RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 28/08/2028

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EVALUATION OF CLINICOPATHOLOGICAL, PROGNOSTIC, AND MOLECULAR FACTORS IN CATS WITH CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA TREATED WITH ELECTROCHEMOTHERAPY

Laís Calazans Menescal Linhares

Médica Veterinária

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EVALUATION OF CLINICOPATHOLOGICAL, PROGNOSTIC, AND MOLECULAR FACTORS IN CATS WITH CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA TREATED WITH ELECTROCHEMOTHERAPY

Laís Calazans Menescal Linhares

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi

Coorientadora: Prof. Dra. Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

2026

L755e

Linhares, Laís Calazans Menescal

Evaluation of clinicopathological, prognostic, and molecular factors in cats with cutaneous squamous cell carcinoma treated with electrochemotherapy / Laís Calazans Menescal Linhares. -- Jaboticabal, 2026

175 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andrigo Barboza de Nardi

Coorientadora: Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga

1. Oncologia veterinaria. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Gatos. 4. Eletroquimioterapia. 5. Câncer Prognóstico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EVALUATION OF CLINICOPATHOLOGICAL, PROGNOSTIC, AND MOLECULAR FACTORS IN CATS WITH CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA TREATED WITH ELECTHROCHEMOTHERAPY

AUTORA: LAÍS CALAZANS MENESCAL LINHARES
ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
COORIENTADORA: FELISBINA LUÍSA PEREIRA GUEDES QUEIROGA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Data: 04/10/2026 18:09:55-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participaçao Presencial)
Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinária / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Documento assinado digitalmente
gov.br RODRIGO DOS SANTOS HORTA
Data: 27/09/2026 20:14:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. RODRIGO DOS SANTOS HORTA (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte/MG

Documento assinado digitalmente
gov.br THIAGO DEMARCHI MUNHOZ
Data: 05/10/2026 09:08:21-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ (Participaçao Presencial)
Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinária / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Documento assinado digitalmente
gov.br MARILIA GABRIELE PRADO AL BUQUERQUE FERI
Data: 25/09/2026 08:02:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. MARÍLIA GABRIELE PRADO ALBUQUERQUE FERREIRA (Participaçao Virtual)
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) / Petrolina/PE

Documento assinado digitalmente
gov.br IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO
Data: 24/09/2026 15:31:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Ass. Dr. IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / UNESP / Câmpus de Araçatuba - FMVA

Jaboticabal, 28 de agosto de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laís Calazans Menescal Linhares nasceu em Fortaleza, Ceará, Brasil, em 20 de maio de 1994. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará (UECE) em 2018. Durante a graduação, foi contemplada com bolsa do programa Ciência sem Fronteiras, realizando intercâmbio acadêmico na University of Guelph, Canadá (2015–2016), onde desenvolveu estágios nas áreas de Oncologia Clínica, no Animal Cancer Centre, e Oncologia Experimental, no Institute of Comparative Cancer Investigation (ICCI). Após a graduação, atuou como médica veterinária no Hospital Veterinário Vetclinic 24h, em Fortaleza/CE, nas áreas de Clínica Médica e Terapia Intensiva (2019–2020). Em 2022, concluiu o Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração Clínica Médica, com ênfase em Oncologia Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Durante esse período, realizou aperfeiçoamento em Eletroquimioterapia pelo Vet Cancer – Oncologia e Patologia Animal, em São Paulo/SP. Atualmente é doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, com ênfase em Oncologia Veterinária. Entre outubro de 2025 e fevereiro de 2026, foi bolsista do Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES), desenvolvendo parte de seu projeto de pesquisa na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), em Vila Real, Portugal. Também atua como vice-coordenadora e docente do Curso de Eletroquimioterapia do Vet Cancer, em São Paulo/SP. Ao longo do mestrado e doutorado, participou da autoria e co-autoria de artigos científicos publicados em periódicos nacionais e internacionais, além de capítulos de livros, incluindo o Manual de Electroquimioterapia en Oncología Veterinaria (2022) e a obra Oncologia em Cães e Gatos (em elaboração). Suas atividades de pesquisa concentram-se na oncologia comparada, com ênfase no carcinoma de células escamosas cutâneo felino, biomarcadores prognósticos e terapias antineoplásicas, especialmente a eletroquimioterapia.

“Compreendi que sem o amor, todas as obras são nada, até mesmo as mais brilhantes”
(Santa Teresinha do Menino Jesus)

Dedico este trabalho a minha familia e a todos os pacientes que passaram pela minha trajetória. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu imenso Amor, que na sua infinita bondade, providenciou tudo que eu precisei para chegar até aqui, que me sustentou nos momentos mais difíceis e me guiou pelo Seu caminho perfeito.

À minha mãe, Patrícia, tradução mais genuína do que é o amor e doação, por estar do meu lado em todos os momentos apesar da distância e me entender sem que eu precise falar uma palavra. Tudo o que eu sou hoje, devo a você.

Ao meu pai, Francisco, exemplo de força, resiliência e incentivo. Por ter me ensinado a transformar qualquer situação adversa em uma oportunidade de crescimento. Obrigada por nunca ter medido esforços para ver minha felicidade e por sempre me estimular profissionalmente a ir adiante e sonhar grande.

Ao meu irmão, Davi, companheiro de longas datas. Obrigada pelo carinho, amizade, risadas e suporte constante durante minha trajetória pessoal e profissional. Você me inspira e sempre me inspirou a ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Prof. Andrigo, por ter me acolhido de forma tão generosa como orientada e me proporcionado tantos aprendizados e oportunidades, desde o estágio curricular em 2018, até hoje. O senhor é um exemplo para mim como pessoa e uma inspiração profissional dentro da Oncologia Veterinária.

À minha coorientadora, Prof. Felisbina, por toda a parceria, orientação e apoio, essenciais para a condução deste trabalho. Obrigada pela paciência em me ensinar, e por ter confiado e acreditado no meu trabalho, mesmo quando eu mesma não conseguia. E para além da parte profisional, me faltam palavras para agradecer todo o acolhimento e hospitalidade oferecidas a mim durante toda a minha estadia em Portugal. Eu nunca irei esquecer.

Ao Dr. Marcelo, por toda a atenção, disponibilidade e conhecimento oferecidos. Obrigada por todo o incentivo e confiança em mim desde o primeiro contato. Por ter me recebido de braços abertos no Vet Câncer e ter me apresentado a área fascinante que é a Eletroquimioterapia.

À Dra. Krishna, por toda a parceria, firmada desde o mestrado. Obrigada por toda ajuda na condução deste trabalho, por sua paciência e disponibilidade.

À toda a família SOV, em especial ao Adilson, Felipe, Michelle, Natáilia,

Rafael, Luciana, Catherine, Beatriz, Gabriel, Elaine, por toda a parceria e conhecimento compartilhados.

À minha amiga, Michelle, o grande presente que Jaboticabal me deu. Obrigada por toda a amizade, cumplicidade, risadas compartilhadas e apoio. Por ter estado presente não só nos momentos felizes, mas também naqueles dias mais difíceis.

Ao Guilherme, meu amor e melhor amigo, por todo companheirismo, apoio, paciência e conselhos durante toda essa trajetória. Obrigada por não medir esforços para estar ao meu lado e cuidar de mim. Com certeza o caminho até aqui teria sido mais árduo sem a sua leveza e companhia.

Às minhas primas, Thais e Roberta, por serem as irmãs que eu nunca tive. Vocês são muito importantes na minha vida. Obrigada pelo apoio e amizade incondicional.

Aos quatro anjos que tenho no céu: minha avó Vilma (“in memoriam”), meu avô Roberto (“in memoriam”), minha avó Bibi (“in memoriam”) e meu avô Aguiar (“in memoriam”). Vovó Vilma, eu não consegui me despedir pessoalmente da senhora, mas sei que eu estava em seu coração, assim como você estava no meu. Obrigada pelo amor incondicional e por sempre torcer por minha felicidade, assim como vovó Roberto e Aguir e vovó Bibi. Saudades eternas.

À minha cachorrinha Belinha (“in memoriam”) por ter sido a melhor companheira de quatro patas que pude ter e por ter nos dado tanto amor nesses 17 anos que passou conosco.

À toda a equipe do Hospital Veterinário da UNESP/FCAV. Todos os funcionários, residentes e pós-graduandos. Eu tenho um imenso orgulho de ter tido a oportunidade de conviver com todos.

Agradeço da forma mais genuína e especial possível a todos meus pacientes de quatro patas, em especial a todos os 37 gatinhos que contribuiram para este estudo. São eles que me inspiram a buscar sempre o melhor dentro da minha profissão todos os dias. É por eles e para eles, sempre.

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

SUMMARY

Page

ETHICAL CERTIFICATION.....v

RESUMO.....vi

ABSTRACT.....vii

CHAPTER 1 - General considerations.....1

1. Introduction.....1

2. Literature review.....2

2.1. Etiopathogenesis and Risk Factors.....2

2.2. Epidemiology and clinical aspects.....15

2.3. Histopathologic Features and Grading Systems.....19

2.4. Staging.....21

2.5. Pathogenesis and Molecular Mechanisms.....23

2.6. Therapeutic approaches.....38

2.7. Systemic therapies.....42

2.8. Prognostic markers and clinical correlations.....45

2.9. Future Perspectives and Research Priorities.....47

3. References.....48

CHAPTER 2 - Prognostic value of clinicopathological features in feline cutaneous squamous cell carcinoma treated with electrochemotherapy: identification of high-risk criteria......65

Abstract.....65

Introduction.....65

Matherial and Methods.....66

Case selection.....66

Clinical evaluation and staging.....67

Treatment protocol.....68

Tumor response and local toxicity evaluation.....68

Histopathological evaluation 69
Statistical analysis 69
Results 70
Study population 70
Diagnosis, staging and treatment 71
Histopathological evaluation 71
Response to treatment 71
Toxicity evaluation 72
Survival analysis 73
Discussion 74
References 78
Tables and Figures 83
CHAPTER 3 - Prognostic significance of EGFR-1 and VEGF-A expression in feline cutaneous squamous cell carcinoma 92
1 Introduction 93
2 Material and methods 95
3 Results 99
4 Discussion 101
5 Conflict of Interest 106
6 Author Contributions 106
7 Funding 106
8 Acknowledgments 107
9 Data Availability Statement 107
10 References 107
Tables and Figures 111
CHAPTER 4 - High p53 immunoexpression is associated with shorter overall survival in feline cutaneous squamous cell carcinoma 118
Abstract 119
Introduction 119
Patients and Methods 120
Case selection. 120
Clinical procedures and data collection. 121
Histopathological evaluation. 121

Immunohistochemistry. 122
Quantification of immunohistochemical staining. 122
Statistical analysis. 123
Results 123
Patient and treatment data. 123
Histopathological evaluation. 123
p53 immunohistochemical expression. 124
Survival analysis. 124
Conclusion 127
Conflict of interest 127
Authors' Contributions 127
Acknowledgments 127
Funding 127
References 128
Tables and figures 131
CHAPTER 5 - Neural invasion–related pathways in feline cutaneous squamous cell carcinoma: clinicopathological and prognostic significance of NGF, TrkA and ROBO-1 expression in cats treated with electrochemotherapy 135
Abstract 135
Introduction 136
Material and Methods 138
Study design and case selection 138
Data collection and procedures 138
Histopathological evaluation 139
Immunohistochemistry 139
Immunohischemistry evaluation 140
Statistical analysis 140
Results 141
Demographics and treatment data 141
Hispathological evaluation 141
NGF, TrkA and ROBO-1 immunoexpression 141
Associations of NGF, TrkA, and ROBO-1 Immunoexpression with Perineural Invasion and other Clinicopathological Variables 142

Survival analysis 143
Discussion 143
References 147
Tables and Figures 152

z`

v

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Correlação da expressão do fator de crescimento nervoso e do receptor tirosinaquinase-A com a invasão em bainha perineural em felinos com carcinoma de células escamosas tratados com eletroquimioterapia"**, protocolo nº 7726/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, 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 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de novembro de 2022.

Vigência do Projeto	17/11/2022 a 01/08/2026
Espécie / Linhagem	Felina
Nº de animais	Não especificado
Peso / Idade	Não especificado
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Rotina do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" – UNESP / Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de novembro de 2022.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

AVALIAÇÃO DE FATORES CLINICOPATOLÓGICOS, PROGNÓSTICOS, E MOLECULARES EM FELINOS COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO TRATADOS COM ELETROQUIMIOTERAPIA

RESUMO- O carcinoma de células escamosas cutâneo (CCEc) é uma das neoplasias cutâneas malignas mais frequentes em felinos e apresenta notáveis semelhanças clínicas, histopatológicas e moleculares com a doença humana, consolidando o gato como um importante modelo espontâneo para estudos em oncologia comparada. Apesar da elevada eficácia da eletroquimioterapia (EQT) como modalidade terapêutica local, a estratificação prognóstica dos felinos acometidos ainda é limitada pela escassez de biomarcadores clinicopatológicos e moleculares validados. Assim, esta tese teve como objetivo avaliar fatores clinicopatológicos, prognósticos e moleculares associados ao comportamento biológico do CCEc felino tratado com EQT, com ênfase especial em sua correlação com a invasão perineural (IPN). Inicialmente, foi realizada uma revisão comparativa entre o CCEc humano e felino, abordando aspectos relacionados à etiopatogenia, mecanismos moleculares, biomarcadores prognósticos e estratégias terapêuticas, fornecendo a base científica para os estudos subsequentes. Em seguida, por meio de uma série de estudos clínicos e translacionais, foram avaliados felinos com diagnóstico histopatológico de CCEc de cabeça tratados exclusivamente com EQT. A análise das variáveis clinicopatológicas demonstrou que tumores em estágios clínicos avançados, lesões erosivas, variante histológica acantolítica, recorrência local, ausência de resposta completa ao tratamento e invasão perineural estiveram associadas a pior prognóstico. Posteriormente, foi investigado o significado prognóstico da imunoexpressão dos biomarcadores EGFR-1, VEGF-A, p53, NGF, TrkA e ROBO1. A expressão de EGFR-1 e VEGF-A associou-se a características clinicopatológicas relacionadas a comportamento tumoral mais agressivo, reforçando seu potencial como biomarcadores prognósticos. A alta imunoexpressão de p53 esteve significativamente associada à redução da sobrevida, evidenciando a importância da desregulação do ciclo celular na progressão tumoral. Por fim, a avaliação das vias relacionadas ao crescimento neural e ao direcionamento axonal demonstrou que NGF, TrkA e ROBO1 apresentam diferentes associações com características clinicopatológicas, invasão perineural e desfechos clínicos, sugerindo a participação dessas vias na biologia tumoral do CCEc felino. Em conjunto, os resultados desta tese ampliam o conhecimento sobre os fatores clinicopatológicos e moleculares envolvidos no carcinoma de células escamosas cutâneo felino, identificam biomarcadores com potencial valor prognóstico, reforçam a relevância da invasão perineural como marcador de agressividade tumoral e fornecem novas evidências sobre os mecanismos biológicos relacionados à progressão da doença. Além disso, fortalecem o papel do CCEc felino como modelo espontâneo para o estudo do carcinoma de células escamosas cutâneo humano, contribuindo para o avanço da oncologia comparada e translacional e para o desenvolvimento futuro de estratégias prognósticas e terapêuticas mais individualizadas.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas cutâneo, eletroquimioterapia, invasão perineural

EVALUATION OF CLINICOPATHOLOGICAL, PROGNOSTIC, AND MOLECULAR FACTORS IN CATS WITH CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA TREATED WITH ELECTROCHEMOTHERAPY

ABSTRACT- Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is one of the most common malignant skin tumors in cats and shares remarkable clinical, histopathological, and molecular similarities with human cSCC, making it a valuable spontaneous model for comparative oncology. Despite the effectiveness of electrochemotherapy (ECT) as a local treatment modality, prognostic stratification in feline cSCC remains limited because of the scarcity of validated clinicopathological and molecular biomarkers. This thesis aimed to investigate clinicopathological, prognostic, and molecular factors associated with the biological behavior of feline cSCC treated with ECT, with particular emphasis on their relationship with perineural invasion (PNI). Initially, a comparative review of human and feline cSCC was conducted to summarize current knowledge regarding etiopathogenesis, molecular mechanisms, prognostic biomarkers, and therapeutic approaches, providing the scientific basis for the subsequent investigations. A series of clinical and translational studies then evaluated cats with histologically confirmed cSCC of the head treated exclusively with ECT. Clinicopathological variables associated with treatment response and survival were identified, demonstrating that advanced tumor stage, erosive lesions, the acantholytic histological variant, local recurrence, failure to achieve complete response, and PNI were associated with poorer clinical outcomes. Subsequently, the prognostic significance of selected molecular biomarkers was investigated by immunohistochemical analysis. EGFR-1 and VEGF-A expression were associated with clinicopathological features related to aggressive tumor behavior, supporting their potential role as prognostic biomarkers. High p53 immunoexpression was significantly associated with shorter survival, reinforcing the importance of cell cycle dysregulation in disease progression. Finally, the expression of NGF, TrkA, and ROBO1 was evaluated to investigate molecular pathways involved in tumor–nerve interactions. These markers demonstrated distinct associations with clinicopathological variables, survival outcomes, and PNI, highlighting the potential involvement of neurotrophic and axon-guidance pathways in the biological behavior of feline cSCC. Collectively, these findings expand the current understanding of the clinicopathological and molecular landscape of feline cSCC, identify novel prognostic biomarkers, reinforce the prognostic relevance of perineural invasion, and provide new insights into the mechanisms underlying tumor progression. Furthermore, this thesis strengthens the role of feline cSCC as a spontaneous comparative model for human cSCC and contributes to the advancement of comparative and translational oncology by supporting future biomarker-driven prognostic stratification and the development of targeted therapeutic strategies.

Keywords: cutaneous squamous cell carcinoma, electrochemotherapy, perineural invasion, prognostic biomrkers.

CHAPTER 1 - General considerations

1. Introduction

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is one of the most common malignant skin tumors in both humans and cats, representing a significant clinical challenge due to its high incidence, locally invasive behavior, and potential to cause extensive tissue destruction, particularly when arising in anatomically complex regions of the head. Although distant metastasis is relatively uncommon, delayed diagnosis and local recurrence remain important causes of morbidity in both species, frequently requiring aggressive therapeutic interventions and compromising quality of life (Murphy et al., 2013; Stratigos et al., 2023).

The remarkable biological similarities between human and feline cSCC have increasingly positioned the cat as a valuable spontaneous comparative model for studying UV-induced skin carcinogenesis. In both species, chronic ultraviolet (UV) radiation represents the principal etiological factor, leading to cumulative DNA damage, field cancerization, and the progressive development of actinic keratosis and invasive carcinoma. Furthermore, many of the molecular alterations involved in tumor initiation and progression, including dysregulation of TP53, EGFR, COX-2, angiogenic pathways, and inflammatory signaling, appear to be conserved, reinforcing the translational relevance of feline cSCC within comparative oncology (Murphy et al., 2013; Hedberg et al., 2022; Stratigos et al., 2023).

Despite these similarities, important gaps remain in the understanding of feline cSCC. Compared with human medicine, relatively few studies have investigated the molecular mechanisms underlying tumor progression, the prognostic significance of clinicopathological and molecular biomarkers, or the biological determinants of therapeutic response. These limitations hinder accurate prognostic stratification and restrict the development of individualized therapeutic strategies for affected cats. In

recent years, increasing attention has been directed toward the identification of biomarkers involved in cell cycle regulation, growth factor signaling, angiogenesis, and tumor–nerve interactions, as these pathways may provide clinically relevant prognostic information and identify novel therapeutic targets (Hedberg et al., 2022).

Among the available local treatment modalities, electrochemotherapy (ECT) has emerged as one of the most effective tissue-sparing therapies for feline cSCC, particularly for tumors affecting the nasal planum, pinnae, and periocular region (Dos Santos & Linhares et al., 2024; Foo et al., 2025). Although excellent clinical response rates have been reported, considerable variability in treatment outcome persists, emphasizing the need for reliable biomarkers capable of predicting biological behavior and therapeutic response. A better understanding of the molecular landscape of feline cSCC is therefore expected not only to improve prognostic assessment but also to support the future development of more personalized treatment approaches.

This chapter reviews the comparative biology of human and feline cutaneous squamous cell carcinoma, with particular emphasis on molecular pathways, prognostic biomarkers, and therapeutic implications relevant to electrochemotherapy. The aim is to provide the scientific framework that supports the subsequent chapters of this thesis, which investigate clinicopathological prognostic factors and the expression of selected molecular biomarkers associated with tumor progression and response to electrochemotherapy in feline cutaneous squamous cell carcinoma.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that NGF, TrkA, and ROBO-1 exhibit distinct biological roles in feline cSCC, suggesting the involvement of neural invasion–related pathways in tumor behavior. Although several findings parallel those reported in human SCC, important differences suggest that tumor–nerve interactions may not be fully conserved across species. Collectively, these findings expand the current understanding of the molecular mechanisms underlying feline cSCC and reinforce the value of comparative oncology in elucidating both conserved and species-specific pathways of tumor progression. Nevertheless, the prognostic relevance of these biomarkers should be confirmed in larger, independent studies before their clinical utility can be established.

References

1. Stratigos, A.J.; Garbe, C.; Dessinioti, C.; Lebbe, C.; van Akkooi, A.; Bataille, V.; Bastholt, L.; Dreno, B.; Dummer, R.; Fargnoli, M.C.; et al. European Consensus-Based Interdisciplinary Guideline for Invasive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Part 1: Diagnostics and Prevention–Update 2023. European Journal of Cancer2023, 193, 113251, doi:10.1016/j.ejca.2023.113251.
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines ®) Squamous Cell Skin Cancer NCCN.Org NCCN Guidelines for Patients; 2026;.
3. dos Santos, F.F.Q.; Linhares, L.C.M.; Rocha, M.C.P.; de Oliveira, K.D.; Rangel, M.M.M.; de

Nardi, A.B. Perineural Invasion as a Predictor of Local Recurrence in Cats with Squamous Cell Carcinoma Treated with Electrochemotherapy. Frontiers in Veterinary Science2024, 11, doi:10.3389/fvets.2024.1408260.

4. Carter, J.; Johnson, M.; Chua, T.; Ma, P.; Karia, C.; Schmults Outcomes of Primary Cutaneous Squamous Cell Carcinoma With Perineural Invasion An 11-Year Cohort Study; 2013;.
5. Haug, K.; Breuninger, H.; Metzler, G.; Eigentler, T.; Eichner, M.; Häfner, H.-M.; Schnabl, S.M. Prognostic Impact of Perineural Invasion in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Study of 1,399 Tumors. Journal of Investigative Dermatology2020, 140, 1968–1975, doi:10.1016/j.jid.2020.01.035.
6. Pei, M.; Wiefels, M.; Harris, D.; Velez Torres, J.; Gomez-Fernandez, C.; Tang, J.; Hernandez Aya, L.; Samuels, S.; Sargi, Z.; Weed, D.; et al. Perineural Invasion in Head and Neck Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Cancers2024, 16, doi:10.3390/cancers16213695.
7. Bakst, R.L.; Glastonbury, C.M.; Parvathaneni, U.; Katabi, N.; Hu, K.S.; Yom, S.S. Perineural Invasion and Perineural Tumor Spread in Head and Neck Cancer. International Journal of Radiation Oncology 2019, 103, 1109–1124, doi:10.1016/j.ijrobp.2018.12.009.
8. Misztal, C.I.; Green, C.; Mei, C.; Bhatia, R.; Velez Torres, J.M.; Kamrava, B.; Moon, S.; Nicolli, E.; Weed, D.; Sargi, Z.; et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Perineural Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma: Potential Targets for Therapeutic Intervention. Cancers2021, 13, 6011, doi:10.3390/cancers13236011.
9. Kolokythas, A.; Cox, D.; Dekker, N.; Schmidt, B. Nerve Growth Factor and Tyrosine Kinase A Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma: Is There an Association With Perineural Invasion? J Oral Maxillofac Surg2010, 68, 1290–1295, doi:10.1016/j.joms.2010.01.006.
10. Alkhadar, H.; Macluskey, M.; White, S.; Ellis, I. Nerve Growth Factor-Induced Migration in Oral and Salivary Gland Tumour Cells Utilises the PI3K/Akt Signalling Pathway: Is There a Link to Perineural Invasion? J Oral Pathol Med2020, 49, 227–234, doi:10.1111/jop.12979.
11. Yu, E.H.; Lui, M.T.; Tu, H.F.; Wu, C.H.; Lo, W.L.; Yang, C.C.; Chang, K.W.; Kao, S.Y. Oral Carcinoma with Perineural Invasion Has Higher Nerve Growth Factor Expression and Worse Prognosis. Oral Diseases2013, 20, 268–274, doi:10.1111/odi.12101.
12. Chen-Tsai, C.P.; Colome-Grimmer, M.; Wagner, R.F. Correlations among Neural Cell Adhesion Molecule, Nerve Growth Factor, and Its Receptors, TrkA, TrkB, TrkC, and P75, in Perineural Invasion by Basal Cell and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. Derm Surg2004, 30, 1009–1016, doi:10.1111/j.1524-4725.2004.30306.x.
13. Brugière, C.; El Bouchtaoui, M.; Leboeuf, C.; Gapihan, G.; Ait El Far, R.; Sy, M.; Lepage, A.L.; Ratajczak, P.; Janin, A.; Verneuil, L. Perineural Invasion in Human Cutaneous

Squamous Cell Carcinoma Is Linked to Neurotrophins, Epithelial-Mesenchymal Transition, and NCAM1. Journal of Investigative Dermatology2018, 138, 2063–2066, doi:10.1016/j.jid.2018.02.044.

14. Jiang, Z.; Liang, G.; Xiao, Y.; Qin, T.; Chen, X.; Wu, E.; Ma, Q.; Wang, Z. Targeting the SLIT/ROBO Pathway in Tumor Progression: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. Therapeutic Advances in Medical Oncology2019, 11, 175883591985523, doi:10.1177/1758835919855238.
15. Jiang, S.; Hamakubo, T.; Mitsui, K.; Yagami, R.; Fujiyoshi, Y.; Ajioka, Y.; Naito, M. Roundabout1 Distribution in Neoplastic and Non-Neoplastic Diseases with a Focus on Neoangiogenesis. International journal of clinical and experimental pathology2018, 11, 5755–5764.
16. Wang, H.; Huo, R.; He, K.; Cheng, L.; Zhang, S.; Yu, M.; Zhao, W.; Li, H.; Xue, J. Perineural Invasion in Colorectal Cancer: Mechanisms of Action and Clinical Relevance. Cellular Oncology (Dordrecht)2023, 47, doi:10.1007/s13402-023-00857-y.
17. Tannehill-Gregg, S.H.; Levine, A.L.; Rosol, T.J. Feline Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Natural Model for the Human Disease and Development of a Mouse Model. Veterinary and comparative oncology2006, 4, 84–97, doi:10.1111/j.1476-5810.2006.00096.x.
18. Wypij, J.M. A Naturally Occurring Feline Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Pathology Research International2013, 2013, 1–7, doi:10.1155/2013/502197.
19. Tellado, M.; Mir, L.M.; Maglietti, F. Veterinary Guidelines for Electrochemotherapy of Superficial Tumors. Frontiers in Veterinary Science2022, 9, doi:10.3389/fvets.2022.868989.
20. Nguyen, S.M.; Thamm, D.H.; Vail, D.M.; London, C.A. Response Evaluation Criteria for Solid Tumours in Dogs (V1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group Consensus Document. Veterinary and Comparative Oncology2013, 13, 176–183, doi:10.1111/vco.12032.
21. Goldschimidt, M.; Goldschimidt, K. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In Tumors in Domestic Animals; Meuten, D., Ed.; John Wiley & Sons: Ames, IA, USA, 2017; pp. 88–141.
22. Cañueto, J.; Román-Curto, C. Novel Additions to the AJCC's New Staging Systems for Skin Cancer. Actas Dermosifiliogr2017, 108, 818–826.
23. Brantsch, K. D; Meisner, C.; Schönfisch, B.; Trilling, B.; Wehner-Caroli, J.; Röcken, M.; Breuninger, H. Analysis of Risk Factors Determining Prognosis of Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma: A Prospective Study. The Lancet Oncology2008, 9, 713–720, doi:10.1016/s1470-2045(08)70178-5.
24. Available online: https://www.proteinatlas.org (accessed on 30 July 2025).
25. Rogez, B.; Pascal, Q.; Bobillier, A.; Machuron, F.; Toillon, R.-A.; Tierny, D.; Chopin, V.; Le

Bourhis, X. Expression and Prognostic Significance of Neurotrophins and Their Receptors in Canine Mammary Tumors. Veterinary Pathology2020, 57, 507–519, doi:10.1177/0300985820921813.

26. Li, P.; Zhu, W.; Ma, Z.; Wang, G.; Peng, H.; Chen, Y.; Lee, K.K.H.; Yang, X. Enhanced Beta-Catenin Expression and Inflammation Are Associated with Human Ectopic Tubal Pregnancy. Human Reproduction2013, 28, 2363–2371, doi:10.1093/humrep/det246.
27. Li, P.; Shi, Y.; Shuai, H.; Cai, Y.; Lu, W.; Wang, G.; Gao, L.; Wang, L.; Fan, X.; Yang, X. Alterted SLIT2/ROBO1 Signalling Is Linked to Impaired Placentation of Missed and Threatened Miscarriage in Early Pregnancy. Histopathology2017, 71, 543–552, doi:10.1111/his.13250.
28. Faulkner, S.; Griffin, N.; Rowe, C.W.; Jobling, P.; Lombard, J.M.; Oliveira, S.M.; Walker, M.M.; Hondermarck, H. Nerve Growth Factor and Its Receptor Tyrosine Kinase TrkA Are Overexpressed in Cervical Squamous Cell Carcinoma. FASEB BioAdvances2020, 2, 398–408, doi:10.1096/fba.2020-00016.
29. Ferraguti, G.; Terracina, S.; Tarani, L.; Fanfarillo, F.; Allushi, S.; Caronti, B.; Tirassa, P.; Polimeni, A.; Lucarelli, M.; Cavalcanti, L.; et al. Nerve Growth Factor and the Role of Inflammation in Tumor Development. Current Issues in Molecular Biology2024, 46, 965–989, doi:10.3390/cimb46020062.
30. Lin, C.; Ren, Z.; Yang, X.; Yang, R.; Chen, Y.; Liu, Z.; Dai, Z.; Zhang, Y.; He, Y.; Zhang, C.; et al. Nerve Growth Factor (NGF)-TrkA Axis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Triggers EMT and Confers Resistance to the EGFR Inhibitor Erlotinib. Cancer Letters2020, 472, 81–96, doi:10.1016/j.canlet.2019.12.015.
31. Shen, W.R.; Wang, Y.P.; Chang, J.Y.F.; Yu, S.Y.; Chen, H.M.; Chiang, C.P. Perineural Invasion and Expression of Nerve Growth Factor Can Predict the Progression and Prognosis of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. Journal of Oral Pathology & Medicine2013, 43, 258–264, doi:10.1111/jop.12133.
32. Sofroniew, M.V.; Howe, C.L.; Mobley, W.C. Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, and Neural Repair. Annual Review of Neuroscience2001, 24, 1217–1281, doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1217.
33. Rizzi, C.; Tiberi, A.; Giustizieri, M.; Marrone, M.C.; Gobbo, F.; Carucci, N.M.; Meli, G.; Arisi, I.; D'Onofrio, M.; Marinelli, S.; et al. NGF Steers Microglia toward a Neuroprotective Phenotype. Glia2018, 66, 1395–1416, doi:10.1002/glia.23312.
34. Frydenlund, N.; Leone, D.A.; Mitchell, B.; Abbas, O.; Dhingra, J.; Mahalingam, M. Perineural Invasion in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Role of Immunohistochemistry, Anatomical Site, and the High-Affinity Nerve Growth Factor Receptor TrkA. Human

Pathology2015, 46, 1209–1216, doi:10.1016/j.humpath.2015.05.003.

35. Ciarka, A.; Skowronek, F.; Miłosz, P.; Kunc, M.; Burdach, R.; Sakowicz-Burkiewicz, M.; Jereczek-Fossa, B.; Starzyńska, A.; Pęksa, R. TrkA Expression as a Novel Prognostic Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma. International Journal of Molecular Sciences2025, 26, 6847, doi:10.3390/ijms26146847.
36. Koohini, Z.; Koohini, Z.; Teimourian, S. Slit/Robo Signaling Pathway in Cancer; a New Stand Point for Cancer Treatment. Pathology oncology research : POR2019, 25, 1285–1293, doi:10.1007/s12253-018-00568-y.
37. Göhrig, A.; Detjen, K.M.; Hilfenhaus, G.; Körner, J.L.; Welzel, M.; Arsenic, R.; Schmuck, R.; Bahra, M.; Wu, J.Y.; Wiedenmann, B.; et al. Axon Guidance Factor SLIT2 Inhibits Neural Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer. Cancer Research2014, 74, 1529–1540, doi:10.1158/0008-5472.can-13-1012.
38. Zhou, W.-J.; Geng, Z.H.; Chi, S.; Zhang, W.; Niu, X.-F.; Lan, S.-J.; Ma, L.; Yang, X.; Wang, L.-J.; Ding, Y.-Q.; et al. Slit-Robo Signaling Induces Malignant Transformation through Hakai-Mediated E-Cadherin Degradation during Colorectal Epithelial Cell Carcinogenesis. Cell Research2011, 21, 609–626, doi:10.1038/cr.2011.17.
39. Kim, S.H.; Kim, T.-J.; Shin, D.; Hur, K.J.; Hong, S.-H.; Lee, J.Y.; Ha, U.-S. ROBO1 Protein Expression Is Independently Associated with Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients Who Underwent Radical Prostatectomy in Asian Patients. Gland Surgery2021, 10, 2956–2965, doi:10.21037/gs-21-406.