (EMÍLIO et al., 2006, SAJISEVI et al., 2015), criocirurgia (QUEIROZ; MATERA 2003; LUCAS; LARSSON, 2006), radioterapia (GRIER; MAYER 2007; FERNANDES et al., 2010) e eletroquimioterapia (EQT) (TOZON et al., 2005; CEMAZAR et al., 2008; TOZON

et al., 2016). Esta é uma modalidade de tratamento antitumoral no qual se utilizam pulsos elétricos sobre o tumor, com a finalidade de promover a eletroporação e aumentar a permeabilidade da membrana celular ao fármaco quimioterápico, potencializando sua ação citotóxica (MIR et al., 2006; LARKIN et al., 2007). Para originar poros reversíveis na membrana da célula, a eletroporação deve criar pulsos curtos e com intensidade elevada (MIR et al., 2006; CEMAZAR, et al., 2008; BRUNNER, 2016). Segundo Brunner et al. (2016) a recomendação é que se utilizem pulsos elétricos de 1000 a 1300 volts, durante 100 microssegundos, limitado a cinco amperes.

Nas últimas décadas, o uso da EQT em pacientes com câncer tem sido cada vez mais estudado e as respostas frente a esta modalidade de tratamento, são evidentes (SPUGNINI, BALDI, 2014; SILVEIRA et al; 2016). Esta terapia está emergindo em medicina veterinária, uma vez que proporciona diversos aspectos positivos como a segurança da técnica e facilidade de execução. Além disso, a EQT promove mínimos efeitos secundários e os períodos de tratamento são curtos, permitindo que o paciente retorne rapidamente a sua rotina diária (TOZON et al., 2005; MARTY et al., 2006, KODRE et al., 2009, SILVEIRA et al., 2010).

Entre os modelos de eletroporadores utilizados em medicina veterinária, o modelo LC BK-100, modelo brasileiro, é constituído de uma ponteira com seis agulhas em sua extremidade, permitindo a dispersão dos pulsos elétricos no tumor. O ideal é que se utilize pulsos elétricos curtos de alta intensidade, 100 μ s e 1000 a 1300 volts (BRUNNER, 2016). Além dos eletrodos em agulhas, os em placa também têm sido utilizados (TOZON et al., 2016). Neves et al. (2014) avaliaram a eficácia entre placas paralelas e agulhas no tratamento de tumores cutâneos e foi verificado que ambos os eletrodos demonstraram formação de campo elétrico adequado. Outro estudo conduzido por LINNERT et al., (2012), realizaram EQT em pacientes humanos com metástase cerebral, utilizando eletrodo de agulha desenvolvido penetrar o encéfalo, ampliando o uso da EQT em metástases inoperáveis em locais de difícil acesso.

Para a realização da EQT, o quimioterápico pode ser aplicado pela via intralesional ou intravenosa (SILVEIRA et al., 2010, BENEVENTO et al., 2012; SILVEIRA et al., 2016).

Em um relato de paciente humano com metástase de melanoma cutâneo acometido de 224 nódulos tumorais, a EQT foi realizada com bleomicina pela via intravenosa, observando-se remissão completa após quatro sessões (SNOJ et al., 2007). Em outro estudo, um paciente com 133 lesões de melanoma cutâneo, foi submetido à EQT, sendo o fármaco aplicado pela via intralesional em 82 nódulos, promovendo remissão de 78% dos nódulos tratados (SERSA et al., 2000).

Dentre os mecanismos de ações descritos da EQT, podemos citar o aumento da permeabilidade da membrana e maior disponibilidade do medicamento intracelular; efeitos vasculares locais e o envolvimento da resposta imune. O aumento da permeabilidade da membrana pela exposição das células ao campo elétrico aumenta a passagem da bleomicina para o ambiente intracelular. (MIKLAVCIC et al., 2014).

A EQT também apresenta efeitos vasculares distintos. Além de aumentar o consumo do fármaco nas células estromais, a EQT também atua nas células endoteliais dos vasos sanguíneos tumorais. Essa ação induz a apoptose endotelial e conseqüentemente a supressão do fluxo sanguíneo tumoral (SERSA et al., 2008). Outro efeito observado é a vasoconstrição (MARKELC et al., 2013). Esse efeito de bloqueio vascular promove a permanência do fármaco no interior do tumor por tempo prolongado, proporcionando melhor ação do quimioterápico (JARM et al., 2010).

O envolvimento da resposta imune do organismo também poderá influenciar a eficácia da EQT. Evidentemente, devido à heterogeneidade das células tumorais nas neoplasias, nem sempre todas as células são efetivamente erradicadas pela EQT (SERSA et al., 1997). Isso se deve ao fato de algumas células não apresentarem eletroporação e/ou fármaco não estar disponível para todas as células neoplásicas (MUFTULER et al., 2006).

A EQT é indicada principalmente para tumores sólidos e sua aplicação é limitada em casos de neoplasias ósseas ou hematopoiéticas (MIR et al., 1998). Entretanto, Fini et al. (2013) utilizaram esta modalidade de tratamento em ratos com metástase de carcinoma mamário em tíbia e notaram, além de ausência de efeitos colaterais, remissão completa da neoplasia com aspecto ósseo semelhante ao osso normal, avaliado tanto macroscopicamente e histologicamente, quanto por radiografia e microtomografia, mostrando que a EQT pode ser promissora no controle das neoplasias ósseas.

Kodre et al. (2009), em um estudo em cães com mastocitoma, realizaram EQT com cisplatina, aplicada pela via intratumoral, e observaram remissão completa em nove cães, com tempo livre de doença de até 43 meses. Já Tozon et al. (2005), avaliaram a eficácia da EQT com bleomicina ou cisplatina em 26 nódulos de neoplasias perineais em 12 cães. Os autores constataram remissões superiores a 60%, comprovando a eficácia desta modalidade de tratamento.

Suzuki et al. (2016) relataram o caso de um cão acometido por tumor venéreo transmissível em seio nasal, com progressão da doença mesmo após seis sessões de quimioterapia com vincristina e duas de doxorrubicina. O paciente apresentou remissão completa de 12 meses após uma sessão de EQT com bleomicina, adjuvante à cirurgia.

Recentemente, Spugnini et al. (2017) relataram a utilização da EQT guiada por ultrassonografia em um felino de 12 anos acometido por timoma, conferindo remissão parcial e controle local. Portanto, apesar de não induzir remissão completa, a EQT pode ser uma importante terapia neoadjuvante para pacientes acometidos por neoplasias viscerais.

Embora a EQT possa promover respostas variáveis em diferentes tipos tumorais, a eficácia da terapia também está relacionada ao volume tumoral. Mali et al. (2013) realizaram análise baseada em dados de 1466 neoplasias de qualquer tipo histológico, com a realização de uma única sessão de EQT para induzir a remissão tumoral e concluíram que a probabilidade de remissão completa é maior em neoplasias menores que 3 cm. Sersa et al. (2008), avaliaram as alterações vasculares promovidas pela EQT em sarcomas subcutâneos em roedores e constataram que a EQT interrompe a circulação após a aplicação dos pulsos elétricos, estendendo-se até 24 horas após o término do procedimento. Para este estudo, o efeito vascular foi investigado por fluxometria laser doopler e azul patente, enquanto a extensão da hipóxia foi avaliada pela técnica de imuno-histoquímica com o marcador pimonidazol, além da pressão parcial de O₂ por elétron. A hipóxia é responsável por induzir extensas áreas de necrose, 48 horas após o tratamento. Esta pesquisa demonstrou o efeito antitumoral da EQT, que promoveu remissão completa em 38% dos tumores, 100 dias após o procedimento.

Além da reparação tecidual, a angiogênese também pode estar envolvida na carcinogênese e tem sido amplamente estudada (FOLKMAN 1990; FERRARA et al., 2003). Al-Dissi et al. (2007) estudaram 19 cães com CCE e observaram que 89% das amostras tumorais apresentaram imunomarcção de VEGF. Além disso, houve correlação positiva entre sua expressão e o índice proliferativo, determinado pelo Ki67. É possível que esta relação se deva à função autócrina do VEGF estimulando o crescimento das células tumorais.

Em estudos dos quais objetiva-se avaliar a angiogênese, deve-se levar em consideração diversos fatores, entre eles, a técnica empregada para a avaliação, como a imuno- histoquímica, cuja escolha do anticorpo e a recuperação antigênica podem exercer efeito significativo sobre os resultados. Devido a estas variações, outros anticorpos além do VEGF têm sido utilizados para avaliar a angiogênese em neoplasias. Em um estudo desenvolvido por Wang et al. (2008), a densidade microvascular foi estimada em xenoenxertos de tumor humano e de rato, por meio de imuno- histoquímica com os anticorpos CD31 e Fator VIII, observando o CD-31 de forma mais eficiente na identificação de microvasos em relação ao Fator VIII.

Diante do exposto, ressalta-se a importância do estudo do efeito da eletroquimioterapia no tecido tumoral e sua influência na expressão de fatores angiogênicos, proliferação celular, bem como na reparação tecidual.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

A pesquisa foi conduzida mediante anuência e vigilância da Comissão de Ética no Uso de Animais protocolo nº 033/15 pela Universidade de Franca. Os tutores foram previamente informados e consentiram os procedimentos referentes a esta pesquisa.

Foram inseridos no estudo 11 cães (totalizando 18 lesões), independente de porte, raça, sexo e idade, com diagnóstico histopatológico prévio de CCE cutâneo. Os animais foram provenientes do Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP/Câmpus Jaboticabal-SP e Hospital Veterinário da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca- SP.

Os pacientes foram avaliados por meio de exame físico e laboratoriais compreendendo hemograma e perfil bioquímico sérico (ureia, creatinina, albumina e alanina aminotransferase), bem como exames de imagem, como radiografias de tórax (três projeções) e ultrassonografia abdominal. Citologia dos linfonodos regionais foram realizadas quando estes apresentaram-se palpáveis.

4.2 Eletroquimioterapia

O protocolo de EQT consistiu na aplicação de sulfato de bleomicina (Cinaleo®-Meizler, Barueri-SP), na dose de 15U/m², pela via intravenosa administrada cinco minutos antes da aplicação dos pulsos elétricos. Em seguida, foi realizada a infusão de cloridrato de doxorubicina (Cloridrato de Doxorubicina®-Eurofarma Laboratórios S.A. Ribeirão Preto – SP), na dose de 30 mg/m², durante a aplicação dos pulsos elétricos. O procedimento limitou-se ao tempo máximo de 28 minutos. As aplicações dos pulsos elétricos foram promovidas sobre toda a extensão da lesão utilizando eletroporador LC BK-100. Esse aparelho é constituído de eletrodo composto por seis agulhas de aço, paralelamente dispostas (0,3mm) e equidistantes (7 mm), promovendo pulsos elétricos de tensão de 1000 V, em onda quadrada unipolar com duração de 100 µs, com frequência de 1Hz, totalizando-se oito pulsos elétricos, limitado a cinco amperes.

Os animais receberam de uma a três sessões, a depender da extensão tumoral com intervalos de 21 dias, porém todas as amostras foram coletadas e analisadas exclusivamente após a primeira sessão de EQT (D21). Todos os procedimentos de EQT foram realizados com o paciente sob anestesia geral, recebendo posteriormente analgesia no pós-operatório incluindo a administração subcutânea de meloxicam¹ (0,2 mg/kg) e tramadol² (2 mg/kg).

4.3 Mensuração do volume tumoral (cm³)

O volume tumoral foi mensurado imediatamente antes do momento da EQT (D0) e após 21 dias do procedimento (D21), com auxílio de paquímetro digital, obedecendo à fórmula $v = \text{comprimento} \times \text{altura} \times \text{largura} \times \pi/6$ ($\pi=3,14$) (cm³).

4.4 Remissão tumoral

Para avaliação da resposta ao tratamento dos cães submetidos a EQT, os pacientes foram avaliados antes de cada sessão, conforme Quadro 1.

Quadro 1. Classificação da remissão tumoral (Adaptado Eisenhauer et al., 2009).

Avaliação	Descrição
Remissão completa (RC)	Remissão total no volume tumoral avaliado
Remissão parcial (RP)	Diminuição de pelo menos 30% no volume tumoral
Doença progressiva (DP)	Aumento de pelo menos 20% no volume tumoral ou aparecimento de novas lesões
Doença estável (DE)	Redução de 30% ou aumento de 20% no volume tumoral

4.5 Coleta e armazenamento das amostras

A primeira coleta de tecido tumoral foi efetuada imediatamente antes da primeira sessão de EQT (D0). A segunda amostra foi obtida no 21º dia (D21). A amostra foi coletada com o paciente anestesiado, empregando-se “punch” dermatológico de seis milímetros, pinça e tesoura.

¹ Meloxicam (0,2 mg/kg)

² Cloridrato de Tramadol (2 mg/kg)

As amostras foram acondicionadas em formol 10% por 24h e posteriormente em álcool 70% até a preparação dos blocos de parafina. As amostras foram destinadas às avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas.

4.6 Avaliação histopatológica

Foram realizados cortes de 3 μ m, dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica em hematoxilina-eosina (HE). Para a contagem do índice mitótico, obteve-se a soma do número de figuras de mitose em 10 campos aleatórios de maior aumento (400x).

A necrose microscópica foi classificada como ausente, grau I (inferior a 50%) ou grau II (acima de 50%) (LIPTAK e FORREST, 2013). A coloração de Tricrômico de Masson (TM) foi realizada conforme Prophet et al. (1995) (APÊNDICE 1), cuja intensidade das fibras colágenas foi classificada em discreta, moderada e acentuada. Essas análises foram realizadas de maneira observacional através de microscopia de luz.

4.7 Avaliação imuno-histoquímica

As amostras foram encaminhadas para o Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-Unesp, Botucatu. Para avaliação da imunoexpressão de VEGF e CD31, lâminas contendo cortes de 3 μ m, desparafinizados, reidratados e, então, submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica com os respectivos anticorpos primários na seguinte ordem: 1) recuperação antigênica com solução tampão citrato pH 6,0 na pascal por 10 minutos; 2) Resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos; 3) Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 8% diluído em metal aldeído por 10 minutos; 4) Bloqueio das proteínas com bloqueio comercial por 30 minutos; 5) Incubação com anticorpos primários a 4° C por 18 h com as respectivas diluições: VEGF 1:100; CD31 1:200 overnight 6) Incubação do anticorpo secundário (Envision®) por 1 hora; 7) revelação pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB líquido, reagente do kit Reveal Spring – Cód. SPD -125) por 5 minutos; 8) contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto e desidratação do corte e montagem das lâminas. Nos controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por diluentes.

Posteriormente, para VEGF, as amostras foram classificadas de acordo com os escores de 0 a 4, conforme quadro 2.

Quadro 2. Classificação da marcação do VEGF de acordo com seu respectivo escore.

Escore	Classificação
0	Ausência de marcação
1	5% até 25% de células positivas
2	26% a 50% de células positivas
3	51 a 75% de células positivas
4	> 76% de células positivas

Para contagem dos escores, considerou-se a marcação citoplasmática de VEGF. Para CD31 foi realizada a média de contagem dos vasos marcados em cinco campos de maior aumento (400x).

4.8 Análise estatística

Os resultados do volume tumoral e índice mitótico foram obtidos foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e caso as variáveis apresentassem distribuição gaussiana, utilizou-se o teste t. Caso contrário, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Para as demais comparações entre os momentos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism® (versão 6.0 – GraphPad Software, Inc. 2015), com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos pacientes, número de lesões e a resposta ao tratamento podem ser conferidos na Tabela 1.

Dos 11 pacientes, cães sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos (n=5), seguidos pela raça American Pitt Bull (n=3), Boxer (n=2) e Pointer (n=1). A maior representatividade dos cães SRD em nosso estudo (45%) pode ser atribuída à expressiva população desses animais em nosso país, além do fato do hospital, onde a pesquisa fora conduzida, receber em sua maioria tutores com condição sócio-econômica limitada. Dentre os cães de raça pura, o American Pitt Bull foi o mais acometido (27%), possivelmente pela baixa densidade da cobertura pilosa (KRAEGEL;MADEWELL, 2000; GROSS et al., 2005).

A média de idade dos cães com CEC é de 10 anos, porém já foram descritos casos de animais a partir de quatro meses de idade (GROSS et al., 2005, POGGIANI et al., 2012, MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), evidenciando que pacientes jovens podem ser acometidos por esta neoplasia. Nesta pesquisa, a média de idade dos animais foi de 7,5 anos (mínima de dois anos e máxima de 10 anos). Maior incidência foi observada em fêmeas (n=10) que representaram 90% dos pacientes, divergindo de Gross et al. (2005) e Salashe (2000) que afirmaram que o CCE acomete cães de ambos os sexos em igual frequência. Cabe ressaltar que o número de animais em nosso estudo é insuficiente para sugerir predisposição sexual.

Cinco animais apresentaram mais de uma lesão, a maioria das lesões estava localizada em região abdominal (n=10) ou torácica (n=5), seguidas por prepúcio (n=1), região axilar (n=1) e membro pélvico (n=1). De fato, a região abdominal, prepúcio e face ventral dos membros, estão entre os locais mais acometidos pelo CCE no cão (GROSS et al., 2005). No que se refere à resposta ao tratamento, observou-se que a média do volume tumoral ($21,99 \pm 37,55$) foi significativamente inferior ao 21º dia após a realização da EQT ($29,52 \pm 40,95$) ($p=0,044$) (Figura 1), sendo que 11 lesões apresentaram RP, três lesões apresentaram DE e quatro lesões, DP. Cada paciente recebeu de uma a três sessões.

Tabela 1. Dados clínico-patológicos referentes aos 11 cães (18 lesões) diagnosticados com CCE submetidos à eletroquimioterapia.

ID	Raça	Idade (anos)	Sexo	Nº de tumores	Localização	Volume D0 (cm ³)	Volume D21 (cm ³)	Resposta	Nº sessões EQT	Sobrevida (dias)
1	Pitbull	8	M	2 (a,b)	Axilar (a) Prepúcio (b)	3,75 19,23	0,91 6,44	RP RP	3 / C	240 (NT)
2	Pitbull	9	F	1	Abdominal	5,04	0,73	RP	2	>570
3	Boxer	2	F	1	Lateral tórax	68,49	65,94	DE	2 / C	>480
4	SRD	10	F	2 (a,b)	Lateral tórax (a) Abdominal (b)	2,3 14,15	0,278 1,68	RP RP	1 / C	90 (NT)
5	SRD	7	F	1	Abdominal	93,57	118,24	DP	2	90 (SR)
6	Pitbull	9	F	4 (a,b,c,d)	Lateral tórax (a) Abdominal (b) Abdominal (c) Abdominal (d)	1,14 112,92 0,81 22,36	0,175 48,2 0,533 5,014	RP RP RP RP	2 / C	>420
7	SRD	Adulto	F	1	Abdominal	104,6	104,6	DE	2	90 (eutanásia)
8	SRD	Adulto	F	2 (a,b)	Abdominal (a) Lateral tórax (b)	4,24 0,22	10,36 1,046	DP DP	2	120 (eutanásia)
9	Pointer Inglês	8	F	1	Abdominal	76,93	30,03	RP	2 / C	300
10	Boxer	8	F	2 (a,b)	Lateral Tórax (a) MP (b)	0,314 0,141	0,113 0,28	RP DP	2	>390
11	SRD	7	F	1	Abdominal	1,2	1,31	DE	1	32 (eutanásia)

M, macho; F, fêmea

RP: remissão parcial; DE: doença estável; DP: doença progressiva

C: Cirurgia NT: óbito não relacionado ao tumor SR: sem reavaliação

MP: membro pélvico

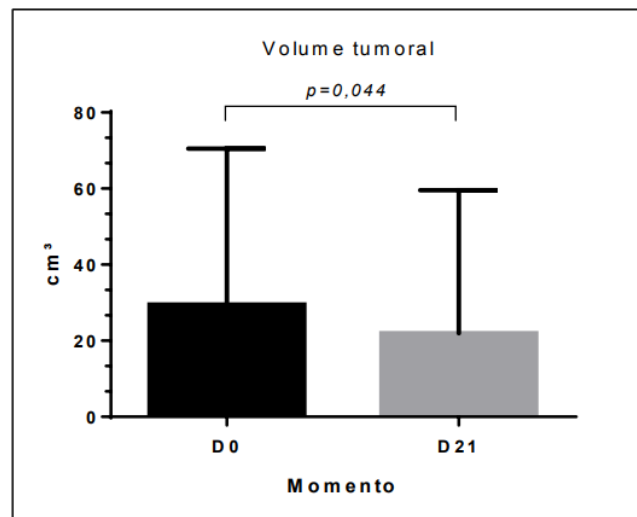


Figura 1. Representação gráfica das médias de volume tumoral antes e após a EQT em cães com carcinoma de células escamosas. A média do volume tumoral em D21 ($21,99 \pm 37,55$) foi significativamente inferior quando comparada à média em D0 ($29,52 \pm 40,95$); $p < 0,05$, teste de Wilcoxon. Jaboticabal – SP, 2017.

É possível que o volume tumoral exerça influência em sua remissão, assim como foi demonstrado por Tozon et al. (2005) ao estudarem 26 neoplasias perianais em 12 cães. Nesta pesquisa, os animais foram tratados com EQT e distribuídos em dois grupos conforme o volume tumoral, sendo o Grupo 1, constituído por cães com lesões menores de 1cm^3 e o Grupo 2, aqueles com lesões maiores de 1cm^3 . Cães do Grupo 1 apresentaram índice de RC de 88%, ao passo que o mesmo índice correspondeu a 22% nos animais do Grupo 2.

O índice mitótico é método indireto capaz de mensurar a atividade proliferativa, além de ser considerado fator prognóstico em diferentes neoplasias como mastocitoma, melanoma e tumores perineais (WEBSTER et al., 2008, SMEDLEY et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Em nosso estudo, não houve redução do índice mitótico após EQT (D0: $4,94 \pm 7,79$; D21: $4,28 \pm 6,04$) ($p = 0,8434$) (Figura 2), possivelmente pelo fato deste parâmetro não ser um marcador de proliferação tão sensível, já que não é capaz de avaliar todas as fases do ciclo celular.

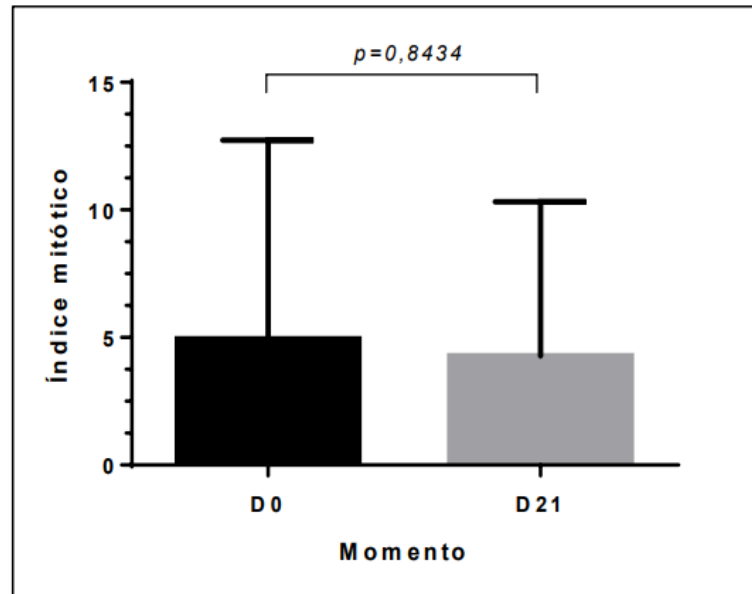


Figura 2. Representação gráfica das médias do índice mitótico antes e após a EQT em cães com carcinoma de células escamosas (D0: 4,94±7,79; D21: 4,28±6,04). Não foi observada diferença significativa entre os momentos; $p=0,8434$, teste de Wilcoxon. Jaboticabal – SP, 2017.

A necrose é considerada um dos efeitos adversos da EQT, como consequência da eletroporação. A extensão da necrose está relacionada ao tamanho do tumor e sua presença não está relacionada à dor ou desconforto (TOZON et al., 2005). No presente estudo, não houve diferença significativa do escore de necrose 21 dias após a EQT (D0: 1,39±1,29; D21 1,72±1,07) ($p=0,428$) (Figura 3), sugerindo que a necrose pode ser um fator relacionado ao próprio tumor, já que esteve presente antes do tratamento. É importante salientar que, macroscopicamente, a necrose induzida pela EQT costuma ser mais evidente nos primeiros sete dias após o tratamento (SPUGNINI et al., 2007), diferentemente deste estudo que avaliou a necrose ao 21º dia, por uma avaliação foi microscópica.

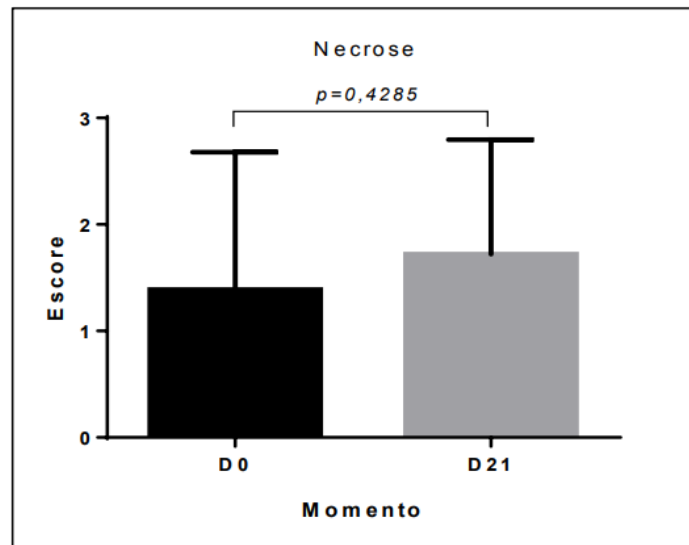


Figura 3. Representação gráfica das médias de escore de necrose antes e após a EQT em cães com carcinoma de células escamosas. Não foi observada diferença significativa entre os momentos avaliados (D0: 1,39±1,29; D21 1,72±1,07); $p=0,4285$, teste de Wilcoxon. Jaboticabal – SP, 2017.

A coloração do Tricrômico de Masson revelou presença de tecido conectivo peritumoral, sendo discreto em 2/18 (11,1%), moderado em 6/18 (33,3%) e acentuado em 10/18 (55,5%) das amostras avaliadas de CCE antes da EQT. Após o procedimento, observou-se distribuição semelhante nas amostras, não sendo observada diferença na marcação de tecido conectivo peritumoral ($p>0,05$) (Quadro 2) (Figura 4) (Figura 5).

Quadro 2. Número de amostras de acordo com a intensidade de marcação pelo Tricrômico de Masson antes e após a EQT em CCE em cães.

	Momento D0	Momento D21
Discreto	2	2
Moderado	6	6
Acentuada	10	9



Figura 4. Representação gráfica da distribuição das intensidades de marcação da pelo Tricrômico de Masson em cães com carcinoma de células escamosas antes e após a EQT. Não houve diferença entre os momentos avaliados; $p > 0,05$; teste de Wilcoxon.

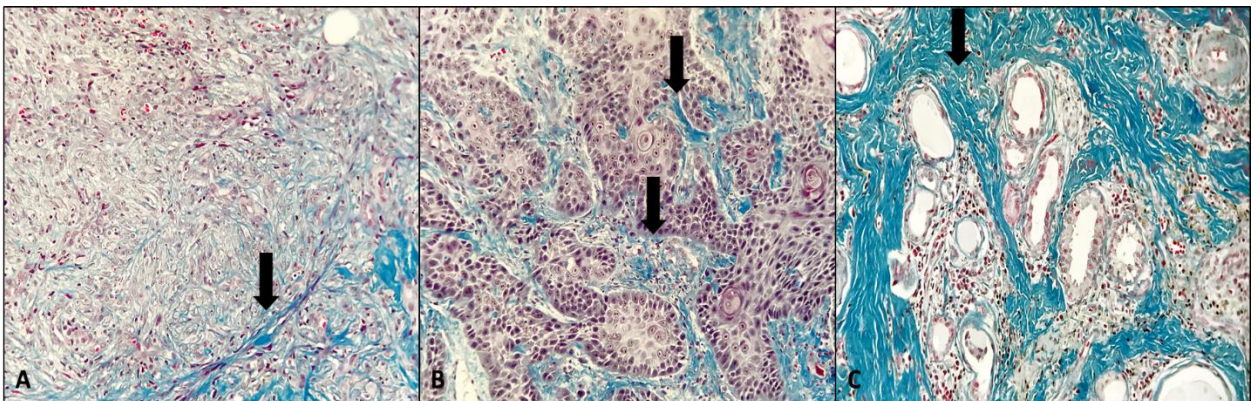


Figura 5. Fotomicroscopia de amostras de CEC cutâneo de cães, demonstrando marcação discreta (A), moderada (B) e acentuada (C) (setas) caracterizado pela coloração esverdeada (fibras colágenas) entre o tecido tumoral (Coloração de Tricrômico de Masson, aumento de 10x).

Os resultados observados no presente estudo para os diferentes graus de marcação do TM são semelhantes aos de Chandrashekaraiyah et al. (2011) para cães com CCE cutâneo que também observaram 11,7% de marcação discreta, 47% de marcação moderada e 41% marcação acentuada. Por outro lado, Wu et al. (2014), observaram em pacientes humanos com carcinoma prostático com escore de Gleason 6-7, maior marcação peritumoral das células estromais (82,8%) quando comparado ao escore de Gleason 8-9, com apenas 15% de marcação.

Além disso, os carcinomas prostáticos indiferenciados apresentaram pouco ou nenhuma marcação do componente estromal, sugerindo pior prognóstico. Embora o estudo citado tenha associado o componente estromal com grau histológico (escore de gleason), indiferenciação celular e prognóstico, ressaltamos que nossa pesquisa não consistiu um estudo de sobrevida e a indiferenciação celular não foi considerada, já que apenas três cães apresentaram carcinomas indiferenciados. Todas as lesões apresentaram componente estromal, mesmo os indiferenciados, não havendo alterações significativas após o tratamento.

A maioria das neoplasias liberam fatores angiogênicos como o VEGF, induzindo o crescimento de novos vasos sanguíneos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996), que está relacionado com progressão tumoral e metástase (KUKREJA et al., 2013). Em nosso estudo, a expressão de VEGF foi detectada em 100% das lesões de CCE cutâneo, em ambos os momentos, com marcação citoplasmática nas células neoplásicas e células endoteliais com padrão granular. De maneira semelhante, estudos prévios também observaram positividade variando de 89% a 100% de casos de CCE em cães (MAIOLINO; VICO; RESTUCCI, 2000; AL-DISSI et al., 2007). Ao serem avaliadas as amostras em D0, nenhuma foi classificada em escore 1 (5-25%), cinco lesões apresentaram escore 2 (26-50%), seis, escore 3 (51-75%) e seis, escore 4 (>75%). Em D21, uma amostra foi classificada escore 1 (5%-25%), seis lesões apresentaram escore 2 (26%-50%), uma amostra foi classificada escore 3 (51%-75%) e sete lesões, escore 4 (>75%). Não houve diferença significativa entre D0 e D21 ($p=0,4209$) (Quadro 3 e Figura 6).

Quadro 3. Número de lesões correspondendo ao escore de VEGF antes (D0) e após (D21) a EQT em CCE cutâneo de cães.

Escore de VEGF	Momento D0	Momento D21
0	N=0	N=0
1	N=0	N=1
2	N=5	N=6
3	N=6	N=1
4	N=6	N=7

Sabe-se que a eletroporação provoca uma alteração reversível do citoesqueleto das células endoteliais levando ao edema e comprometimento da barreira endotelial aumentando a resistência vascular. Este aumento permite maior permeabilidade da parede dos vasos a macromoléculas, além de retardar o crescimento tumoral (JARM et al., 2010). Devido ao íntimo contato das células endoteliais com o compartimento sanguíneo, elas tendem a sofrer maior eletropermeabilização do que os tecidos adjacentes, conseqüentemente, tornando-se expostas a um maior consumo de fármacos antineoplásicos após sua administração intravenosa.

Desta forma, ocorre apoptose endotelial induzida pela EQT, provocando obstrução do fluxo sanguíneo, e conseqüentemente, morte isquêmica de todas as células fornecidas pelo vaso sanguíneo (SERSA et al. 2008; JARM et al., 2010).

Com relação ao CD31, foi observada média de marcação variando entre 0,8-14,8% nas amostras em D0 e média de marcação entre 1,8-12,8% após a EQT em D21, sem diferença significativa entre os momentos avaliados ($p=0,561$) (Figura 6B). A alta expressão dessa proteína tem sido correlacionada com a agressividade tumoral, invasão linfovascular e metástase em pacientes humanos com carcinoma de cólon uterino (FILHO, 2004).

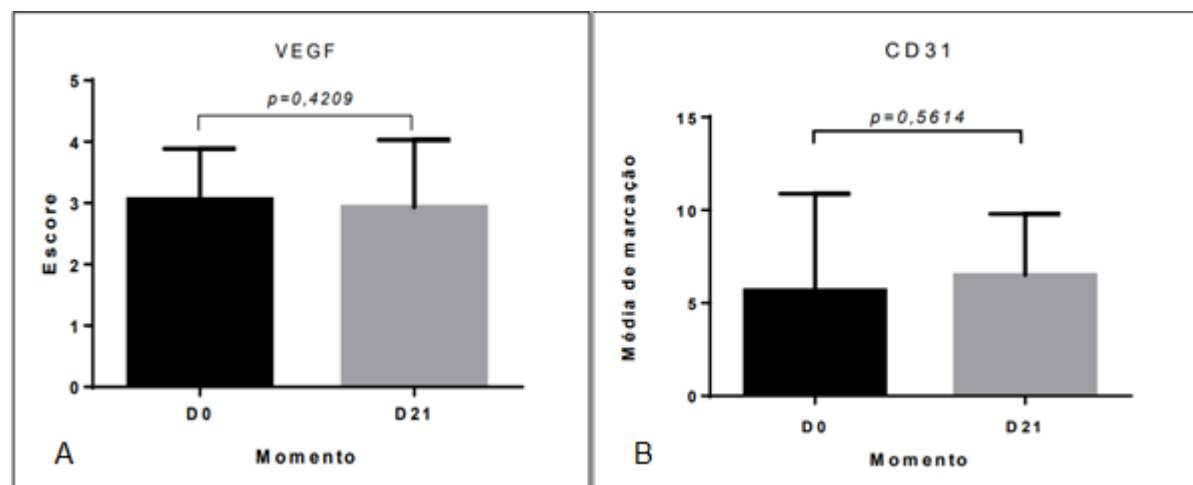


Figura 6. Representação gráfica das médias de (A) VEGF e (B) CD31, em D0 e D21 de cães com carcinoma de células escamosas. Não houve diferença entre os momentos avaliados pelo teste de Wilcoxon.

No entanto, apesar da EQT induzir alteração instantânea do fluxo sanguíneo e morte das células endoteliais, não houve alteração da expressão dos marcadores de angiogênese em D21. Acreditamos que o momento de avaliação pós EQT possa ter sido tardio, já que a alteração microvascular pode permanecer por até cinco dias após a EQT (SERSA et al. 2008; JARM et al., 2010), sendo possivelmente restabelecida ao 21º dia.

Além disso, outros marcadores podem auxiliar na compreensão da angiogênese, como o fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1), que pode influenciar a hipóxia transitória induzida pela EQT, bem como o microambiente tumoral após o estresse hipóxico, induzindo a expressão de fatores angiogênicos como VEGF (BLANCHER et al., 2000; RICE; HUANG, 2011; SANTOS et al., 2012).

De acordo com Spugnini et al. (2007), ao final do tratamento (14 dias) com EQT em melanoma oral, sarcoma de tecidos moles em cães e gatos, mastocitoma e CCE, pode-se observar a presença de tecido cicatricial e necrose mostrando a ocorrência do rearranjo tecidual e remissão tumoral.

Apesar de observarmos a remissão tumoral pela redução do volume tumoral e presença de necrose após a EQT, não houve alteração quanto à presença de fibroplasia no tecido tumoral avaliado pelo TM. Uma das limitações desse resultado pode ter sido pelo tamanho da amostra obtida pela biópsia (6mm) para a reavaliação após o procedimento.

6. CONCLUSÃO

Em CEC de cães, a EQT não foi capaz de alterar o índice mitótico, a necrose microscópica e as estruturas de colágeno, além dos fatores angiogênicos VEGF e CD31, após 21 dias do tratamento. Apesar disso, no mesmo momento de avaliação, redução significativa do volume tumoral pode ser observada. Sugerem-se estudos adicionais que incluam momentos de avaliação adicionais antecedendo o 21º dia, assim como a investigação de outros marcadores angiogênicos e de reparação tecidual em CCE cutâneos de cães submetidos à EQT.

7. REFERÊNCIAS

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, M.P.; PICHÉ, C.; SIROIS, J.; DORÉ, M. Expression of Cyclo-oxygenase-2 in Naturally Occuring Squamous Cell Carcinomas in Dogs. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 867-875, 2001.

BENEVENTO, R.; SANTORIELLO, A.; PERNA, G.; CANONICO, S. Electrochemotherapy of cutaneous metastasis from breast cancer in elderly patients: a preliminary report. **BMC Surgery**, v.12, (Suppl 1), p. S6, 2012.

BLANCHER, C.; MOORE, J.W.; TALKS, K.L.; HOULBROOK, S.; HARRIS, A.L. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1a and HIF-2a expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 60, p. 7106–7113, 2000.

BRUNNER, C.H.M. **Avaliação do comportamento vascular do tumor de Erlich na forma sólida em camundongos submetidos à eletroquimioterapia com bleomicina**. 2005, 75 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

BRUNNER, C. H. M. Eletroquimioterapia. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2ª edição. Editora Roca, 2016, p. 249-259.

CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G.; TOZON, N.; MIR, L. M.; MIKLAVCIC, D.; LOWE, R.; TEISSIE, J. Electrochemotherapy in veterinary oncology. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 826-831, 2008.

CHANDRASHEKARAI AH, G.B.; RAO, S.; MUNIVENKATAPPA, B.S.; MATHUR, K.Y. Canine Squamous Cell Carcinoma: a review of 17 cases. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, n.2, p. 79-86, 2011.

EMILIO, C.R.; DAGLI, M.L.Z.; DUTRA, F.; BECHARA, E.J.H.; GIOSO, M.A.; LARSSON, C.E.; PINOTTI, M.; ZECELL, D.M. Novo protocolo de terapia fotodinâmica utilizando-se o metil aminolevulinato e dtpa no tratamento de carcinoma espinocelular em felinos. In: **XI Congresso Brasileiro de Física Médica**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

EISENHAUER, E.A.; THERASSE, P.; BOGAERTS, J.; SCHWARTZ, L.H.; SARGENT, D.; FORD, R.; DANCEY, J.; ARBUCK, S.; GWYTHYR, S.; MOONEY, M.; RUBINSTEIN, L.; SHANKAR, L.; DODD, L.; KAPLAN, R.; LACOMBE, D.; VERWEIJ, J. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). **European Journal Cancer**, v. 45, p.228–247, 2009.

FERREIRA, K.C.R.S.; OLIVEIRA, R.T.; GOMES, C.; FERNANDES, A.O.; CARDOSO, C.S.; GARCES, T.N.A.; FARAON, A.; OLIVEIRA, L.O. 5-Fluorouracil associado à cirurgia como terapêutica para o carcinoma de células escamosas em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 89-92, 2009.

FERNANDES, M.A.R.; ANDRADE, A.L.; LUVIZOTO, M.C.R.; PIERO, J.R.; CIARLINI, L.D.R.P. Radioterapia em Medicina Veterinária: princípios e perspectivas. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n.2, p. 11-14, 2010.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v.9, n.6, 669-676, 2003.

FILHO, A.L.S. **Expressão das proteínas p53, Ki67 e CD31 no tumor e nas margens vaginais após histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino**. 2004. 116f Tese (Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.

FINI, M.; SALAMANNA, F.; PARRILLI, A.; MARTINI, L.; CADOSSO, M.; MAGLIO, M.; BORSARI, V. Electrochemotherapy is effective in the treatment of rat bone metastases. **Clinical Experimental Metastasis**, v. 30, n.8, p. 1033-1045, 2013.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 1, p. 4-6, 1990

GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. H. Neoplasias Cutâneas. In: DALEK, C.R.; DE NARDI, A.B. **Oncologia em Cães e Gatos**, Editora Roca, 2016, p. 343-346.

GRAHAM, J.C. Carcinoma de célula escamosa, pele. In: ROHDES, K.H. **Dermatologia de Pequenos Animais, Consulta em 5 minutos**. Revinter, 2005, p. 478.

GRIER, C.K.; MAYER, M.N. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 11, p. 1189-1191, 2007.

GROSS, T. L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. Epidermal tumors. In: **_____ Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2005, p. 581-585.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten, D.J. (Ed), **Tumors in domestic animals**, 4th ed., Iowa: Blackwell Publishing Company, 2002, p. 46-52.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n.3, p. 353-364, 1996.

JARM T, CEMAZAR M, MIKLAVCIC D, SERSA G. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. **Experimental Review Anticancer Therapy**, v.10, p. 729-746, 2010.

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

KODRE, V.; CEMAZAR, M.; PECAR, J.; SERSA, G.; COR, A.; TOZON, N. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. **In Vivo**, v. 23, p. 55-62, 2009.

KUHNEL, S.; KESSLER, M. Prognosis of canine oral (gingival) squamous cell carcinoma after surgical therapy. A retrospective analysis in 40 patients. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**, v. 42, n. 6, p. 359-366, 2014.

KUKREJA, I.; KAPOOR, P.; DESHMUKH, R.; KULKARNI, V. VEGF and CD 34: A correlation between tumor angiogenesis and microvessel density-an immunohistochemical study. **Journal Oral Maxillofacial Pathology**, v.17, n. 3, p. 367- 373, 2013.

LUCAS, R.; LARSSON, C. E. Crioterapia na clínica veterinária: avaliação da praticabilidade e efectividade em carcinoma espinocelular de felinos. **Brazilian Journal Veterinary Research. Animal. Science**, v. 43, p. 33-42, 2006.

LARKIN, J. O.; COLLINS, C. G.; AARONS, S.; TANGNEY, M.; WHELAN, M.; BREATHNACH, O.; SODEN, D.M.; O’SULLIVAN, G.C. Electrochemotherapy – Aspects of preclinical development and early clinical experience. **Annals of Surgery**, v. 245, p. 469-479, 2007.

LASCELLES, B. D.; PARRY, A. T.; STIDWORTHY, M. F.; DOBSON, J. M.; WHITE, R. A. Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs. **Veterinary Record**, v. 147, p. 473–476, 2000.

LINNERT, M.; IVERSEN, H.K.; GEHL, J. Multiple brain metastases – current management and perspectives for treatment with electrochemotherapy. **Radiology Oncology**, v.46, n.4, p. 271-278, 2012.

LIPTAK, J.M.; FORREST, L.J. Soft Tissue Sarcomas. In: Withrow; MacEwens. **Small Animal Clinical Oncology**. 5th edition, Elsevier, 2013, p. 356-358.

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

MALI, B.; JARM, T.; SNOJ, M.; SERSA, G.; MIKLAVCIC, D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. **European Journal Surgery Oncology**, v. 39, p. 4-16, 2013.

MARTY, M.; SERSA, G.; GARBAY, J.; GEHL, J.; COLLINS, C.G.; SNOJ, M.; BILLARD, V.; GEERTSEN, P.F.; LARKIN, J.O.; MIKLAVCIC, D.; PAVLOVIC, I.; PAULIN-KOSIR, S.M.; CEMAZAR, M.; MORSLI, N.; SODEN, D.M.; RUDOLF, Z.; ROBERT, C.; O'SULLIVAN, G.C.; MIR, L.M. 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 Cancer**, v.4, p. 3-13, 2006.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K. Squamous cell carcinoma. In: **Small animal dermatology**. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 395-398.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K.L. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 7.ed. St. Louis: Elsevier, 2013. p.774-843

MIR, L. M.; GLASS, L. F.; SERSA, G.; TEISSIAO, J.; DOMENGE, C.; MIKLAVCIC, D.; JAROSZESKI, M.J.; ORLOWSKI, S.; REINTGEN, D.S.; RUDOLF, Z.; BELEHRADEK, M.; GILBERT, R.; ROLS, M.P.; BELEHRADEK JR, J.; BACHAUD, J. M.; DECONTI, R.; STABUC, B.; CEMAZAR, M.; CONINX, P.; HELLER, R. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 77, p. 2336-2342, 1998.

MIR, L.M.; ORLOWSKI, S.; BELEHRADEK, J. Jr.; PAOLETTI, C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer**, v. 27, p. 68-72, 1991.

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

MOSCHETTA, M.G.; MASCHIO, L.B.; JARDIM-PERASSI, B.V.; GELALETI, G.B.; LOPES, J.R.; LEONEL, C.; GONÇALVES, N.N.; FERREIRA, L.C.; MARTINS, G.R.; BORIN, T.F.; ZUCCARI, D.A.P.C. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in canine malignant mammary tumors. **Oncology Reports**, v.33, p. 2345-2353, 2015.

MULLER, W.H.M.; KIRK, R. Neoplastic and Non-neoplastic tumors. In: _____ . **Small Animal Dermatology**, Editora Elsevier, 7th edition, 2013, p. 774-780.

MUFTULER, L. T.; HAMAMURA, M. J.; BIRGUL, O.; NALCIOGLU, O. In vivo MRI electrical impedance tomography (MREIT) of tumors. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 5, p. 381- 387, 2006.

NEVES, G. G.; BERKENBROCK, J. A.; RANGEL, M. M. M.; SUZUKI, D.O. H. Estudo numérico da eletroquimioterapia em tumor cutâneo com eletrodos de placas e agulhas. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014, **Anais**, Uberlândia. Disponível em <http://cbeb.org.br/CBEB2014/index.php/pt/anais-e-certificados>.

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

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.; SOBIN, L. **Métodos Histotecnológicos**. In: _____. Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). 1995, p. 280.

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 Veterinary Medicine**, v. 2, p. 41- 47, 2012.

QUEIROZ, G.F; MATERA, J.M. Princípios gerais de criocirurgia no tratamento de tumores em pequenos animais: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária**, CRMV-SP, v. 6, n. 1/3, p. 53-62, 2003.

RICE, C.; HUANG, L.E. From antiangiogenesis to hypoxia: current research and future directions. **Cancer Man Research**, v. 3, p. 9–16, 2011.

RUSLANDER, D.; KASER-HOTZ, B.; SARDINAS, J. C Cutaneous squamous cell carcinoma in cats. **Compendium Continuing Education**, v. 19, p. 1119–1129, 1997.

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

SAJISEVI, M.; RIGUAL, N.R.; BELLNIER, D.A.; SESHADRI, M. Image-guided Interstitial Photodynamic Therapy for Squamous Cell Carcinomas: Preclinical investigation. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery Medicine Pathology**, v. 27, n.2, p. 159-165, 2015.

SANTOS, M.; MERCANTE, A.M.; LOURO, I.D.; GONÇALVES, A.J.; DE CARVALHO, M.B.; DA SILVA, E.H.T.; DA SILVA, A.M.A. HIF1-alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45228, 2012.

SCHMIDT, K.; BERTANI, C.; MARTANO, M.; MORELLO, E.; BURACCO, P. Reconstruction of the lower eyelid by third eyelid lateral advancement and local transposition cutaneous flap after "en bloc" resection of squamous cell carcinoma in 5 cats. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2005.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum (II) in mice. **Cancer Research**, v. 55, p. 3450-3455, 1995.

SERSA, G.; STABUC, B.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; RUDOLF, Z. Electrochemotherapy with Cisplatin: Clinical Experience in Malignant Melanoma Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 963-867, 2000.

SERSA, G.; JARM, T.; KOTNIK, T.; COER, A.; PODKRAJSEK, M.; SENTJURC, M.; MIKLAVCIC, D.; KADIVEC, M.; KRANJC, S.; SECEROV, A.; CEMAZAR, M. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. **British Journal Cancer**, v. 98, p. 388-398, 2008.

SILVEIRA, L. M. G.; BRUNNER, C. H. M.; CUNHA, F. M.; FUTEMA, F.; CALDERARO, F.F.; KOZLOWSKI, D. Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de cães. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 55-66, 2010.

SILVEIRA, L. M. G.; CUNHA, F. M.; BRUNNER, C. H. M.; XAVIER, J. G. Utilização de eletroquimioterapia para carcinoma de células escamosas tegumentar em felino **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 297-302, 2016.

SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G.; KITCHELL, B.E.; BERGMAN, P.J.; HO, H.Y.; BERGIN, I.L.; KIUPEL, M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, n.1, p. 54-72, 2011.

SNOJ, M.; CEMAZAR, M.; KOLAR, B. S.; SERSA, G. Effective treatment of multiple unresectable skin melanoma metastases by electrochemotherapy. **Croatian Medical Journal**, v. 48, n. 3, p. 391-395, 2007.

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.; BALDI, A. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: From rescue to first line therapy. In: Shulin LI et al. **Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine, methods in molecular biology**. 2nd edition, Springer Science+Business media New York, 2014, v.1121, cap. 22, p.247-256.

SPUGNINI, E. P.; BALDI, F.; MELLONE, P.; FEROCCE, F.; D'AVINO, A.; BONETTO, F.; VINCENZI, B.; CITRO, G.; BALDI, A. Patterns of tumor response in canine and feline cancer patients treated with electrochemotherapy: preclinical data for the standardization of this treatment in pets and humans. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 48, 2007.

SPUGNINI, E.P.; MENICAGLI, F.; PETTORALI, M.; BALDI, A. Ultrasound guided electrochemotherapy for the treatment of a clear cell thymoma in a cat. **Open Veterinary Journal**, v.7, n.1, p. 57-60, 2017.

SUZUKI, D.O.H.; BERKENBROCK, J.A.; OLIVEIRA, K.D.; FREYTAG, J.O.; RANGEL, M.M.M. Novel application for electrochemotherapy: immersion of nasal cavity in dog. **Artificial Organs**, 2016.

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.

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

TOZON, N.; TRATAR, U. L.; ZNIDAR, K.; SERSA, G.; TEISSIE, J.; CEMAZAR, M. Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 116, p. 54760, 2016.

VILAR-SAAVEDRA, P.; KITCHELL, B. Sunlight-induced skin cancer in companion animals. In: BALDI, A.; PASQUALI, P.; SPUGNINI, E.P. **Skin Cancer: A practical approach**. Humana Press, Springer, 2014, p. 499-514.

WANG, D.; STOCKARD, C.R.; HARKINS, L.; LOTT, P.; SALIH, C.; YUAN, K.; BUCHSBAUM, D.; HASHIM, A.; ZAYZAFOON, M.; HARDY, R.W.; HAMEED, O.; GRIZZLE, W.; SIEGAL, G.P. Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts. **Biotechnical & Histochemistry**, v. 88, n. 3, p. 179-189, 2008.

WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.A.; KANEENE, J.B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 298-308, 2007.

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

WU, J.P.; HUANG, W.B.; ZHOU, H.; XU, L.W.; ZHAO, J.H.; ZHU, J.G.; SU, J.H.; SUN, H.B. Intensity of stromal changes is associated with tumor relapse in clinically advanced prostate cancer after castration therapy. **Asian Journal Andrology**, v. 16, n. 5, p.710-714, 2014.

APÊNDICE 1

COLORAÇÃO DO TRICROMICO DE MASSON

FIXAÇÃO: Em formalina neutra a 10%, estabilizada. Fixador de Bouin. CORTES: Em parafina, 6 micrômetros

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO FIXADORA DE BOUIN (C.3)

SOLUÇÃO DIÁRIA DE HEMATOXILINA DE FERRO DE WEIGERT (C.3)

SOLUÇÃO DE FUCSINA ACIDA E ESCARLATA DE BIEBRICH

Escarlata de Biebrich, aquosa, 1%	90.0ml
Fucsina ácida, aquosa, 1%	10.0ml
Ácido acético	1ml

SOLUÇÃO DE ÁCIDO FOSFOMOLIBDICO-FOSFOTUNGSTICO

Acido fosfomolibdico.....	5ml
Ácido fosfotúngstico	5ml
Água destilada	200ml

SOLUÇÃO AZUL DE ANILINA

Azul de anilina.....	2.5g
Ácido acético.....	2.0ml
Água destilada	100ml

SOLUÇÃO VERDE CLARO

Verde claro	5.0g
Água destilada	250.0ml
Ácido acético	2.0ml

PROCEDIMENTO

1. Desparafinizar e hidratar até chegar na água destilada
2. Se os cortes foram fixados em formalina, tratar com a solução de Bouin por uma hora em estufa a 56°C, ou durante a noite em temperatura ambiente. Omitir este passo, se os cortes foram fixados inicialmente em solução de Bouin. Deixar esfriar durante 10 minutos.
3. Lavar com água corrente até que os cortes se clareiem. Enxaguar com água destilada até a lavagem dos cortes. Enxaguar com água destilada.
4. Corar com solução de hematoxilina de ferro de Weigert durante 10 minutos
5. Lavar com água corrente durante 10 minutos. Enxaguar com água destilada.
6. Corar com solução de fucsina ácida-escarlata de Biebrich, durante 15 minutos. Enxaguar com água destilada.
7. Diferenciar com a solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos. Observar e ver que o colágeno não se torne vermelho.
8. Contra-coloração com solução de azul de anilina durante 5 a 10 minutos, com a solução verde claro durante 1 minuto. Enxaguar com água destilada.
- 9 a. Se a solução de azul de anilina for usada, diferenciar com ácido acético a 1%, de 3 a 5 minutos.
- 9b. Se a solução verde claro for usada, diferenciar com a solução de ácido fosfotúngstico a 5%, durante 15 minutos.
10. Desidratar e lavar através de álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto e xilol, 2 trocas cada um de 2 minutos cada.
11. Montagem da lâmina.

RESULTADOS

Núcleospreto
 Músculo, citoplasma, queratinavermelho
 Colágeno.....azul ou verde