

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO*DA*SEGURANÇA*E*VIABILIDADE*DA*
ELETROQUIMIOTERAPIA*COMO*TRATAMENTO*LOCAL*
DE* NEOPLASIAS*DE*BEXIGA*EM*CÃES!**

Laís Calazans Menescal Linhares

Médica Veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E VIABILIDADE DA
ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO LOCAL DE
NEOPLASIAS DE BEXIGA EM CÃES**

Laís Calazans Menescal Linhares

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi

Coorientador: Dr. Marcelo Monte Mor Rangel

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

L755a Linhares, Laís Calazans Menescal
Avaliação da segurança e viabilidade da eletroquimioterapia como tratamento local de neoplasias de bexiga em cães / Laís Calazans Menescal Linhares. -- Jaboticabal, 2022
83 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Andriago Barboza de Nardi
Coorientador: Marcelo Monte Mór Rangel

1. Medicina comparada. 2. Câncer Tratamento. 3. Aparelho urinário Doenças. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E VIABILIDADE DA ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO LOCAL DE NEOPLASIAS DE BEXIGA EM CÃES

AUTORA: LAÍS CALAZANS MENESCAL LINHARES

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADOR: MARCELO MONTE MOR RANGEL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO MONTE MOR RANGEL (Participação Virtual)
Vet Cancer Oncologia Veterinária / Sao PauloSP



Marcelo Monte Mor Rangel
ASSINATURA ELETRÔNICA

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dr. FELIPE HORÁCIO MAGLIETTI (Participação Virtual)
Departamento de Anatomia / Instituto Universitario de Ciencias de la Salud Fundación Barceló - CONICET



Dr. Felipe Horácio Maglietti

Jaboticabal, 09 de junho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laís Calazans Menescal Linhares – Nascida em Fortaleza-CE, Brasil em 20 de maio de 1994. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará (2012-2018) e durante o curso de graduação estagiou na Universidade de Guelph, no Canadá (2015-2016), através do programa de bolsas Ciências sem Fronteiras. Realizou estágios em oncologia clínica (Animal Cancer Centre), e em oncologia experimental (Institute of Comparative Cancer Investigation - ICCI), ambos na Universidade de Guelph. Também realizou estágios ao longo do curso de graduação nas áreas de clínica médica e oncologia clínica e experimental, incluindo estágio curricular na Universidade Estadual Paulista (UNESP-Jaboticabal) na área de oncologia veterinária e nutrição clínica de pequenos animais. Após a graduação, trabalhou como médica veterinária no hospital veterinário Vetclinic 24h (Fortaleza-CE), nas áreas de clínica médica e intensivismo (2019-2020). Realizou curso de Eletroquimioterapia pelo Vet Câncer Oncologia e Patologia Animal, São Paulo (2020) e é membro da Associação Brasileira de Oncologia Veterinária (ABROVET).

Atualmente é mestranda do programa de Ciências Veterinárias em Clínica Médica, com ênfase em Oncologia Veterinária, na UNESP-Jaboticabal (2020-2022) e monitora do 3º curso de aperfeiçoamento em oncologia em cães e gatos (2022-2023).

“Compreendi que sem o amor, todas as obras são nada, até mesmo as mais brilhantes”

(Santa Teresinha do Menino Jesus)

Dedico este trabalho a meus pais e meu irmão, pelo apoio incondicional. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me conduzido até aqui e ter me dado a força e resiliência necessárias, principalmente nos momentos mais desafiadores. Obrigada por fazer-me sentir sua presença a qualquer momento e lugar, e por nunca ter deixado sentir-me desamparada.

À minha família, alicerce e porto seguro, a quem eu devo meu caráter, formação e valores, sem vocês eu não teria chegado até aqui. À minha mãe, Patrícia, tradução mais genuína do que é o amor e a 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, Professor Andriago, 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.

Ao meu co-orientador, 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. Me faltam palavras para descrever minha gratidão por todas as oportunidades proporcionadas. Agradeço também a toda equipe do Vet Câncer, em especial à Dra. Krishna, Priscila e Jennifer, por toda a parceria e colaboração na execução deste trabalho.

Ao meu companheiro de atendimento no SOV, Felipe, por toda a parceria, amizade e convívio diário. Atender junto com você foi um presente imenso que ganhei.

À toda a família SOV, em especial ao Adilson, Stella, Beatriz, Verônica, Cristhian, Gabriel, Noélia e Milena, por toda a amizade e conhecimento compartilhados.

À minha companheira de apartamento e grande amiga, Michelle, por toda a amizade, cumplicidade, risadas compartilhadas e apoio. Por estar presente não só nos momentos felizes, mas também naqueles dias mais difíceis em que a saudade de casa sufoca ou que as coisas parecem perder o sentido.

Ao Guilherme, por todo o apoio, companheirismo, conselhos e presença. Com certeza o caminho até aqui teria sido mais árduo sem a sua leveza e companhia.

Às minhas melhores amigas de infância Clarice, Artemisia e Camille, que mesmo com a distância física, se fazem presentes no meu dia a dia, me apoiando em todos os momentos.

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.

À minha avó Vilma, por ser meu exemplo de força e ternura. Os princípios passados pela senhora são guias para meu crescimento pessoal. Aos meus avôs Roberto e Aguiar (“in memoriam”) e a minha avó Yolanda, (“in memoriam”), por terem me ensinado desde pequena o verdadeiro valor da família. Vocês estarão sempre em meu coração.

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. 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.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Neoplasias de bexiga.....	2
2.2. Etiologia	4
2.3. Apresentação clínica.....	6
2.4. Estadiamento Clínico	7
2.5. Diagnóstico	10
2.6. Tratamento.....	11
2.6.1. Cirurgia	11
2.6.2. Terapia medicamentosa	12
2.6.3. Outras terapias	16
2.7. Oncologia comparada no desenvolvimento de novas terapias	17
2.8. Eletroquimioterapia	19
2.8.1. Eletropermeabilização	20
2.8.2. Parâmetros elétricos	21
2.8.3. Fármacos quimioterápicos e mecanismos de ação.....	22
2.8.4. Vias de administração	23
2.8.5. Efeitos imunológicos e vasculares.....	25
2.8.6. Aplicações da EQT na oncologia veterinária e humana.....	26
2.8.7. EQT em tumores de bexiga.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Seleção de Animais	28

3.2.	Estadiamento clínico.....	28
3.3.	Protocolo de tratamento.....	29
3.3.1.	Acesso cirúrgico e avaliação histopatológica transoperatória	29
3.3.2.	Protocolo de EQT	31
3.4.	Monitoração e Avaliação de Resposta	34
3.5.	Avaliação de Toxicidade e de Eventos Adversos	35
3.6.	Análise Estatística.....	36
4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Dados demográficos	36
4.2.	Avaliação de segurança.....	37
4.3.	Causas de óbito	38
4.4.	Número e intervalo entre sessões	38
4.5.	Avaliação de resposta.....	39
4.6.	Avaliação preliminar da eficácia	42
5.	DISCUSSÃO	45
6.	CONCLUSÕES	55
7.	REFERÊNCIAS.....	56



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 "**Avaliação da eletroquimioterapia como tratamento local de neoplasias de bexiga em cães**", protocolo nº 3848/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago 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 25 de agosto de 2020.

Vigência do Projeto	01/09/2020 a 01/08/2022
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	Não especificado
Peso / Idade	Não especificado
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Rotina de atendimento clínico

Jaboticabal, 25 de agosto de 2020.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E VIABILIDADE DA ELETROQUIMIOTERAPIA COMO TRATAMENTO LOCAL DE NEOPLASIAS DE BEXIGA EM CÃES.

RESUMO - O tratamento local do carcinoma urotelial (CUT) canino representa um desafio na medicina veterinária, uma vez que mais de 90% desses tumores são classificados em sua forma invasiva e surgem em regiões de difícil abordagem cirúrgica. Assim, novas terapias são necessárias para um controle local efetivo dessas neoplasias. Neste estudo retrospectivo objetivou-se avaliar a segurança e viabilidade da eletroquimioterapia (EQT) como tratamento único no controle local do CUT vesical canino, e de forma secundária, determinar a eficiência da técnica sobre esses tumores. Para tanto, foram selecionados de forma retrospectiva 21 cães com o diagnóstico histopatológico de CUT tratados com EQT associada a bleomicina intravenosa, a partir dos registros clínicos do centro oncológico Vet Câncer (São Paulo, SP, Brasil). A resposta local ao tratamento foi classificada em resposta completa (RC), resposta parcial (RP), doença estável (DE) ou doença progressiva (DP). A toxicidade local e eventos adversos foram avaliados a cada retorno e graduados de acordo com a escala de toxicidade do “Veterinary Cooperative Oncology Group” (VCOG). Os dados obtidos foram analisados através do pacote estatístico SPSS Statistics 25, com intervalo de confiança de 95% ($P \leq 0.05$). Dados demográficos, estágio T, escore VCOG, causa do óbito e recidiva foram apresentados de forma descritiva e, quando aplicável, com média e desvio padrão. As variáveis de tempo de sobrevida e duração de resposta ao tratamento foram comparadas por testes específicos para verificar se o número de sessões, o tipo de resposta ou a ocorrência de recidiva exerceram influência nessas variáveis. 90,4% dos cães deste estudo foram classificados em estágio T2 e, na avaliação histopatológica trans-operatória, nenhum animal apresentou infiltração tumoral em camada serosa. Nenhum animal veio óbito durante a EQT ou no pós-operatório imediato. A maioria dos cães desenvolveram efeitos adversos leves (19/21), sendo classificados com escore VCOG = 1. Dois pacientes foram classificados com VCOG = 3, devido ao desenvolvimento de estenose ureteral. O número de sessões de EQT realizadas variou entre uma a três sessões, sendo a média do intervalo entre a primeira e segunda sessão de 52 dias e entre a segunda e terceira sessão de 45 dias. A resposta objetiva alcançada foi de 100% (RC - 13 cães; RP - 5 cães). A RC foi obtida na primeira sessão para a maioria dos pacientes que a alcançaram (10/13), com apenas um paciente necessitando de três sessões para a RC. O tempo médio de sobrevida (TMS) e a duração média de resposta (DMR) obtidos nesse estudo foram de 419 e 370 dias, respectivamente. A taxa de recidiva foi de 38,4% (5/13), e a ocorrência da mesma não influenciou a DMR dos pacientes ($P=0,983$). O TMS e a DMR não diferiram estatisticamente ($P=0,208$ e $P=0,924$, respectivamente) entre os cães de acordo com o tipo de resposta (RP ou RC). Por fim, o número de sessões também não pareceu influenciar o TMS e a DMR dos pacientes, com $P < 0,05$ para os grupos 1S, 2S e 3S. Nesse estudo, a EQT foi bem tolerada nos cães com CUT, demonstrando ser uma técnica segura e viável, sendo os principais critérios de segurança a ausência de infiltração tumoral em serosa, avaliada através da análise histopatológica, e a monitoração constante do paciente no pós-operatório.

Palavras-chave: carcinoma urotelial; cão; eletroporação; oncologia comparada.

EVALUATION OF THE SAFETY AND FEASIBILITY OF ELECTROCHEMOTHERAPY AS LOCAL TREATMENT OF BLADDER NEOPLASMS IN DOGS.

ABSTRACT - The local treatment of the canine urothelial carcinoma (UTC) is a challenge in the veterinary oncology field, as more than 90% of these tumors are classified in their invasive presentation and develop in locations within the bladder that are difficult to surgically approach. Thus, new therapies are necessary for an effective local control of these neoplasms. This retrospective study aimed to evaluate the safety and feasibility of electrochemotherapy (ECT) as a single treatment in the local control of vesical UTC, and secondarily, determine the efficacy of this therapy on these tumors. Therefore, 21 dogs with the histopathological diagnosis of CUT, treated with EQT with intravenous bleomycin, were retrospectively selected from the clinical records of the Vet Cancer oncology center (São Paulo, SP, Brazil). Local response to treatment was classified as complete response (CR), partial response (PR), stable (SD) or progressive disease (PD). Local toxicity and adverse events were evaluated at each follow-up and graded accordingly the Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) toxicity scale. The data obtained were analyzed using the SPS Statistics 25 statistical package, with a confidence interval of 95% ($P \leq 0.05$). Demographic data, T stage, VCOG score, cause of death and recurrence were presented descriptively and, when applicable, with mean and standard deviation. Variables analyzed with relation to survival time and duration of response included number of ECT sessions, type of response and development of recurrence. 90.4% of the dogs in this study were classified in stage T2 and, in the intraoperative histopathological evaluation, none of the animals presented tumor infiltration in the serous layer. No patient died during EQT or postoperatively. Most dogs developed mild adverse effects (19/21) and were classified with a VCOG score = 1. Two patients were classified with a VCOG = 3, due to the development of ureteral stricture. The number of EQT sessions performed ranged from one to three sessions, with the average interval between the first and second session of 52 days and between the second and third session of 45 days. The overall objective response achieved was 100% (CR - 13 dogs; PR - 5 dogs). CR was achieved in the first session for the majority of patients who achieved it (10/13), with only one patient requiring three sessions for CR. The overall median survival time (MST) and median duration of response (DOR) obtained in this study were 419 and 370 days, respectively. The recurrence rate was 38.4% (5/13), and its occurrence did not influence the DOR of patients ($P=0.983$). MST and DOR did not differ statistically ($P=0.208$ and $P=0.924$, respectively) between dogs according to the type of response (PR or CR). Finally, the number of sessions also did not seem to influence the patients' MST and DOR, with $P<0.05$ for the 1S, 2S and 3S groups. In this study, EQT was well tolerated in dogs with CUT, demonstrating to be a safe and feasible technique, with the main safety criteria being the absence of tumor infiltration in serosa, evaluated by histopathological analysis, and constant monitoring of the patient in the postoperative period.

Keywords: comparative oncology; dog; electroporation; urothelial carcinoma.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Relação de risco de desenvolvimento de CUT associado a raça.	5
Tabela 2. Sistema de Classificação do CUT canino.	8
Tabela 3. Resultados de estudos clínicos utilizando terapia medicamentosa para o tratamento do CUT canino.	14
Tabela 4. Aspectos comparativos entre o CUT canino e humano.	19
Tabela 5. Média e desvio padrão da idade, peso e escore VCOG, dos animais utilizados no estudo, em função do sexo.	37
Tabela 6. Distribuição racial (%) dos animais utilizados no estudo	37
Tabela 7. Informações descritivas gerais sobre as características tumorais, tratamento, dados de sobrevivência e óbito, para cada paciente.	41
Tabela 8. Média e desvio padrão da média dos dias de sobrevida em função do tipo de resposta.	42
Tabela 9. Média e desvio padrão do TMS e DMR em função da ocorrência de recidiva para os animais que atingiram RC.	43
Tabela 10. Média e desvio padrão da DMR e TMS em pacientes com carcinoma vesical submetidos a uma (1S), duas (2S) ou três (3S) sessões de eletroquimioterapia.	43

LISTA DE FIGURAS

Página

<p>Figura 1. Ilustração de vesícula urinária representando tumores em diferentes graus de invasão em parede vesical. A) Tumores superficiais confinados a mucosa (T1). B) Tumores com invasão de muscular, sem acometimento de camada serosa (T2). C) Tumor com invasão de muscular e serosa. D) Tumor com invasão em órgão adjacente (próstata).</p> <p>Figura 2. Processamento de amostra tumoral para análise histopatológica: etapa de congelação com liberação de CO₂. Fonte: VC Lab Pat, SP, Brasil.</p> <p>Figura 3. Análises microscópicas realizadas no transoperatório. A) Invasão de células neoplásicas em serosa. B) Invasão de células neoplásicas até camada muscular, com serosa livre. Fonte: VC Lab Pat, SP, Brasil.....</p> <p>Figura 4. A) Exposição do tumor após cistotomia; B) Aplicação da EQT após avaliação histopatológica transoperatória. Fonte: Vet Câncer, SP, Brasil.</p> <p>Figura 5. Aparelho gerador de pulsos VETCP 125® (VET CÂNCER/ IMPLASTIC, São Paulo, SP, Brasil).</p> <p>Figura 6. Eletrodo VETCP 125® (VET CÂNCER/IMPLASTIC, São Paulo, SP, Brasil).</p> <p>Figura 7. Resposta completa obtida após uma sessão de EQT. Figura A) Tumor em parede vesical antes da primeira sessão; Figura B) Avaliação de monitoramento, animal em RC, sem recidiva, há 17 meses após a primeira sessão.</p> <p>Figura 8. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ($p < 0,05$) para tempo de sobrevida segundo o número de sessões. 1S = uma única sessão (n=12); 2S duas sessões (n=6); 3S = três sessões (n=3); (P = 0,062). Pacientes vivos ao final do estudo foram censurad</p> <p>Figura 9. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ($p < 0,05$) para tempo de duração de resposta segundo o número de sessões. 1S = uma única sessão (n=12); 2S duas sessões (n=5); 3S = três sessões (n=3) (P = 0,069). Pacientes vivos ao final do estudo foram censurados.....</p>	<p>9</p> <p>30</p> <p>31</p> <p>32</p> <p>33</p> <p>33</p> <p>40</p> <p>44</p> <p>45</p>
--	--

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma urotelial (CUT), também conhecido como carcinoma de células transicionais, é a neoplasia maligna de vesícula urinária de maior incidência na espécie canina. A cada ano, é esperado que o CUT acometa mais de 50.000 cães nos Estados Unidos, representando cerca de 2% de todas as neoplasias diagnosticadas nessa espécie (Knapp et al., 2014; Sommer et al., 2018). Os tumores em bexiga podem ser classificados em três diferentes estádios, de acordo com o grau de invasão em parede vesical, com cerca de 90% dos cães acometidos pelo CUT apresentando o tumor na forma músculo-invasiva (Argyle; Hayes, 2008; Pompeo et al., 2008; Sommer et al., 2018).

No interior da bexiga, a localização mais comum para o surgimento dessa neoplasia é em região de trígono vesical, havendo invasão uretral em mais de 50% dos casos, o que torna sua exérese cirúrgica complexa e muitas vezes inviável. Nestes casos, a cistectomia total pode ser realizada, no entanto, é um procedimento complexo com alto risco de complicações importantes no pós-operatório, comprometendo a qualidade de vida de grande parte dos pacientes (Patrick et al., 2006; Knapp et al., 2014; Fulkerson; Knapp, 2020). E ainda, mesmo quando possível a ressecção tumoral com preservação da bexiga, por meio da cistectomia parcial, as taxas de recidiva ainda são altas (Marvel et al., 2017; Bradburry et al., 2021).

Diante disso, o tratamento medicamentoso com agentes quimioterápicos e AINEs é a abordagem terapêutica preconizada na maioria dos casos, proporcionando controle da doença com qualidade de vida por até um ano após o diagnóstico. No entanto, as respostas são temporárias e as taxas de remissão variam entre 35-50%, quando os fármacos são administrados em conjunto (Knapp et al., 2013; Arnold et al., 2011; Knapp et al., 2016; Fulkerson e Knapp, 2020).

Em humanos, o CUT surge em sua forma não-invasiva e de baixo grau em cerca de 75% dos casos, não havendo predileção quanto ao sítio anatômico, permitindo assim tratamentos locais mais eficazes. No entanto, mesmo com a ressecção tumoral completa, ainda há uma taxa importante de recidiva, assim como

ocorre em cães, e maior probabilidade de progressão para o CUT invasivo (Van de Bosch et al., 2011; Sylvester et al., 2021).

Diante dos desafios enfrentados no controle local dessa neoplasia, a busca por novas abordagens terapêuticas é necessária, em ambas espécies. Diversas similaridades entre o CUT invasivo canino e humano vêm sendo descritas em diferentes estudos, principalmente quanto ao comportamento biológico, aspectos histopatológicos, resposta a terapia e índices de recidiva. Nesse contexto, estudos clínicos que utilizam o cão como modelo animal para o estudo do CUT invasivo humano, proporcionam benefícios para ambos (Knapp et al., 2020; Tsamouri et al., 2021).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos na busca por alternativas terapêuticas que sejam mais efetivas e seguras para o CUT canino, destacando-se aqueles que investigam terapias-alvo, epigenética, quimioterapia metronômica e a eletroquimioterapia (Hahn et al., 2012; Schrempp et al., 2013; Knapp et al., 2014; Rangel et al., 2018; Rossman et al., 2020).

A eletroquimioterapia (EQT) representa uma terapia local, não-invasiva, de simples execução e com poucos efeitos adversos. Seu uso é indicado principalmente em tumores que possuem limitações na sua ressecção cirúrgica completa, devido a localização, tamanho ou número de lesões. Essa técnica vem demonstrando significativa eficácia antitumoral em diversos tipos tumorais na espécie humana e canina, incluindo o melanoma, sarcoma, mastocitoma, carcinoma de células escamosas, carcinomas nasais e, ainda de forma experimental, em carcinomas vesicais (Spugnini et al., 2006; Maglietti et al., 2017; Probst et al., 2018; Rangel et al., 2018; Simcic et al., 2021). Assim, diante dos desafios no tratamento do CUT canino, a EQT surge como uma potencial modalidade terapêutica local para esses pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neoplasias de bexiga

As neoplasias do trato urinário em cães podem se desenvolver em região de rins, bexiga, ureteres, uretra ou próstata. No entanto, a bexiga é considerada o órgão

mais frequentemente acometido pelo câncer, representando cerca de 1-2% de todos os tumores malignos diagnosticados em cães (Knapp et al., 2000; Fulkerson e Knapp, 2020). A prevalência das neoplasias de bexiga em hospitais universitários estadunidenses e canadenses tem crescido de forma significativa nos últimos 30 anos, sendo esperado que mais que 50.000 cães sejam acometidos pela doença a cada ano (Knapp et al., 2014). No cenário brasileiro, no entanto, essa prevalência ainda não é conhecida.

O carcinoma urotelial (CUT) representa o tipo neoplásico mais comum que afeta a bexiga de cães e seres humanos, sendo um tumor de caráter maligno com origem nas células epiteliais transicionais desse órgão (Burger et al., 2013; Fulkerson e Knapp, 2020). Outras neoplasias malignas que podem se desenvolver na bexiga de cães, de forma mais rara, incluem: carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas uroteliais plasmocitóides e tumores neuroendócrinos (De Brot et al., 2018).

Essa neoplasia pode ser classificada de acordo com seu grau de infiltração em parede vesical, assim como pela sua apresentação macroscópica. Em cães, a maioria dos tumores são de caráter infiltrativo e de grau intermediário a alto, sendo classificados em estágio T2 e T3 (> 90% dos casos) e denominados de CUT invasivo ou músculo-invasivo. Sua apresentação superficial de baixo grau (estádio T1), no entanto, é incomum nessa espécie (Valli et al., 1995; Patrick et al., 2006). Em contrapartida, em humanos, a maioria dos casos de CUT compreendem a sua forma não invasiva de baixo grau, representando cerca de 75% dos casos (Van Den Bosch et al., 2011).

Quanto a sua apresentação macroscópica, o CUT pode ser classificado em papilar ou não-papilar. A apresentação não-papilar é caracterizada por tumores planos ou endofíticos, considerada mais comum em cães. No estudo de De Brot et al. (2018), os tumores vesicais não papilares e planos foram 30 vezes mais associados a invasão muscular do que os tumores papilares e, de forma geral, são associados a doença em sua forma mais agressiva, em cães e humanos.

O desenvolvimento de metástases ocorre em aproximadamente 16% dos cães com CUT invasivo no momento do diagnóstico e em mais de 50% no momento do óbito. Segundo o estudo de Knapp et al. (2014), no qual foram realizadas

necropsias em 137 cães com CUT invasivo, 58% possuíam metástases a distância e 42% em linfonodos regionais. O pulmão foi considerado o sítio metastático mais comum (50%), seguido pelos ossos (11%) e fígado (7%). Focos metastáticos também podem surgir em parede abdominal por implantação de células neoplásicas após manipulação com instrumentais cirúrgicos contaminados (Higuchi et al. 2013). Em humanos com CUT invasivo, os sítios metastáticos são similares aos descritos em cães (Wallmeroth et al. 1999).

2.2. Etiologia

A etiologia do CUT não é totalmente conhecida, no entanto, estudos sugerem causa multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais. Existe uma significativa predisposição racial ao desenvolvimento dessa neoplasia (Tabela 1), principalmente de cães da raça Terrier Escocês, que possuem um risco cerca de 18 vezes maior que as demais raças. Outras raças também predispostas incluem o Terrier Branco das Terras Altas Ocidentais, Pastor de Shetland e Beagle, que estão sob um risco de 3-5 vezes maior que as demais raças. Ainda, é constatado que cães de raças predispostas desenvolvem a doença mais precocemente (média de 9 anos) e em sua apresentação mais agressiva (Fulkerson e Knapp, 2015; Carvalho et al., 2016; De Brot et al., 2018; Grassinger et al., 2019).

Tabela 1. Relação de risco de desenvolvimento de CUT associado a raça.

Raça	Razão de probabilidade
Terrier Escocês	18.09
Pastor de Shetland	4.46
Beagle	4.15
Fox Terrier <i>Wire-Haired</i>	3.2
Terrier Branco das Montanhas Ocidentais	3.02
Schnauzer Miniatura	0.92
Poodle Miniatura	0.86
Doberman Pinscher	0.51
Labrador Retriever	0.46
Golden Retriever	0.46
Pastor Alemão	0.40

(Adaptado de Knapp, 2000)

Em geral, essa neoplasia possui maior incidência em cães idosos, com idade média de 11 anos ao diagnóstico. Fêmeas estão sob maior risco que os machos, com proporção de gênero variando de 1.71:1 a 1.95:1. A incidência é mais elevada em cães castrados, independente do gênero (Knapp et al., 2014; De Brot et al., 2018). Os humanos afetados pelo CUT se encontram em faixa etária média correspondente à canina (> 65 anos), no entanto, os homens são mais comumente afetados que as mulheres (2.8:1) (Burger et al., 2013).

Outros fatores de risco incluem a exposição a produtos inseticidas, agrotóxicos, obesidade e exposição a ciclofosfamida (Fulkerson e Knapp, 2020). Com relação aos fatores ambientais, Glickman et al. (1989) demonstraram que o CUT canino possui uma associação significativa com a aplicação tópica de repelentes para mosquitos e carrapaticidas, sendo esse risco maior em cães em sobrepeso ou obesos. Tal predisposição de cães obesos ao CUT pode ser explicada pela capacidade do tecido adiposo em armazenar determinados componentes químicos dos inseticidas, que são em sua maioria lipofílicos, prolongando assim a exposição do organismo a esses carcinógenos.

A exposição a ambientes tratados com herbicidas (em campos, gramados e plantações) tem sido associada a um risco significativo de desenvolvimento do CUT

vesical, em cães e humanos (Glickman et al., 2004; Koutros et al., 2016). Em 2004, Glickman e colaboradores realizaram um estudo com cães da raça Terrier Escocês e a exposição a herbicidas e inseticidas, em que concluíram que os cães expostos a esses compostos químicos apresentaram risco significativamente maior do que aqueles que nunca foram expostos.

De forma similar, Knapp et al. (2013) identificaram a presença de pelo menos um dos três compostos químicos analisados, na urina da maioria dos cães inclusos no estudo, antes e após a aplicação de herbicidas no ambiente. Com isso, os autores também concluíram que os cães com CUT podem ser considerados potenciais sentinelas para o estudo e identificação de fatores de risco ambientais em seres humanos, uma vez que o período de latência entre a exposição e o desenvolvimento do CUT em cães é bem mais curto que em humanos (1-10 anos vs. décadas, respectivamente) (Okajima et al., 1981). Além dos herbicidas, a exposição a poluentes industriais também foi associada com o desenvolvimento de CUT em ambas espécies (Hayes et al., 1981).

O consumo de vegetais tem sido estudado como fator protetivo ao desenvolvimento do CUT em cães. Raghavan et al. (2005) demonstraram que os cães da raça Terrier Escocês que consumiam vegetais pelo menos três vezes na semana, associado com sua dieta habitual, apresentaram uma redução no risco de desenvolvimento de CUT vesical.

2.3. Apresentação clínica

O CUT canino pode ser manifestado através de sinais clínicos inespecíficos, que incluem hematúria, disúria, polaciúria, letargia e perda de peso. De forma menos frequente pode haver claudicação devido ao desenvolvimento de metástases ósseas ou osteopatia hipertrófica (Norris et al., 1992; Fulkerson e Knapp, 2020). Devido a inespecificidade das manifestações clínicas, o CUT pode ser facilmente confundido com outras condições não neoplásicas, como a cistite crônica, cistite polipoide, pólipos fibroepiteliais e doença do trato urinário inferior, e devido a isso, o diagnóstico deve ser instituído com cautela (Fulkerson e Knapp, 2015; Fulkerson e Knapp, 2020).

O sítio mais comum de desenvolvimento dessa neoplasia é em região de trígono vesical, havendo o envolvimento uretral em mais de 50% dos cães acometidos, justificando a ocorrência de obstrução, parcial ou total, do trato urinário inferior (Fulkerson e Knapp, 2015; Fulkerson e Knapp, 2020). Diferente do que ocorre nos cães, os tumores vesicais em humanos não possuem predileção de desenvolvimento em trígono, sendo essa incidência variável em diferentes sítios no interior da bexiga (Knapp et al. 2014; De Brot et al., 2018).

. No estudo de Knapp et al. (2000) 29% dos cães machos com CUT apresentaram invasão do tumor em próstata, também não sendo incomum o desenvolvimento do CUT primário nesse órgão. Por sua vez, em humanos, o envolvimento prostático pelo CUT vesical possui incidência variável (15-48%), porém, o desenvolvimento do CUT primário prostático é considerado raro (Autorino et al., 2009).

2.4. Estadiamento Clínico

Em cães com CUT, o estadiamento clínico deve ser realizado a fim de determinar a extensão da doença e estágio tumoral, critérios decisivos para a tomada de decisão terapêutica e para a obtenção de informações prognósticas. Para isso, são necessários exames laboratoriais (hemograma, bioquímicos séricos, urinálise) e de imagem (ultrassonografia abdominal e radiografia torácica).

Para a realização da urinálise, a amostra de urina deve ser coletada por micção espontânea ou por cateterização. A coleta por meio da cistocentese é desaconselhada, devido ao risco de disseminação de células neoplásicas na cavidade abdominal (Mutsaers et al., 2003; Fulkerson e Knapp, 2020).

A ultrassonografia abdominal é um exame complementar fundamental, que permite a identificação do tumor assim como a avaliação da sua localização primária, características e dimensões. Tais informações são importantes para o planejamento cirúrgico, prognóstico, monitoração de resposta a terapia instituída, assim também para a identificação de possíveis focos metastáticos. Além disso, a ultrassonografia é considerada um exame de fácil acesso, baixo custo e pouco invasivo, não

necessitando de procedimentos anestésicos para sua realização. Outros exames de imagem que podem ser utilizados para mapear o CUT em bexiga, uretra proximal e próstata, incluem cistossonografia, cistografia e tomografia computadorizada (Fulkerson e Knapp, 2015).

A monitoração da resposta tumoral por imagem durante e após o tratamento instituído é essencial, uma vez que a observação dos sinais clínicos isolados não é o suficiente, podendo haver variações dependendo da presença ou resolução de infecções do trato urinário. A ultrassonografia é considerada o método de melhor custo-benefício para monitorar a resposta tumoral em estudos clínicos, sendo importante a determinação de um protocolo padrão com o mesmo ultrassonografista, mantendo o animal sempre na mesma posição e com mesma repleção vesical (Fulkerson e Knapp, 2015; Honkisz et al., 2018).

O sistema de estadiamento do CUT definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o TNM (tumor/linfonodo/metástase), classifica a neoplasia em três estádios diferentes, de acordo com o grau de invasão do tumor na parede vesical e identificação de metástases regionais e a distância (Owen & WHO, 1980) (Tabela 2). Baseado nesse critério, o estudo de Knapp et al. (2000) demonstrou que 78% dos cães inclusos foram classificados no estágio T2 e 20% no estágio T3.

Tabela 2. Sistema de Classificação do CUT canino.

T - Tumor Primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T0	Sem evidencia de tumor primário
T1	Tumor papilar superficial
T2	Tumor com invasão em parede de bexiga (com endurecimento)
T3	Tumor com invasão em órgãos vizinhos
N - Linfonodos Regionais	
N0	Sem envolvimento de linfonodos
N1	Linfonodos regionais envolvidos
N2	Linfonodos regionais e linfonodos justa-regionais envolvidos
M - Metástases a Distância	
M0	Sem evidencia de metástases
M1	Presença de metástases a distância

(Owen & WHO, 1980).

É importante considerar que a parede da bexiga é composta por três principais camadas: mucosa, muscular e serosa, sendo a última mais externa, composta por tecido adiposo. Pacientes com CUT em estágio T1 apresentam tumores superficiais confinados a camada mucosa (Figura 1A), enquanto que em estágio T2 apresentam invasão tumoral em parede vesical até a camada muscular (Figura 1B), ou envolvimento das três camadas, incluindo a serosa (Figura 1C). Por fim, tumores em estágio T3 são caracterizados por envolvimento de estruturas adjacentes pelo tumor, como ilustrado na Figura 1D (invasão em próstata).

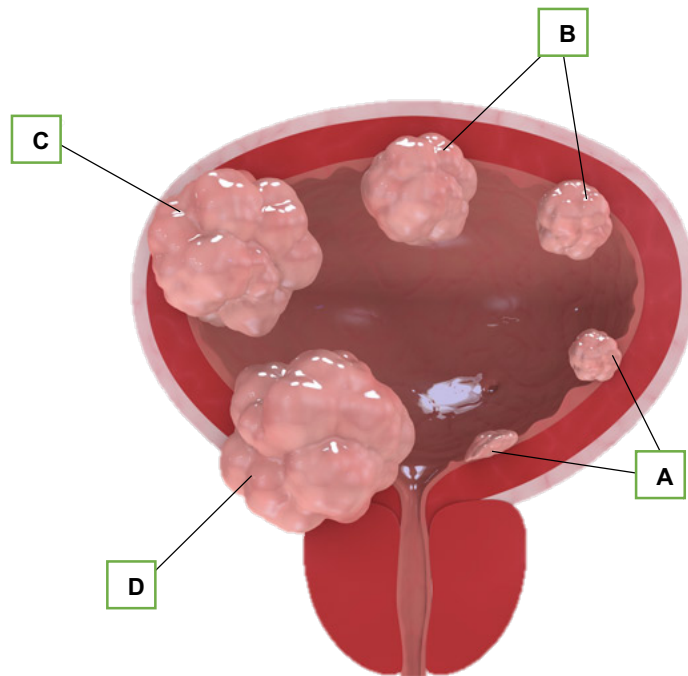


Figura 1. Ilustração de vesícula urinária representando tumores em diferentes graus de invasão em parede vesical. A) Tumores superficiais confinados a mucosa (T1). B) Tumores com invasão de muscular, sem acometimento de camada serosa (T2). C) Tumor com invasão de muscular e serosa. D) Tumor com invasão em órgão adjacente (próstata).

Fonte: Adaptado de Cleveland Clinic, 2017. Disponível em:

<https://consultqd.clevelandclinic.org/genetic-and-pathologic-characteristics-of-small-cell-bladder-cancer/>

2.5. Diagnóstico

A correta abordagem diagnóstica do CUT é essencial para o tratamento precoce e eficaz. O exame histopatológico é considerado o padrão-ouro para a obtenção do diagnóstico definitivo, assim como para estadiamento completo da neoplasia (Mutsaers et. al., 2003; Fulkerson e Knapp, 2015). A obtenção de amostras pode ser realizada por meio da cistoscopia, cistotomia ou cateterização traumática, sendo esta última menos eficiente em se obter amostras representativas. A biópsia percutânea guiada por ultrassonografia é desaconselhada devido ao risco de disseminação de células tumorais (Messer et. al., 2005; Childress, 2011; Knapp et al., 2014; Fulkerson e Knapp, 2020).

A cistoscopia é considerada um método não invasivo, na qual operador consegue visualizar a uretra e a bexiga e obter amostras de tecido. Entretanto, o pequeno tamanho amostral e a impossibilidade de se obter amostras que representem as três camadas da bexiga são fatores limitantes desta técnica (Fulkerson e Knapp, 2020).

Apesar de o histopatológico ser necessário para confirmar o diagnóstico de CUT e classificar seu grau de invasão em parede, a citologia por lavado vesical pode indicar um diagnóstico presuntivo. Entretanto, é possível a obtenção de resultados falso-positivos, uma vez que células transitórias normais da bexiga podem parecer alteradas na presença de reação inflamatória vesical (Valli et al., 1995).

A imunohistoquímica representa uma ferramenta de auxílio diagnóstico, possuindo importante papel na diferenciação do CUT de outros tipos de carcinomas e de condições não neoplásicas. Nesse caso, são utilizados mais comumente os marcadores uroplaquina III (UPIII) e citoqueratina 7, sendo a UPIII o marcador de escolha na maioria dos casos (Ramos-Vara et al., 2003; Carvalho et al., 2016).

Outro método diagnóstico recentemente desenvolvido é a identificação da mutação do gene B-Raf (BRAF), identificada em aproximadamente 80% dos casos de carcinomas de bexiga e próstata. A detecção da mutação é realizada através do exame de Reação de Cadeira Polimerase (PCR), utilizando como amostra a urina, lavado vesical ou lâmina com esfregaço de sedimento urinário, sendo um teste de alta sensibilidade e especificidade e pouco invasivo (Mochizuki et al., 2015).

2.6. Tratamento

O tratamento do CUT canino abrange diferentes modalidades terapêuticas, como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia anti-inflamatória, ou uma combinação dos mesmos, constituindo a terapia multimodal (Heller et al., 2006; Arnold et al., 2011; Fulkerson e Knapp, 2020; Allstadt et al., 2015).

2.6.1. Cirurgia

Idealmente, o objetivo do tratamento cirúrgico em tumores de bexiga seria a exérese tumoral completa com 1-2 cm de margens. No entanto, essa abordagem é considerada viável para apenas uma minoria de cães que possuem o tumor distante do trígono, através da técnica de cistectomia parcial (Marvel et al., 2017; Fulkerson e Knapp, 2020; Bradburry et al., 2021).

Por sua vez, quando os tumores estão em trígono vesical, a ressecção completa com preservação da bexiga se torna inviável em grande parte dos casos. A cistectomia total, associada a diferentes técnicas para desvio urinário, é uma alternativa terapêutica para estes casos, entretanto, está associada a altas taxas de complicações pós-cirúrgicas, afetando a qualidade de vida do paciente. Além disso, em mais de 50% dos casos há envolvimento uretral, o que torna a cirurgia ainda mais complexa (Wongsetthachai et al., 2011; Boston; Singh, 2014; Saeki et al., 2015; Huppés et al., 2016; Knapp et al., 2020).

O procedimento cirúrgico também pode ser realizado para fins paliativos, objetivando a remoção parcial do tumor, como tratamento emergencial para alívio de obstruções ou, ainda, como terapia citoredutora (Knapp et al., 2000; Mutsaers et al., 2003; Fulkerson e Knapp, 2020; Bradburry et al., 2021).

Para os tumores distantes do trígono, apesar da cistectomia parcial proporcionar a ressecção completa com margens, estudos demonstram que a ocorrência de recidiva ainda é considerável nesses casos. Norris et al. (1992) realizaram um estudo retrospectivo com 115 cães com CUT, e dentre os 10 cães

submetidos a cirurgia com aparente ressecção completa do tumor (sem avaliação de margens histológicas), seis cães ainda sofreram recidiva (60%). Em 1996, Stone e colaboradores avaliaram a técnica de cistectomia parcial, com avaliação de margens histológicas, em 11 cães com CUT. Dentre os seis cães que obtiveram margens livres, quatro ainda sofreram recidiva (66%). No estudo de Knapp et al. (2000) com 102 cães com CUT, foi obtida a ressecção completa com margens histológicas livres em apenas dois pacientes, que acabaram sofrendo recidiva local e a distância em 8 e 4 meses, respectivamente.

Mais recentemente, Marvel et al. (2017) avaliaram a eficácia da cistectomia parcial, combinada ou não com o tratamento medicamentoso adjuvante, em cães com CUT. Nesse estudo, foram obtidas margens histológicas completas em 56% dos pacientes (21/37), no entanto, mais da metade desses cães ainda sofreram recidiva. Similarmente, no estudo de Bradbury et al. (2021), todos os seis cães que obtiveram margens histológicas livres após a cistectomia parcial, sofreram recidiva local. Em humanos, apesar do CUT superficial de baixo grau representar a maioria dos casos, as taxas de recidiva após intervenção cirúrgica completa ainda são consideráveis, podendo chegar a 75% em 5 anos (Sylvester et al., 2006; Burger et al., 2013).

Uma hipótese que pode esclarecer essa alta taxa de recidiva do CUT vesical, é chamada de “efeito de cancerização em campo” (do inglês “*field cancerization effect*”), sendo bastante discutida em diferentes estudos. Essa teoria levanta a hipótese de que a bexiga, por estar em contato direto com a urina, tem seu urotélio inevitavelmente exposto a carcinógenos de maneira uniforme, que podem levar a transformação celular maligna em múltiplos focos ao longo da parede vesical. No entanto, a origem desse efeito ainda não é totalmente conhecida, não sendo possível determinar se o mesmo ocorre por indução de alterações genéticas policlonais independentes em múltiplos sítios vesicais, ou pela transformação maligna de uma célula que sofre expansão clonal e se dissemina ao longo do urotélio vesical, criando múltiplos focos pré-neoplásicos (Dakubo et al., 2007; Marvel et al., 2017; Bradbury et al., 2021).

2.6.2. Terapia medicamentosa

Diante disso, a abordagem terapêutica empregada de forma mais frequente no CUT canino continua sendo a terapia medicamentosa sistêmica, mesmo que não proporcionando a cura e nem taxas de remissão duradouras. Essa abordagem consiste no uso de quimioterápicos e/ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inibidores da enzima ciclooxigenase (COX), que exercem efeitos antitumorais tanto locais quanto sistêmicos (Knapp et al., 1994; Knapp et al., 2000; Knapp et al., 2014; Boria et al., 2005; Carvalho et al., 2016).

Nos últimos anos, a inibição seletiva da forma induzida da enzima COX-2 ou a inibição não seletiva (COX-1 e COX-2) tem gerado bastante interesse no campo da oncologia. Através da prostaglandina E2 (PGE2), metabólito produzido pela COX-2, há o recrutamento de fatores angiogênicos, diminuição da imunovigilância do organismo, potencialização do crescimento e invasividade tumoral, assim como inibição do processo apoptótico. A superexpressão dessa enzima já foi identificada em diversos tipos tumorais caninos, incluindo o CUT. Diante disso, o emprego dos AINEs objetiva a inibição da cascata gerada pelos efeitos da PGE2, exercendo importante papel no controle da progressão tumoral. A expressão da enzima COX-2 ocorre majoritariamente em células malignas do urotélio, enquanto que a enzima COX-1 é expressa tanto em células uroteliais normais quanto neoplásicas (Khan et al., 2000).

O piroxicam, inibidor não-seletivo da COX, é um dos fármacos anti-inflamatórios mais frequentemente utilizado em combinação com outros quimioterápicos no CUT. Além de promover efeitos antitumorais, este fármaco também atua no alívio da dor e desconforto decorrentes da doença (Knapp et al., 1994; Henry et al., 2003; Boria et al., 2005; Allstadt et al., 2015; Carvalho et al., 2016). Inibidores seletivos da enzima COX-2, como deracoxibe e firocoxibe, também vêm sendo cada vez mais empregados devido a sua maior seletividade para essa enzima, minimizando assim, possíveis efeitos colaterais que podem ser causados pela inibição da COX-1, uma vez que também é expressa em tecidos normais (McMillan et al., 2011; Knapp et al., 2013).

Os agentes quimioterápicos intravenosos mais comumente utilizados no tratamento dessa neoplasia incluem a mitoxantrona, vimblastina, cisplatina, carboplatina e gencitabina, utilizados sozinhos ou em combinação com inibidores da

COX, proporcionando diferentes tempos de sobrevida nos estudos já realizados (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados de estudos clínicos utilizando terapia medicamentosa para o tratamento do CUT canino.

Quimioterápico	N (cães)	Tempo de Sobrevida (dias)	Referência
Piroxicam	34	181	Knapp et. al (1994)
Mitoxantrona + Piroxicam	55	291	Henry et. al (2003)
Carboplatina + Piroxicam	31	161	Boria et. al (2005)
Firocoxibe	15	152	Knapp et. al (2013)
Cisplatina + Firocoxibe ^a	14	186	Knapp et. al (2013)
Cisplatina + Firocoxibe ^b	13	338	Knapp et. al (2013)
Vimblastina	28	147	Arnold et. al (2011)
	20	531 ^c	Knapp et al. (2016)
Vimblastina + Piroxicam	24	299	Knapp et al. (2016)
Gencitabina + Piroxicam	38	230	Marconato et. al (2011)
Toceranibe + Vimblastina	10	108	Rippy et .al (2016)
Fosfato de Toceranibe	37	149	Gustafson et al. (2019)
Mitomicina C intravesical	13	223	Abbo et. al (2010)

^aNesse grupo os cães receberam cisplatina e firocoxibe ao mesmo tempo.

^bNesse grupo os cães receberam cisplatina sozinha, seguido por firocoxibe sozinha.

^cAnimais receberam vimblastina sozinha, seguido por piroxicam sozinha.

A associação da mitoxantrona com o piroxicam é comumente utilizada em cães com CUT. Em um estudo clínico com 48 cães que receberam esse protocolo, a taxa de resposta foi de 35,4% e a sobrevida média foi de 291 dias, superior a obtida em estudo clínico avaliando a ação do piroxicam como agente único (Knapp et al., 1994; Henry et al., 2003).

A cisplatina é considerada um dos quimioterápicos mais ativos no tratamento do CUT, tanto em humanos como em cães, porém, seus efeitos adversos limitam o seu uso na espécie canina (Knapp et al., 2000; Greene et al., 2007). Dentro do mesmo

grupo farmacológico, a carboplatina é uma alternativa ao uso da cisplatina, apesar de apresentar efeito antitumoral menos pronunciado.

Allstadt et al. (2015) compararam a eficácia do uso combinado da mitoxantrona com piroxicam e da carboplatina com piroxicam em um estudo com 50 cães com CUT. Os resultados não demonstraram diferença significativa na resposta final entre ambos os tratamentos. O estudo demonstra ainda que a toxicidade gastrointestinal foi ligeiramente maior no grupo tratado com carboplatina, e no grupo tratado com mitoxantrona, houve maior incidência de mielossupressão.

O efeito antitumoral da vimblastina sobre o CUT canino foi avaliado em um estudo clínico prospectivo com 28 cães, que demonstrou uma sobrevida média de 147 dias (variando de 28 a 476 dias) desde a primeira dose de vimblastina até o momento do óbito, e de 299 dias desde o diagnóstico até o momento do óbito. Além disso, proporcionou taxa de remissão e doença estável de 36% e 50%, respectivamente. Assim, demonstrando que a vimblastina exerce efeito antitumoral sobre o CUT e representa uma opção de tratamento para os cães acometidos (Arnold et al., 2011). A vimblastina também possui ação sobre o CUT em humanos quando utilizado como agente único e quando combinada com outros quimioterápicos em casos de CUT invasivo (Roberts et al., 2006; Park et al., 2007).

Recentemente, um estudo clínico avaliou o uso da gencitabina em combinação com o piroxicam em cães com CUT. Apesar de ter proporcionado um tempo de sobrevida médio (230 dias) similar aos de outros protocolos, tal associação demonstrou ser uma alternativa para o controle dessa neoplasia, com boa tolerabilidade pelos pacientes (Marconato et al., 2011).

O uso dos inibidores seletivos ou não seletivos da COX como agentes únicos pode ser uma opção para tratamentos mais conservativos. Em um estudo clínico prospectivo conduzido por Knapp et. al. (1994), objetivou-se avaliar a atividade antitumoral do piroxicam em cães com CUT, obtendo-se uma resposta objetiva de 18%, com dois pacientes atingindo resposta completa e vários outros com doença estável por tempo prolongado. Além disso, esse estudo também concluiu que além do efeito antitumoral local, o piroxicam também exerceu ação importante no controle da dor e inflamação. O tempo médio de sobrevida para esses pacientes foi de 181 dias.

No que se refere ao uso dos inibidores seletivos da COX-2, Knapp et al. (2013) avaliaram a eficácia do firocoxibe associado a cisplatina. O firocoxibe potencializou significativamente o efeito da cisplatina, obtendo-se resposta parcial em 57% dos cães e sobrevida média de 179 dias. E ainda, no grupo tratado com o firocoxibe como protocolo resgate (após falha da cisplatina), a sobrevida obtida foi de 338 dias. Nesse estudo o firocoxibe não agravou a nefrotoxicidade naturalmente causada pela cisplatina, efeito comum quando a mesma é associada com o piroxicam.

2.6.3. Outras terapias

Diante da ausência de protocolos que proporcionem uma sobrevida significativamente maior para cães com CUT, novas terapias medicamentosas têm sido investigadas para controle local e sistêmico.

O fosfato de toceranibe (TOC), droga inibidora da proteína tirosina quinase, possui mecanismo de ação associado a inibição de receptores específicos, sendo eles o receptor KIT, o receptor do fator de crescimento endotelial-2 (VEGFR-2) e o receptor do fator de crescimento de derivados de plaquetas-beta (PDGFR- β). A desregulação desses receptores foi identificada em diferentes tipos de neoplasias, incluindo mastocitomas, carcinomas de sacos anais, carcinomas renais, entre outros (London et al., 2003; London et al., 2009). Com o intuito de identificar o padrão de expressão desses receptores em CUT vesicais, Walters et al. (2017) demonstraram a expressão positiva de PDGFR- β e VEGFR-2 em todas as amostras tumorais analisadas.

Diante disso, Rippey et al. (2016) avaliaram a eficácia do uso combinado do TOC com a vimblastina em CUTs caninos. No entanto, a média de duração de tratamento foi de 108 dias, revelando que esse protocolo não promoveu benefício clínico quando comparado com outros protocolos terapêuticos. Recentemente, Gustafson et al. (2019) avaliaram de forma retrospectiva 37 cães com CUT tratados com TOC, obtendo média de sobrevida de 149 dias, sendo possível considerá-lo como uma opção para tratamento resgate.

Outra abordagem terapêutica para o manejo do CUT canino é a quimioterapia intravesical, sendo a bexiga é um órgão considerado “fechado” com mínima absorção de agentes através da parede vesical, o que torna esse tipo de terapia uma opção

viável. Diante disso, Abbo et. al. (2010) conduziram um estudo clínico no qual foi avaliado a atividade antitumoral da mitomicina C intravesical, que resultou em um tempo de sobrevida médio de 223 dias com 20% dos cães vivos após um ano do início do tratamento.

Recentemente, o uso de terapias alvo moleculares no tratamento do CUT canino tem sido investigado. Rossman et al. (2020) avaliaram a eficácia e segurança do vemurafenib, fármaco utilizado na inibição da via de sinalização do gene BRAF, frequentemente mutado no CUT invasivo canino. O tratamento proporcionou taxa de remissão parcial de 38%, com intervalo livre de progressão de 181 dias, resultados similares ao tratamento com quimioterapia convencional. Nesse estudo, o CUT invasivo canino mostrou-se similar ao CUT invasivo em humanos, principalmente no que se refere a resposta a terapia e aos efeitos adversos, destacando o cão como um modelo animal ideal para estudos em terapia alvo do gene BRAF em humanos.

É possível concluir que a terapia medicamentosa proporciona a remissão ou estabilização da doença com qualidade de vida e efeitos colaterais toleráveis, no entanto, não promove a cura ou sobrevidas superiores a um ano, em geral. Diante do exposto, é evidente a necessidade de investigar e desenvolver novas modalidades terapêuticas que proporcionem melhor controle local da doença, assim como aumento de tempo de sobrevida com qualidade de vida (Knapp et al., 2014; Fulkerson e Knapp, 2020).

2.7. Oncologia comparada no desenvolvimento de novas terapias

A cada ano, é esperado que o CUT vesical acometa mais de 20.000 cães nos Estados Unidos, sendo mais de 90% dos pacientes diagnosticados com CUT na sua apresentação invasiva (Knapp et al., 2014). Com relação ao cenário do CUT na medicina humana, é considerada a nona neoplasia maligna mais comum no mundo, com mais de 400.000 casos por ano (Babjuk et al., 2013; Antoni et al., 2017).

Em humanos, a terapia de eleição para o CUT superficial não invasivo consiste na ressecção transuretral do tumor associada à quimioterapia intravesical ou imunoterapia. Apesar de apresentarem uma boa resposta a esses tratamentos e da

localização tumoral ser favorável na maioria dos casos, ainda há risco significativo de recidiva e progressão para o CUT invasivo. Dependendo das características do paciente, as taxas de recidiva podem chegar em 75% dentro de 5 anos e as taxas de progressão em 45% (Van de Bosch et al., 2011; Sylvester et al., 2021). O CUT invasivo em humanos também possui comportamento potencialmente letal, requer tratamento agressivo e apenas 5% dos pacientes com a doença metastática permanecem vivos em cinco anos (Fonseca; Zequi, 2012; Monteiro et al., 2019).

Quando o CUT humano não invasivo é refratário aos tratamentos iniciais e progride para a forma invasiva, há a indicação da cistectomia radical, procedimento cirúrgico com maiores índices de complicações e mortalidade, afetando consideravelmente a qualidade de vida, assim como ocorre em cães (Vásquez et al., 2015).

O estudo de Van de Bosch et al. (2011) avaliou a efetividade da cistectomia radical como tratamento inicial de humanos com CUT não invasivos classificados como de alto risco de progressão, no entanto, apesar de melhora na sobrevida, o procedimento radical não promoveu a cura e afetou a qualidade de vida nesses pacientes. Assim, há uma urgência de que novas terapias sejam desenvolvidas para o tratamento do CUT invasivo, tanto em humanos quanto em cães.

Para a investigação da eficácia e segurança de novas terapias na medicina humana, estudos clínicos prévios em modelos animais são de grande importância. Diversos modelos animais experimentais são utilizados nas pesquisas acerca do câncer de bexiga em humanos, sendo em sua maioria camundongos ou ratos. No entanto, ainda há uma necessidade por modelos animais nos quais essa neoplasia se desenvolva naturalmente, mimetizando de forma mais fidedigna a condição humana (Yamaguchi et al., 1994; Ogihara et al., 2000; Kubota et al., 2000; Mitsui et al., 2002; Frandsen et al., 2015; Knapp et al., 2020).

Apesar de representarem a maioria dos casos em cães e a minoria em humanos, o CUT invasivo nessas duas espécies compartilham muitas similaridades, principalmente no que se refere ao comportamento biológico, aspectos histomorfológicos e genéticos, características moleculares, resposta a quimioterapia e potenciais biomarcadores prognósticos e diagnósticos (Knapp et al., 2020; Tsamouri et al., 2021). Além disso, os cães vêm ganhando cada vez mais espaço no convívio

com os humanos, sendo considerados membros da família, compartilhando o mesmo ambiente e sendo expostos aos mesmos fatores carcinogênicos, como herbicidas, fumaça de cigarro e obesidade.

Diante disso, os cães naturalmente acometidos pelo CUT invasivo representam um modelo ideal para o estudo dessa neoplasia em humanos, gerando resultados que podem ser aplicados e gerar benefícios para ambas espécies (Knapp et al., 2000; Knapp et al., 2014; Carvalho et al., 2016).

Alternativas terapêuticas menos invasivas e efetivas no tratamento local do tumor primário e prevenção de recidivas são necessárias tanto em humanos quanto em cães com CUT. Assim, diante da evolução de técnicas e abordagens terapêuticas na oncologia veterinária, a eletroquimioterapia (EQT) surge como alternativa para o tratamento dessa neoplasia em cães, e futuramente, em humanos.

A Tabela 4 apresenta a comparação de alguns aspectos do CUT humano e canino discutidos até aqui.

Tabela 4. Aspectos comparativos entre o CUT canino e humano.

Variáveis	CUT canino	CUT humano
Incidência	1-2%	2%
Idade	Média 11 anos*	Média 69-71 anos*
Gênero	Femeas > Machos (1:0,5)	Homens > Mulheres (2.8:1)
Localização anatômica	Trígono vesical	Variável
Padrão de crescimento	Papilar (50%) e não papilar (50%)	Papilar (80-90%)
Estádio tumoral	> 90% T2 ou T3 com invasão muscular (78% T2; 20% T3)	75% tumores superficiais de baixo grau não-invasivos ou <i>early invasive</i>

(Fonte: Adaptado de De Brot et al., 2018; Knapp et al., 2020).

*Faixas etárias correspondentes entre as espécies.

2.8. Eletroquimioterapia

De maneira geral, EQT consiste na administração sistêmica ou local de fármacos antineoplásicos combinados a aplicação de pulsos elétricos de intensidade, duração, frequência e número específicos. Os fármacos de escolha geralmente possuem baixa ou nenhuma capacidade de permeabilização através da membrana plasmática devido a propriedades hidrofílicas e características específicas, limitando assim sua internalização para o meio intracelular. No entanto, os pulsos elétricos aplicados proporcionam um aumento temporário e reversível da permeabilidade da membrana celular das células eletroporadas, maximizando a concentração intracelular da droga quimioterápica previamente aplicada e, conseqüentemente, seu efeito citotóxico (Zimmerman; Scheurich et al., 1981; Orłowski et al., 1988; Mir, 2006; Escoffre; Rols, 2012).

2.8.1. Eletropermeabilização

Em condições fisiológicas, a membrana plasmática das células apresenta-se na conformação de bicamada lipídica, que é regida por um potencial de repouso mantido pela ação de bombas e canais iônicos. Essa conformação dificulta a permeabilização de macromoléculas e/ou moléculas hidrofílicas para o espaço intracelular. No entanto, com a aplicação dos pulsos elétricos, é gerado um campo elétrico intenso o suficiente para criar um potencial transmembrana induzido, que ao atingir um valor limiar, se sobrepõe ao potencial de repouso inicial, levando a uma realocação de cargas iônicas ao longo da membrana, que culmina na formação de poros. Esse fenômeno é denominado de eletroporação ou eletropermeabilização (Mir; Orłowski, 1999; Miklavcic et al., 2014; Yarmush et al., 2014).

De forma mais detalhada, a eletropermeabilização ocorre por meio da mudança conformacional da bicamada lipídica através do rearranjo das “cabeças” polares e hidrofílicas para o interior da membrana, levando a formação de poros ou canais hidrofílicos. Através desses poros, torna-se possível a passagem de macromoléculas e moléculas com propriedades hidrofílicas e lipofóbicas para o meio intracelular por meio do mecanismo de difusão simples (Mir et al., 2006; Cemazar et al., 2008).

Dependendo da intensidade do campo elétrico aplicado, a eletropermeabilização causada pode ser reversível ou irreversível. Na eletropermeabilização reversível, a célula rapidamente retorna a seu estado original, mantendo sua funcionalidade. No entanto, na eletropermeabilização irreversível, as células são expostas a campos elétricos tão intensos a ponto de superar um determinado valor crítico, não sendo mais possível reverter o fluxo iônico causado. Dessa forma, ocorrem a ativação das vias de apoptose assim como a perda da homeostase e consequente necrose celular, tanto em células tumorais como em células saudáveis da margem tumoral que também foram eletroporadas, levando a um processo de morte celular não-seletiva (Mir; Orlowski, 1999; Yarmushi et al., 2014; Spugnini; Baldi, 2019).

Diante disso, é importante ressaltar que a EQT objetiva a eletropermeabilização reversível. A efetividade da técnica ocorre pela ação citotóxica do quimioterápico internalizado e não pela ação elétrica do campo em si. Assim, a EQT tem como objetivo principal a entrega de pulsos elétricos intensos o suficiente apenas para levar a formação transitória e reversível de poros, servindo como canal de transporte para a internalização do fármaco antineoplásico.

2.8.2. Parâmetros elétricos

De forma geral, as duas principais condições para que a EQT seja eficaz são a disponibilidade do fármaco em concentrações suficientes no meio extracelular e a cobertura de toda a área tumoral pelo campo elétrico. A combinação desses dois fatores é mandatória para que o quimioterápico seja internalizado de maneira efetiva nas células e para que haja a morte celular desejada (Tozon et al., 2016).

Além disso, o aparelho gerador deve ser configurado para entregar os pulsos através de parâmetros elétricos adequados, também imprescindíveis para garantir a eficácia da EQT. Desde os experimentos iniciais *in vitro* em cultivos celulares, que logo evoluíram para estudos pré-clínicos e clínicos, os parâmetros elétricos mais comumente utilizados na prática clínica são oito pulsos consecutivos com duração de 100 μ s, entregues em uma frequência que pode variar de 1 Hz a 5 kHz e voltagem de 1000 a 13000 V/cm (Mir, 2006; Tozon et al., 2016). Outra característica inerente ao

aparelho gerador dos pulsos é o tipo de eletrodo utilizado. Os eletrodos em placa são indicados para tumores superficiais e de menor tamanho. Se os tumores são maiores, mais profundos e infiltrados, os eletrodos em agulha são mais indicados devido a maior capacidade de penetração no tecido, promovendo maior alcance do campo elétrico (Cindric et al., 2021; Tozon et al., 2016).

Além dos parâmetros elétricos, outros fatores também devem ser levados em consideração para que se possa obter a eficácia desejada da técnica, como: 1) características tumorais (tipo histológico, localização e tamanho); 2) características celulares (tamanho, forma e posição da célula em relação ao campo elétrico); 3) escolha do quimioterápico e via de administração; 4) características inerentes a aplicação da técnica (área eletroporada, tempo de aplicação dos pulsos) (Suzuki et al., 2015; Rangel et al., 2018).

2.8.3. Fármacos quimioterápicos e mecanismos de ação

As duas principais drogas utilizadas na EQT são a cisplatina e a bleomicina (BLM), que possuem propriedades especialmente lipofóbicas e hidrofílicas, e por isso, quando administradas como agentes únicos, possuem maior dificuldade em atravessar a membrana celular e atingir concentrações intracelulares suficientes para serem eficazes. Assim, a EQT é uma estratégia terapêutica capaz de direcionar esses fármacos para o interior das células alvo, maximizando seu efeito citotóxico. Além disso, devido ao aumento da citotoxicidade de ambos os fármacos no local da aplicação do pulso elétrico, doses menores desses quimioterápicos são necessárias para serem efetivos e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais são observados (Mir et al., 1991; Orłowski et al., 1988; Gothelf; Mir; Gehl, 2003; Teissie; Golzio; Rols, 2005).

Fisiologicamente, o mecanismo natural de internalização celular da BLM, depende da ligação a uma proteína carreadora de membrana específica, que transporta as moléculas de BLM para o compartimento intracelular, através de uma via endocítica. Entretanto, essa internalização é limitada pela baixa expressão dessa proteína na membrana das células. No entanto, quando a administração da BLM é associada a eletropermeabilização da membrana na EQT, suas moléculas se

difundem quase que livremente para o interior da célula, tendo sua internalização potencializada em 300 a 700 vezes (Pront; Belehradek; Mir, 1993; Mir; Orłowski, 1999; Mir, 2006).

A morte celular causada pela BLM pode ocorrer através de dois diferentes mecanismos, a depender da quantidade de moléculas internalizadas, sendo eles: a 1) morte celular mitótica (MCM) e a 2) pseudoapoptose. A pseudoapoptose ocorre quando há a utilização de altas doses de BLM em condições experimentais, causando todas as alterações morfológicas e bioquímicas da apoptose clássica (Pront; Belehradek; Mir, 1993; Tounekti et al., 1993; Mir; Orłowski, 1999).

Por sua vez, a MCM é o mecanismo que ocorre predominantemente na prática clínica da EQT, ao se utilizar a BLM em doses terapêuticas. A MCM ocorre através da geração de múltiplas “quebras” no DNA da célula. Na célula tumoral, esses danos permanecem sem reparo, uma vez que seu ciclo celular é disfuncional e sua replicação é desordenada e acelerada. Assim, a medida que essas células entram em ciclos de divisão mitótica, novos danos no DNA ocorrem e se acumulam até um ponto em que as mesmas sofrem a morte celular devido a fragmentação de seus cromossomos. Em contrapartida, células quiescentes e metabolicamente estáveis (células do tecido saudável) permanecem íntegras e viáveis mesmo se eletroporadas, uma vez que não estão em constante divisão e, ainda, possuem seus mecanismos de reparo funcionais. Assim, o processo de MCM induzido pelo uso da BLM é altamente seletivo em destruir as células tumorais, poupando as células normais ao redor do tumor que forem também eletroporadas (Tounekti, 1993; Mir, 2006).

A cisplatina, por sua vez, quando combinada com a eletropermeabilização, tem a sua eficácia potencializada em menor escala quando comparado com a BLM. Isso ocorre porque a cisplatina já possui eficácia como agente terapêutico único em diversos tipos neoplásicos. Apesar disso, a cisplatina ainda é considerada uma droga com baixa capacidade permeante, tendo sua eficácia potencializada em cerca de 4-8 vezes quando associada aos pulsos elétricos na EQT. O mecanismo de morte celular causado pela cisplatina é através das vias de apoptose clássica (Mir et al., 2006).

2.8.4. Vias de administração

No que se refere as vias de administração, a BLM pode ser utilizada por via intratumoral ou intravenosa. Quando utilizada pela via intravenosa, na concentração de 3000 UI/mL, a dose preconizada é de 15.000 UI/m² de superfície corpórea, não devendo ultrapassar a dose cumulativa de 400.000 UI/m². Por sua vez, a dose da BLM aplicada pela via intratumoral é calculada por meio do volume do tumor a ser tratado: 1) 0,5 mL/cm³ (volume tumoral < 1 cm³) e 2) 0,5 – 1 mL/cm³ (volume tumoral > 1 cm³) (Tozon et al., 2016).

Para a cisplatina, a via de administração preconizada na EQT é a intratumoral, sendo a via intravenosa desaconselhada devido aos efeitos deletérios sistêmicos causados por sua aplicação (Cemazar et al., 1998; Mir, 2006). A dose de cisplatina (concentração 1 mg/mL) utilizada pela via intratumoral é calculada também segundo o volume do tumor a ser tratado: 1) 1 mL/cm³ (volume tumoral < 1 cm³); e 2) 0,5-1 mL (volume tumoral > 1 cm³) (Tozon et al., 2016).

A via intravenosa possui vantagens associadas à sua aplicação sistêmica, que permite que o fármaco seja distribuído de forma mais homogênea nas áreas a serem tratadas, garantindo assim uma melhor eficácia em tumores múltiplos ou de maior tamanho, assegurando também a presença do fármaco nas margens de tecido ao redor do tumor. A via intratumoral tem eficácia similar quando comparada a intravenosa, podendo ser utilizada em tumores de menor tamanho e quantidade (geralmente < 5 nódulos) (Cemazar et al., 2008; Tozon et al., 2016).

Em 2006, Mir e colaboradores criaram o primeiro documento de Procedimentos Operacionais Padronizados para a Eletroquimioterapia (SOP), com o objetivo de determinar diretrizes para a utilização segura e eficaz da EQT em tumores em humanos. Dez anos após, em 2016, Tozon e colaboradores publicaram uma adaptação deste documento para sua aplicação em cães e gatos. Neste documento, é recomendado o início da aplicação dos pulsos elétricos após 8 minutos da aplicação da BLM pela via intravenosa, e dentro de 1 minuto após a aplicação da cisplatina ou BLM por via intratumoral. A janela terapêutica ideal para a aplicação dos pulsos elétricos, após administração do fármaco, é de 20 minutos.

No entanto, segundo o estudo de Front et al. (1990) a concentração de BLM na área tumoral permanece elevada por períodos mais longos do que aquele determinado pelo SOP. Porém, novos estudos ainda são necessários para melhor

definição da janela terapêutica ótima, devendo ser considerados outros fatores como tipo histológico, tamanho e localização anatômica dos tumores, assim como tipo do fármaco utilizado e sua via de administração (Mali et al., 2013).

2.8.5. Efeitos imunológicos e vasculares

Além de exercer efeitos citotóxicos locais na área tumoral eletroporada, a EQT também exerce efeitos antitumorais através da sua ação na vasculatura e no sistema imune do hospedeiro.

A aplicação dos pulsos elétricos causa dois efeitos principais na vasculatura local: vasoconstrição e destruição vascular. A vasoconstrição ocorre logo após a aplicação dos pulsos elétricos, levando ao processo de hipoperfusão transitória e consequente contenção da droga dentro da área eletroporada, efeito denominado de “*vascular lock*”, que pode durar por horas. Estudos indicam que esse efeito é bem mais prolongado em tecidos tumorais do que em tecidos normais. Essa vasoconstrição pode interferir na distribuição ideal da BLM na área tumoral se os pulsos elétricos forem aplicados antes ou simultaneamente a administração intravenosa do fármaco. Devido a isso que se é preconizada a aplicação da BLM cerca de 8 minutos antes da aplicação do campo elétrico.

Além disso, os efeitos antitumorais vasculares também ocorrem pela ação citotóxica direta do quimioterápico sobre os vasos sanguíneos, levando a morte das células endoteliais do tumor, uma vez que também são células disfuncionais e de proliferação desordenada (Mir, 2006; Sersa et al., 2008; Jarm et al., 2010).

No que se refere aos efeitos causados no sistema imunológico, a morte celular induzida pela EQT leva a um evento conhecido como *antigen shedding*, através da disseminação dos Antígenos Associados ao Tumor (TAA) no interior do tecido e na circulação sanguínea, contribuindo para a morte celular imunogênica (MCI). A infiltração de células imunológicas na região tumoral pode ser explicada pela liberação dos metabólitos celulares durante e após o processo de morte celular, estimulando uma resposta imune adaptativa. A MCI também depende de moléculas chamadas de DAMPs (*Danger-associated molecular patterns*) que irão ativar o sistema imune inato

e estimular a geração de uma imunidade tumoral específica (Gerlini; Di Gennaro; Borgognoni, 2012; Sersa, 2015; Calvet, 2014).

2.8.6. Aplicações da EQT na oncologia veterinária e humana

A aplicação da EQT em humanos tem se demonstrado eficaz para o tratamento de diferentes tumores cutâneos ou subcutâneos, incluindo sarcomas, carcinomas, mas predominantemente, melanomas cutâneos malignos. Na maioria dos casos a EQT é utilizada com intenção paliativa em lesões metastáticas que geram dor, sangramentos e desconforto ao paciente. A resposta objetiva obtida em estudos é de aproximadamente 80-85% (Sersa et al., 2006; Marty et al., 2006). Recentemente, estudos clínicos vêm sendo conduzidos em humanos com o uso da EQT no tratamento de tumores viscerais, como os colorretais, esofágicos, pancreáticos e hepáticos, apresentando bons resultados (Granata et al., 2015; Djokic et al., 2018; Egeland et al., 2018; Falk Hansen et al., 2020).

De forma similar, na medicina veterinária, a eficácia da EQT também tem sido demonstrada em diferentes estudos clínicos, com respostas objetivas acima de 80%. No entanto, sua aplicabilidade na medicina veterinária não se restringe apenas ao tratamento paliativo, mas também é considerada como tratamento adjuvante (no transcirúrgico ou pós-cirúrgico), neoadjuvante e ainda, como tratamento único. Seu uso tem possibilitado abordagens terapêuticas mais conservativas e menos invasivas, facilitando a abordagem cirúrgica de tumores de difícil ressecção, seja pelo número de lesões ou localização anatômica (Maglietti et al., 2019; Spugnini; Baldi, 2019; Rangel et al., 2019; Tozon et al., 2021).

Diferentes estudos têm comprovado a eficácia da EQT em diferentes tipos tumorais, incluindo carcinomas, mastocitomas, sarcomas, melanomas, linfomas cutâneos e tumores venéreo transmissível (Spugnini et al., 2007; Tozon et al., 2014; Lowe et al., 2016; Spugnini et al., 2019; Tellado et al., 2020).

2.8.7. EQT em tumores de bexiga

Considerando o fato de que a localização mais comum do CUT canino seja em regiões da bexiga que impossibilitem sua remoção completa, a EQT surge como uma potencial modalidade terapêutica local para os pacientes que apresentam o tumor confinado a parede vesical.

Alguns estudos *in vitro* foram realizados utilizando a EQT em cultivo celular com linhagens de células humanas de câncer de bexiga, apresentando-se eficaz na potencialização da citotoxicidade dos fármacos e na redução da viabilidade celular (Vasquez et al., 2012; Vasquez et al., 2015).

Alguns estudos *in vivo* foram conduzidos até o momento com o uso da EQT no tratamento de carcinomas uroteliais induzidos por via subcutânea em animais experimentais, demonstrando boa eficácia na remissão desses tumores (Yamaguchi et al., 1994; Ogihara et al., 2000; Kubota et al., 2000; Mitsui et al., 2002; Frandsen et al., 2015).

Em 2018, Rangel e colaboradores realizaram o primeiro relato do uso da EQT em dois cães naturalmente acometidos pelo CUT, ambos em estadiamento T2, sem invasão da serosa vesical. Os resultados clínicos obtidos foram promissores, com sobrevidas acima de 600 dias e sem a ocorrência de efeitos adversos importantes. No entanto, novos estudos ainda são necessários para avaliar a viabilidade do uso da técnica em bexiga, assim como determinar critérios de segurança para a sua aplicação.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo primário a avaliar a segurança e viabilidade da EQT como tratamento local do CUT vesical canino. Assim como, determinar critérios de segurança na seleção de pacientes, possíveis efeitos adversos decorrentes da terapia, e o número e intervalo entre as sessões de EQT. E, por fim, avaliar de forma preliminar a eficiência da técnica sobre essa neoplasia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção de Animais

O presente estudo selecionou de forma retrospectiva 21 cães diagnosticados com CUT vesical, atendidos durante o período de Abril de 2016 a Março de 2021, no centro oncológico Vet Câncer Oncologia e Patologia Animal - São Paulo, SP, Brasil.

A EQT foi oferecida como uma alternativa terapêutica quando os tutores recusaram outros tratamentos convencionais oferecidos, como a cirurgia e/ou quimioterapia. Os tutores que concordaram que seus animais recebessem o tratamento assinaram um termo de consentimento informativo. O termo descreveu como o tratamento seria conduzido e os possíveis efeitos colaterais a serem observados, baseados em dados de estudos preliminares. Os tutores foram livres para a qualquer momento desistir do tratamento.

Os critérios para a inclusão dos cães nesse estudo retrospectivo foi o diagnóstico histopatológico de CUT vesical e a instituição da EQT como tratamento único. Como critérios de exclusão, foram considerados: tratamento quimioterápico prévio a EQT, em período inferior a 14 dias da primeira consulta; tratamento quimioterápico e/ou anti-inflamatório, durante ou após o protocolo de EQT (dentro do período de observação); presença de metástases a distância ao diagnóstico.

Os registros clínicos dos pacientes inclusos foram revisados detalhadamente para obtenção de dados demográficos (raça, gênero, sexo e idade), assim como informações sobre estadiamento clínico, protocolo de tratamento utilizado, monitoração completa pós-EQT e avaliação de toxicidade e de resposta. Os pacientes foram inclusos no estudo até Março de 2021, e os registros clínicos atualizados foram obtidos até Março de 2022, marcando o fim do período da análise retrospectiva dos dados.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/FCAV), Jaboticabal/SP.

4.2. Estadiamento clínico

As informações completas acerca do estadiamento foram obtidas a partir dos registros clínicos de cada paciente e incluíram dados da anamnese, sinais clínicos, exames laboratoriais (hemograma completo e testes bioquímicos), ultrassonografia abdominal, radiografia torácica em 3 projeções (latero-lateral direita e esquerda e ventro-dorsal) e tomografia computadorizada. Todos os pacientes desse estudo possuíam diagnóstico histopatológico de CUT vesical, e os laudos histopatológicos também foram revisados para coleta de informações acerca da classificação do grau de invasão tumoral e estágio T.

4.3. Protocolo de tratamento

O protocolo de tratamento e diagnóstico foi padronizado para todos os pacientes, incluindo a técnica cirúrgica, avaliação histopatológica transoperatória, assim também como a técnica de aplicação da EQT e monitoramento subsequente. Tais procedimentos foram realizados sempre pela mesma equipe veterinária, utilizando os mesmos materiais e aparelhos.

O procedimento cirúrgico e de EQT foi realizado com os cães sob anestesia geral. Para a pré-anestesia, indução e manutenção anestésica, foram utilizadas a metadona (0.3 mg/kg, IM), propofol (5 mg/kg, IV) e isoflurano, respectivamente.

4.3.1. Acesso cirúrgico e avaliação histopatológica transoperatória

O acesso cirúrgico foi realizado através da técnica de cistotomia por celiotomia, adotando-se alguns critérios de segurança, a fim de evitar a disseminação de células tumorais na cavidade abdominal, que incluíram: 1) manipulação cuidadosa da bexiga; 2) troca de instrumentais e luvas após contato com o tumor; 3) em caso de eversão vesical, foi evitado o contato com a gordura perivascular e com qualquer outra estrutura externa à parede interna da bexiga.

Após a cistotomia e visualização do tumor, foram coletadas biópsias incisionais para diagnóstico definitivo, avaliação de acometimento da camada serosa e classificação do estágio T (T1, T2 ou T3), através da avaliação histopatológica

transoperatória por congelação, realizada sempre pelo mesmo patologista no interior do centro cirúrgico.

A avaliação histopatológica transoperatória utilizou a técnica de histopatologia por congelação, compreendendo as etapas de análise macroscópica da amostra, clivagem, congelação com CO₂ comprimido e realização de cortes de aproximadamente 5 micrômetros de espessura em micrótomo de congelação portátil (Leica) (Figura 2). Em seguida, os cortes foram corados com azul de toluidina e analisados ao microscópio de luz (Nikon YS2).

Os animais que tiveram a serosa acometida por células neoplásicas não receberam a EQT, sendo os mesmos excluídos do estudo (Figura 3A). A Figura 3B ilustra um corte histológico de um dos pacientes do estudo em que as células tumorais estavam confinadas na camada muscular, sem acometimento de serosa.

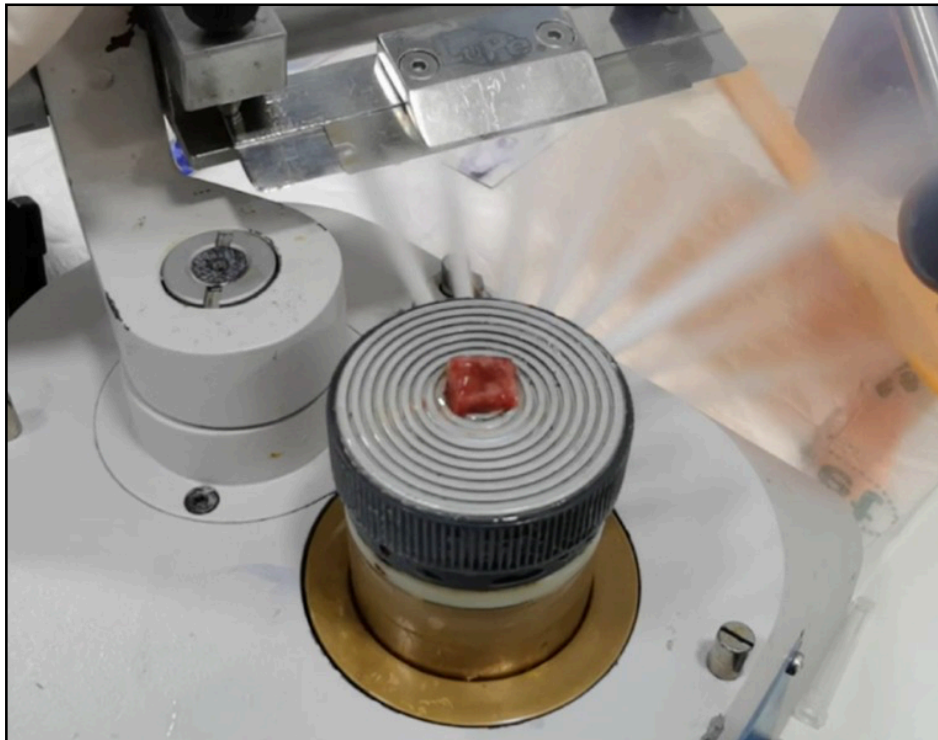


Figura 2. Processamento de amostra tumoral para análise histopatológica: etapa de congelação com liberação de CO₂. Fonte: VC Lab Pat, SP, Brasil.

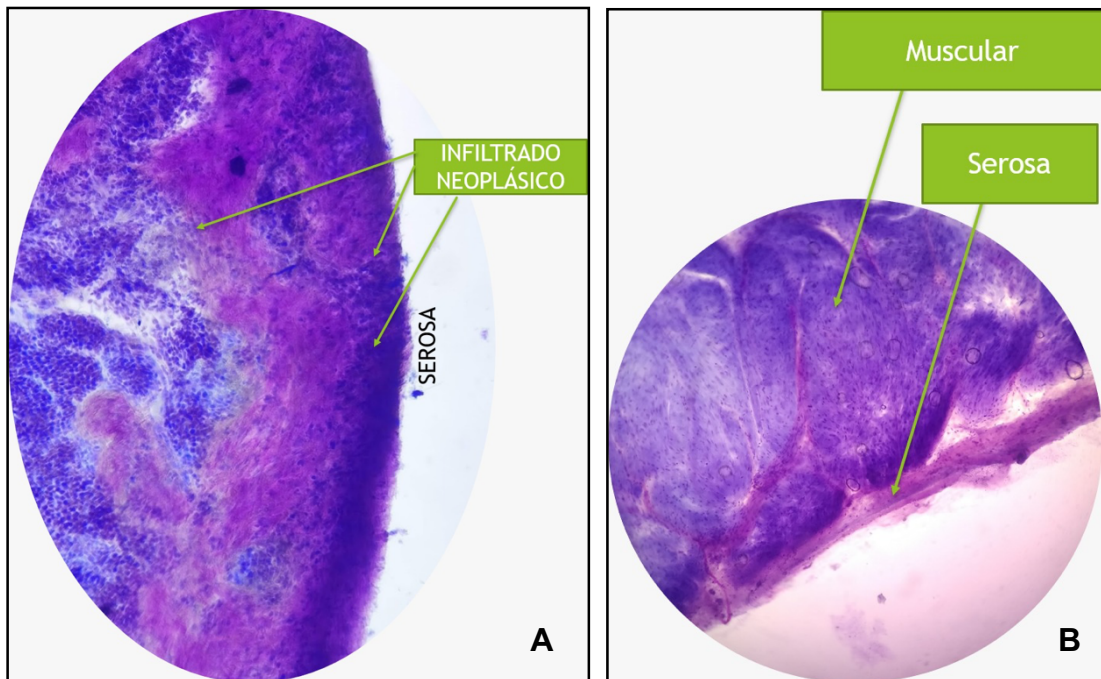


Figura 3. Análises microscópicas realizadas no transoperatório. A) Invasão de células neoplásicas em serosa. B) Invasão de células neoplásicas até camada muscular, com serosa livre. Fonte: VC Lab Pat, SP, Brasil.

4.3.2. Protocolo de EQT

Os pacientes que tiveram confirmado o diagnóstico de CUT e que foram classificados em estágio T1 ou T2, sem acometimento de serosa, receberam o tratamento com a EQT.

O quimioterápico empregado foi a BLM (3000 UI/mL) na dose de 15000 UI/m², pela via intravenosa. Após 8 minutos da aplicação do fármaco, os pulsos elétricos foram aplicados por toda a extensão tumoral assim como por toda a parede interna da bexiga aparentemente saudável (Figura 4).

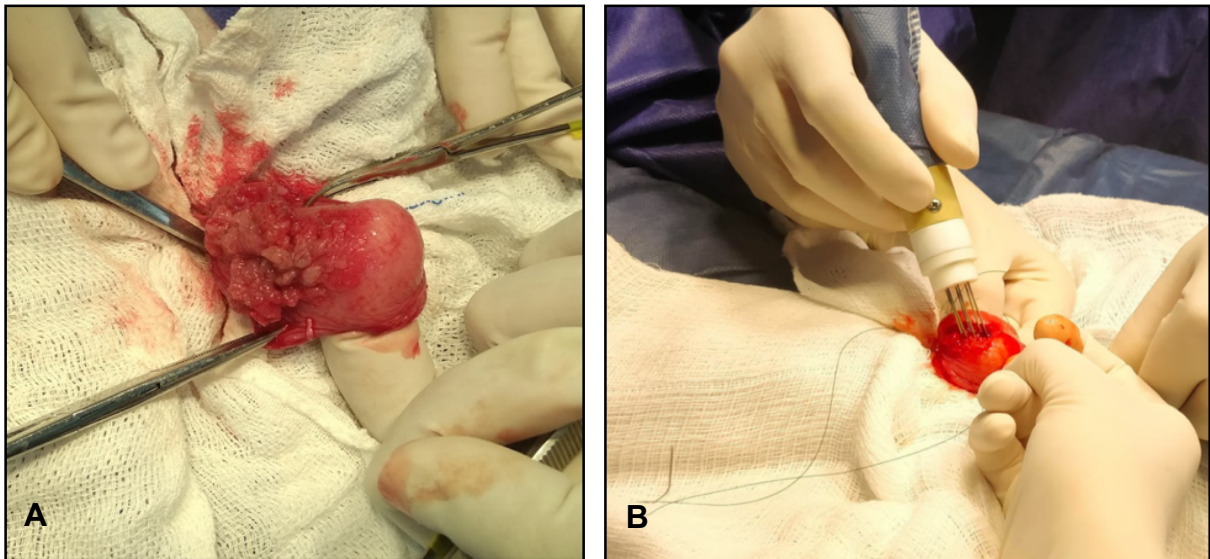


Figura 4. A) Exposição do tumor após cistotomia; B) Aplicação da EQT após avaliação histopatológica transoperatória. Fonte: Vet Câncer, SP, Brasil.

O protocolo de eletropermeabilização instituído consistiu na aplicação de oito pulsos elétricos, com tensão de 1000 V/cm, duração de 100 μ s e frequência de 5 KHz. Os pulsos foram aplicados preferencialmente dentro de 28 minutos a partir da administração da BLM, segundo recomendações do SOP “Operating Procedures of the Electrochemotherapy for Treatment of Tumor in Dogs and Cats” (Tozon et al., 2016). O número de disparos aplicados variou de acordo com o tamanho do tumor, de forma que os pulsos elétricos abrangessem a totalidade da área tumoral e da parede vesical aparentemente sem lesões.

O aparelho gerador de pulsos utilizado foi o VETCP 125® (VET CÂNCER/IMPLASTIC, São Paulo, SP – Brasil) (Figura 5), o qual é composto por duas sequências de três agulhas (1,1 mm de espessura cada) de aço inoxidável equidistantes por 5 mm e com distância de 3 mm entre as agulhas ipsilaterais (Figura 6).



Figura 5. Aparelho gerador de pulsos VETCP 125® (VET CÂNCER/IMPLASTIC, São Paulo, SP, Brasil).

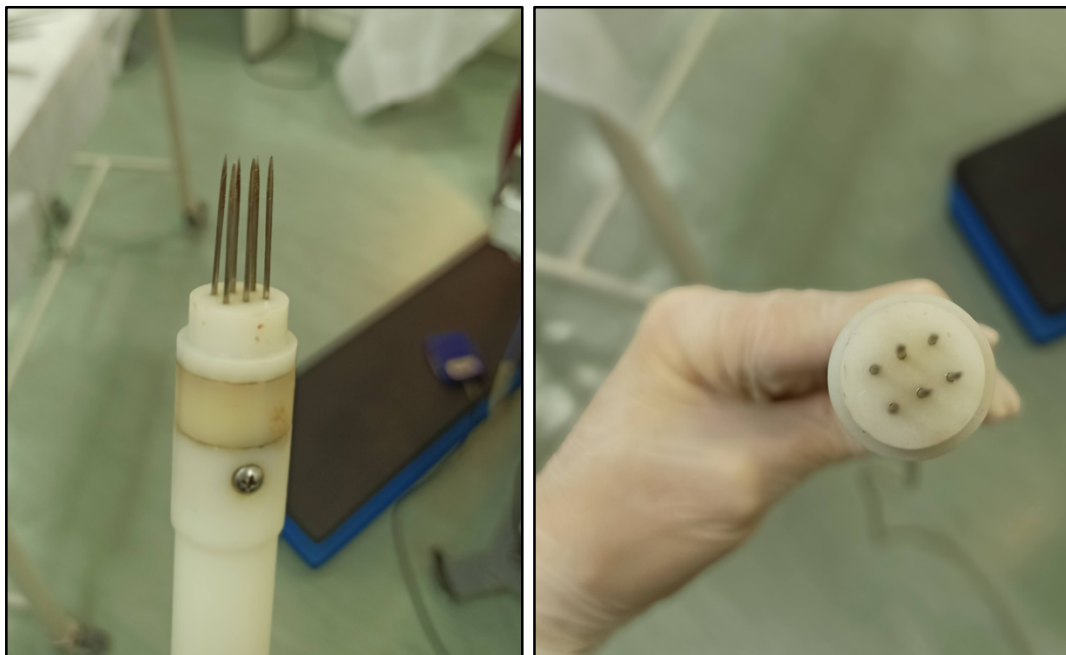


Figura 6. Eletrodo VETCP 125® (VET CÂNCER/IMPLASTIC, São Paulo, SP, Brasil).

4.4. Monitoração e Avaliação de Resposta

A monitoração pós-operatória assim como o método de avaliação da eficácia do tratamento foi realizada da mesma maneira para todos os animais do estudo. Após o término do procedimento, os pacientes permaneceram internados com sonda uretral por no mínimo 48 horas, para serem monitorados quanto aos possíveis efeitos colaterais anestésicos, débito urinário e controle de dor.

Após esse período, receberam alta médica e foram examinados nos dias 7, 14, 21 e 30 do pós-cirúrgico, e depois, a cada 30 dias durante o período de tratamento. Em cada retorno foram realizados os seguintes exames: 1) exame físico completo; 2) exames hematológicos (hemograma, creatinina, uréia, ALT e FA) e 3) ultrassonografia abdominal. As radiografias torácicas foram realizadas a cada 3 meses a fim de monitorar a possível disseminação metastática para os pulmões.

A resposta local ao tratamento e a necessidade de sessões adicionais foram determinadas através do resultado do exame de ultrassonografia abdominal, realizada a cada retorno. Foi padronizado que a ultrassonografia abdominal fosse realizada sempre pelo o mesmo ultrassonografista, com o animal na mesma posição de decúbito, utilizando o mesmo equipamento e com a bexiga sempre repleta, seguindo as recomendações de Fulkerson e Knapp (2015).

A resposta a terapia foi determinada após 30 dias de cada sessão de EQT e no fim do período de tratamento, sendo classificada de acordo com o “Response Evaluation Criteria in Solid Tumors” (RECIST) (Eisenhauer et al., 2009) em: resposta completa (RC), quando houve o total desaparecimento da lesão, resposta parcial (RP), quando houve a redução da lesão em mais de 30%, doença estável (DE), quando a lesão não aumentou em mais de 20% e nem diminuiu em mais de 30%, e por fim, doença progressiva (DP), quando houve o aumento da lesão em mais de 20%. A partir destes dados, foi determinada a necessidade de novas sessões de EQT. A avaliação da eficiência antitumoral da EQT também foi determinada com base no monitoramento da ocorrência de metástases e de doença progressiva.

O período de tratamento foi individualizado para cada paciente e determinado como o período entre a primeira e última sessão de EQT realizada. Após o fim do período de tratamento os animais foram acompanhados em retornos a cada 60 dias

nos 6 primeiros meses, e a cada 90 dias até completar 12 meses pós-tratamento, sendo este período definido como o período de observação. Após esse período, os animais eram acompanhados de forma remota e, quando necessitassem de reavaliações, de forma presencial.

Novas sessões de EQT foram instituídas quando houve a identificação de evidência macroscópica do tumor durante a ultrassonografia abdominal, no mínimo 30 dias após o procedimento de EQT prévio. Nos pacientes em que foi identificada a remissão completa do tumor através da ultrassonografia abdominal, um novo procedimento cirúrgico também era solicitado para a confirmação da ausência de doença microscópica residual através da avaliação histológica transoperatória. Nos casos em que ainda houvesse a presença de células tumorais, uma nova sessão de EQT foi instituída.

O tempo de sobrevida foi determinado como o período entre o diagnóstico até o óbito do paciente ou fim do período do estudo. A duração da resposta, ou tempo livre de progressão, foi calculada para todos os pacientes do estudo que obtiveram RC, RP ou DE, consistindo no período entre a obtenção da resposta até a recidiva tumoral, progressão tumoral ou óbito. Os pacientes que atingissem DP dentro do período de tratamento seriam direcionados para outras terapias.

4.5. Avaliação de Toxicidade e de Eventos Adversos

Todos os eventos que ocorreram durante o ensaio clínico, ou dentro dos 30 dias subsequentes, e que estivessem relacionados com o tratamento ou não, foram considerados eventos adversos e documentados nos registros clínicos a cada retorno.

A partir da análise desses registros, esses eventos adversos foram graduados de acordo com os critérios clássicos de toxicidade clínica definidos pela escala de toxicidade do “Veterinary Cooperative Oncology Group” (VCOG, 2011), em: 1) Leve; 2) Moderado; 3) Complicação difícil que requer tratamento e cuidados veterinários; 4) Estado de risco de vida que requer assistência veterinária imediata e 5) Óbito.

4.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico SPSS Statistics 25 (IBM®, Nova Iorque, Estados Unidos) e para todos os testes realizados utilizou-se intervalo de confiança de 95% ($P \leq 0.05$). Os resultados referentes a raça, sexo, idade, status reprodutivo, peso, TNM, escore VCOG, causa do óbito e recidiva foram apresentados de forma descritiva e, quando aplicável, com média e desvio padrão. As variáveis de tempo de sobrevida e duração da resposta ao tratamento foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, após isso, realizou-se teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes para verificar se havia diferença entre estas variáveis em relação ao número de sessões de EQT, assim como para verificar diferenças entre os tempos de sobrevida e duração da resposta geral nos pacientes com resposta completa que apresentaram recidiva. Foi realizado teste U de Mann-Whitney para verificar se houve diferença nos tempos de sobrevida e duração de resposta geral em relação ao tipo de resposta (parcial ou completa). Ainda, foi realizada curva de Kaplan-Méier para verificar se houve diferença nos tempos de sobrevida e duração da resposta ao tratamento nos diferentes grupos (número de sessões), considerando óbito como evento, além de serem determinadas as médias e desvios padrões para todos os tempos avaliados.

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos

Dos 21 cães selecionados no estudo, 38,1% ($n=8$) eram machos, com idade média de $11 \pm 2,93$ anos e $8,65 \pm 3,97$ kg de peso corporal, todos estes apresentaram um TNM = T2 (Tabela 5). Os 13 animais restantes eram fêmeas, com idade média de $11,69 \pm 2,02$ anos e um peso corporal de $8,89 \pm 6,65$ kg, sendo que duas destas apresentam TNM = T1, e as 11 restantes TNM = T2. Apenas um macho estava inteiro, o restante dos machos e todas as fêmeas eram castrados.

Tabela 5. Média e desvio padrão da idade, peso e escore VCOG, dos animais utilizados no estudo, em função do sexo.

Sexo	n	%	Idade (anos)	Peso (kg)	TNM T1	TNM T2
Macho	8	38,1	11,00 ± 2,93	8,65 ± 3,97	0	8
Fêmea	13	61,9	11,69 ± 2,02	8,89 ± 6,65	2	11
Total	21	100	11,42 ± 2,36	8,80 ± 5,66	2	19

As raças mais acometidas neste estudo foram Shih-tzu (19%; n=4) e Poodle (19%; n=4), seguidos pela raça Lhasa Apso (14,2%; n=3). Os demais cães pertenciam às seguintes raças: Maltês, Daschound, Pug, Schnauzer, Yorkshire, Labrador, Buldogue Francês e Sem Raça Definida (SRD) (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição racial (%) dos animais utilizados no estudo

Raça	n	%
Shih-tzu	4	19%
Poodle	4	19%
Lhasa Apso	3	14,2%
Maltes	2	9,5%
Daschound	2	9,5%
Pug	1	4,7%
Schnauzer	1	4,7%
Yorkshire	1	4,7%
Labrador	1	4,7%
Buldogue Frances	1	4,7%
SRD	1	4,7%
Total	21	

5.2. Avaliação de segurança

No que se refere as complicações e efeitos adversos, nenhum paciente veio a óbito durante o procedimento de EQT ou no pós-operatório imediato, assim como nenhum paciente apresentou deiscência de sutura ou desenvolvimento de uroperitônio. Dos 21 pacientes, 19 (90,4%) apresentaram efeitos adversos leves

(VCOG=1) durante o pós-operatório (Tabela 7), que foram similares aos sinais clínicos que já haviam sido manifestados na apresentação inicial, incluindo polaciúria, estrangúria e disúria. No entanto, um efeito adverso observado em todos os pacientes no pós-operatório, que não havia ocorrido previamente, foi a incontinência urinária transitória, com duração variando de 7 a 86 dias.

Dois pacientes (9,5%; 2/21) apresentaram complicações em que foi necessário tratamento veterinário (VCOG = 3). Esses pacientes desenvolveram estenose de ureter 69 e 73 dias após o procedimento e, portanto, foram submetidos imediatamente a um procedimento cirúrgico de anaplastia uretral com colocação de cateter “duplo J”, o qual permaneceu nos pacientes por um determinado número de dias. Os pacientes toleraram bem essa intervenção, não havendo comprometimento na qualidade de vida, segundo a percepção dos tutores e as avaliações clínicas subsequentes.

5.3. Causas de óbito

Nesse estudo, dois pacientes vieram a óbito decorrente da progressão do CUT, um deles devido a doença metastática pulmonar, sendo o único do estudo a desenvolver metástases, e o outro, devido a progressão tumoral local, que ocorreu após o período de observação. Os demais pacientes (n=19) vieram a óbito por causas não relacionadas ao tumor ou a terapia instituída (Tabela 7).

No final do período do estudo, dois cães continuaram vivos, um em RC e outro com recidiva após ter sido classificado como RC, com TMS de 499 e 571 dias e tendo recebido uma e três sessões de EQT, respectivamente. Dos 19 animais que vieram a óbito, seis (31,5%) vieram a óbito sem evidência tumoral (em RC), 10 (52,6%) vieram a óbito com a presença do tumor (em RP ou recidiva após RC) e 3/19 (15,7%) vieram a óbito antes da determinação da resposta (NA) (Tabela 7).

5.4. Número e intervalo entre sessões

Dos 21 cães do estudo, 12 (57,1%) receberam uma sessão (grupo 1S), e seis (28,5%) e três (14,2%) receberam duas e três sessões, respectivamente (grupos 2S e 3S). O intervalo entre as sessões variou de 33 a 70 dias, com média e desvio padrão

de intervalo entre a primeira e segunda sessão de 52 dias (\pm 15,9 dias) e entre a segunda e terceira sessão de 45 (\pm 13,6 dias).

5.5. Avaliação de resposta

A monitoração da resposta a terapia foi instituída para todos os pacientes através da avaliação ultrassonográfica abdominal a cada retorno. Além da ultrassonografia, a tomografia computadorizada da região abdominal foi realizada em 28,5% dos pacientes (6/21). A Figura 7 demonstra a monitoração ultrassonográfica realizada em um paciente do estudo que obteve RC após a primeira sessão, e manteve essa resposta até vir a óbito por outra causa.

De forma geral, 13 cães (61,9%) obtiveram RC, e cinco (23,8%) obtiveram RP. Os três pacientes restantes (14,3%) não tiveram a resposta avaliada (NA), uma vez que vieram a óbito antes do tempo determinado para avaliação da resposta, por motivos não relacionados ao tumor (Tabela 7). A taxa de resposta global ao tratamento na população estudada foi de 100%. Nenhum animal do estudo foi classificado com DE ou DP dentro do período de observação.

Com relação ao número de sessões, dos nove animais avaliados no grupo 1S, dois (22,22%) apresentaram RP e sete (77,78%), RC. Dos seis animais avaliados do grupo 2S, 50% apresentaram RP e 50% RC, e dos três cães do grupo 3S, todos apresentaram RC.

Dentre os 13 animais que obtiveram RC no estudo, 10 atingiram na primeira sessão, dois na segunda sessão e apenas um necessitou de três sessões para atingir a RC. O procedimento adicional foi realizado em 38,4% (5/13) dos animais com RC, sendo três pertencentes ao grupo 2S (RC atingida na primeira sessão) e dois do grupo de 3S (RC atingida na segunda sessão). Todos os animais que passaram por esse procedimento adicional receberam também, no mesmo tempo cirúrgico, mais uma sessão de EQT devido a identificação de doença microscópica residual.

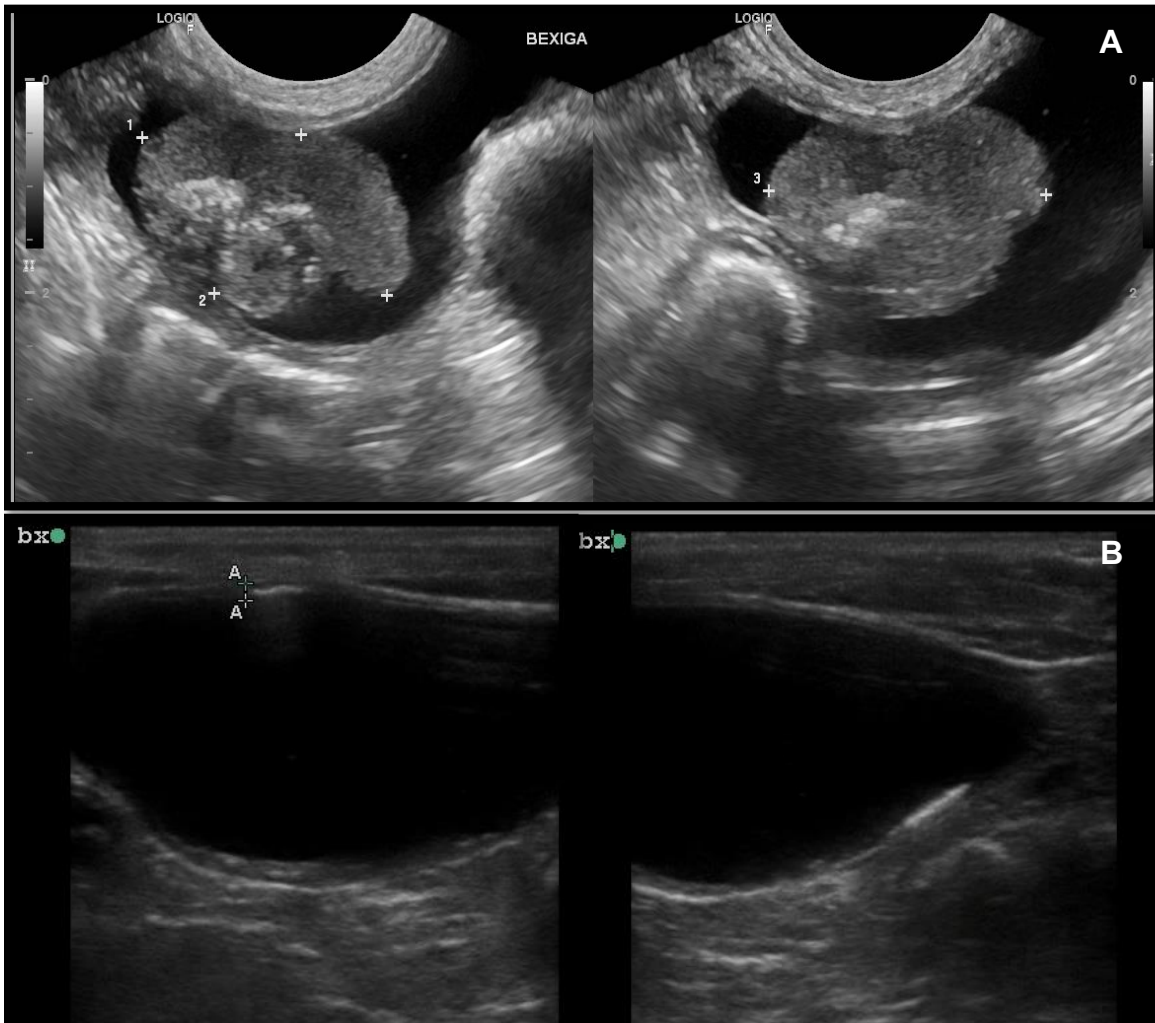


Figura 7. Resposta completa obtida após uma sessão de EQT. Figura A) Tumor em parede vesical antes da primeira sessão; Figura B) Avaliação de monitoramento, animal em RC, sem recidiva, há 17 meses após a primeira sessão.

Tabela 7. Informações descritivas gerais sobre as características tumorais, tratamento, dados de sobrevivência e óbito, para cada paciente.

N	Localização tumoral	Estádio T	Número de sessões EQT	Resposta	Recidiva	VCOG	DMR*	TMS*	Causa do óbito
1	Crânio-dorsal	T1	1	RP	-	1	517	517	CUT (progressão local)
2	Trígono	T2	3	RC	Sim	1	790	866	Outro tumor
3	Ápice	T2	1	RC	Não	1	30	30	Úlcera perfurada
4	Crânio-dorsal	T2	1	RC	Não	1	147	147	Peliose hepática
5	Trígono	T2	3	RC	Não	1	981	1021	DRC
6	Ápice	T2	1	RC	Sim	1	353	740	Outro tumor
7	Trígono	T2	2	RC	Não	1	199	199	Outro tumor
8	Trígono	T2	1	RC	Não	1	166	166	CUT (metástase)
9	Trígono	T2	2	RC	Sim	1	257	595	DRC
10	Trígono	T2	1	RC	Não	1	978	978	Outro tumor
11	Trígono	T2	2	RC	Sim	1	244	1015	DRC
12	Trígono	T2	1	NA	-	1	-	20	DRC
13	Trígono	T2	1	NA	-	1	-	7	Tromboembolismo pulmonar
14	Trígono	T2	2	RP	-	1	283	283	Hemoparasitose
15	Trígono	T1	1	RC	Não	1	495	515	Cardiopatía
16	Trígono	T2	2	RP	-	1	284	284	Sepse
17	Trígono	T2	2	RP	-	3	168	168	Sepse
18	Trígono	T2	1	RP	-	1	155	155	Outro tumor
19	Trígono	T2	1	RC	Não	1	499	499	Vivo
20	Crânio-dorsal	T2	3	RC	Sim	3	130	571	Vivo
21	Trígono	T2	1	NA	-	1	-	34	Hemoparasitose

* Dias; RP: N: Paciente número; Resposta parcial; RC: Resposta completa; NA: Não avaliada; TMS: Tempo médio de sobrevida; DMR: Duração média de resposta; CUT: Carcinoma urotelial; DRC: Doença renal crônica.

5.6. Avaliação preliminar da eficiência

Para os 21 cães inclusos nesse estudo, o tempo médio de sobrevida (TMS) foi de 419 dias \pm 346,16 dias (variando de 7 a 1021 dias) e a duração média de resposta (DMR) foi de 370 dias \pm 278,68 dias (variando de 30 a 981 dias).

Para a avaliação da influência do tipo de resposta sobre as variáveis de sobrevida e duração de resposta, o TMS e a DMR foram calculados para os grupos RC e RP e comparados entre si (Tabela 8). De acordo com a análise U de Mann-Whitney, o tipo de resposta não influenciou o TMS nem a DMR dos pacientes ($P=0,208$ e $P=0,924$, respectivamente).

Tabela 8. Média e desvio padrão da média dos dias de sobrevida em função do tipo de resposta.

TEMPO (dias)	RC (n=13)	RP (n=5)	p-valor ³
Tempo médio de sobrevida (TMS) ¹	564,77 \pm 349,3 (30-1021) ^{1,2}	281,4 \pm 145,22 (155-517) ^{1,2}	0.208
Duração média de resposta (DMR) ¹	405,31 \pm 323,8 (30-981) ^{1,2}	281,4 \pm 145,22 (155-517) ^{1,2}	0.924

¹ dias; ² intervalo de variação; ³ avaliados entre os grupos resposta parcial e resposta completa utilizando o teste de Mann-Whitney.

De forma geral, a taxa de recidiva para os cães que obtiveram RC foi de 38,4% (5/13). Para analisar se a ocorrência de recidiva exerceu influência sobre o tempo de sobrevida e duração de resposta, o TMS e DMR foram calculados para os cães com RC que apresentaram a recidiva e para aqueles que não a apresentaram (Tabela 9).

De acordo com a análise comparativa de Kruskal-Wallis, os animais que apresentaram recidiva tumoral atingiram uma TMS significativamente superior que aqueles que não apresentaram recidiva ($P=0,016$). No entanto, não houve diferença significativa entre esses grupos ao analisar a DMR ($P=0,983$) (Tabela 9).

Com relação ao número de sessões, dentre os pacientes com recidiva, um pertencia ao grupo 1S, dois ao grupo 2S e dois ao grupo 3S, e um deles ainda permanece vivo, com sobrevida de 571 dias (grupo 3S). Já os cães que não

apresentaram recidiva, seis pertenciam ao grupo 1S, um ao grupo 2S e um ao grupo 3S. Destes, um animal continua vivo (grupo 1S).

Tabela 9. Média e desvio padrão do TMS e DMR em função da ocorrência de recidiva para os animais que atingiram RC.

TEMPO (dias)	RC com recidiva (n=5)	RC sem recidiva (n=8)	p-valor³
Tempo médio de sobrevida (TMS)¹	757,4 ± 186,79 (571-1015) ^{1,2}	477,22 ± 382,30 (30-1021) ^{1,2}	0.016
Duração média de resposta (DMR)¹	354,8 ± 255,82 (130-790) ^{1,2}	436,88 ± 373,37 (30-981) ^{1,2}	0.983

¹ dias; ² intervalo de variação; ³ avaliados entre os grupos resposta parcial e resposta completa utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

Ainda, o TMS e a DMR foram comparados entre os grupos 1S, 2S e 3S, para a avaliação da influência do número de sessões sobre o tempo de sobrevida e controle local da doença (Tabela 10). Essas variáveis não apresentaram diferença significativa entre os grupos (P=0,645 e P=0,052, respectivamente).

Tabela 10. Média e desvio padrão da DMR e TMS em pacientes com carcinoma vesical submetidos a uma (1S), duas (2S) ou três (3S) sessões de eletroquimioterapia.

	Número de sessões			p-valor³
	1S (n=12)	2S (n=4)	3S (n=5)	
Duração média de resposta (DMR)¹	371,11 ± 290,9 (30-978) ^{1,2}	239,17 ± 46,8 (168-284) ^{1,2}	633,67 ± 446,52 (130-981) ^{1,2}	0,645
Tempo médio de sobrevida (TMS)¹	317,33 ± 323,74 (7-978) ^{1,2}	424 ± 326,85 (168-1015) ^{1,2}	819,33 ± 228,6 (571-1021) ^{1,2}	0,052

¹ dias; ² intervalo de variação; ³ comparados entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

O TMS e a DMR também foram comparados entre os três grupos de acordo com o número de sessões através do método de análise de sobrevivência de

Kaplan-Méier, não revelando diferença significativa entre os grupos, para ambas as análises ($P=0,062$ e $P=0,069$, respectivamente) (Figuras 8 e 9).

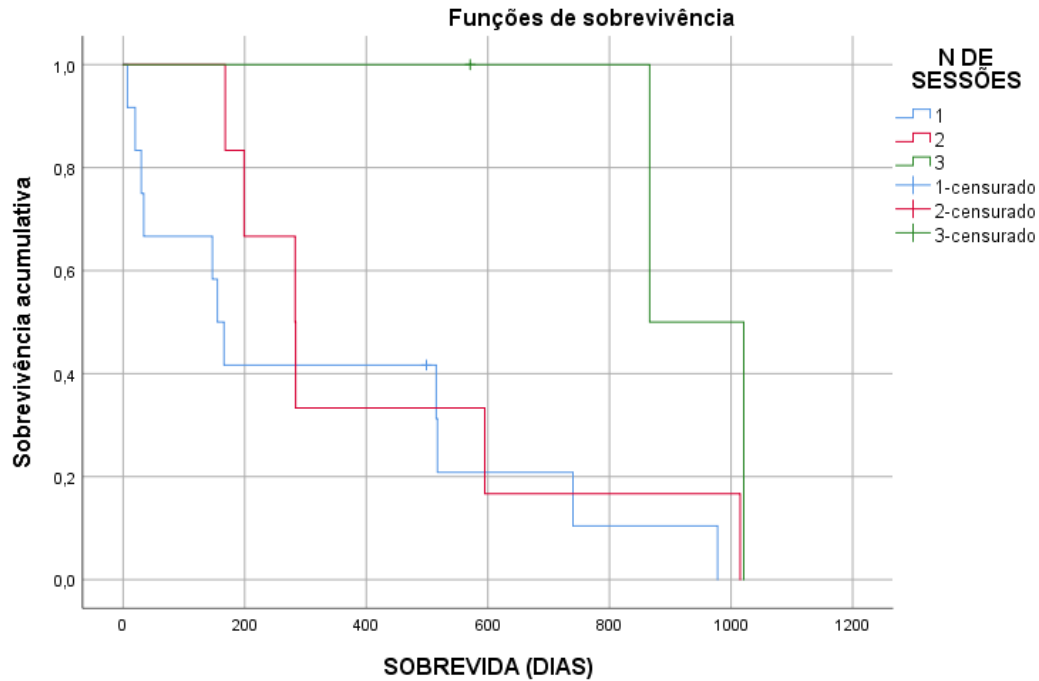


Figura 8. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ($p < 0,05$) para tempo de sobrevida segundo o número de sessões. 1S = uma única sessão ($n=12$); 2S duas sessões ($n=6$); 3S = três sessões ($n=3$); ($P = 0,062$). Pacientes vivos ao final do estudo foram censurad

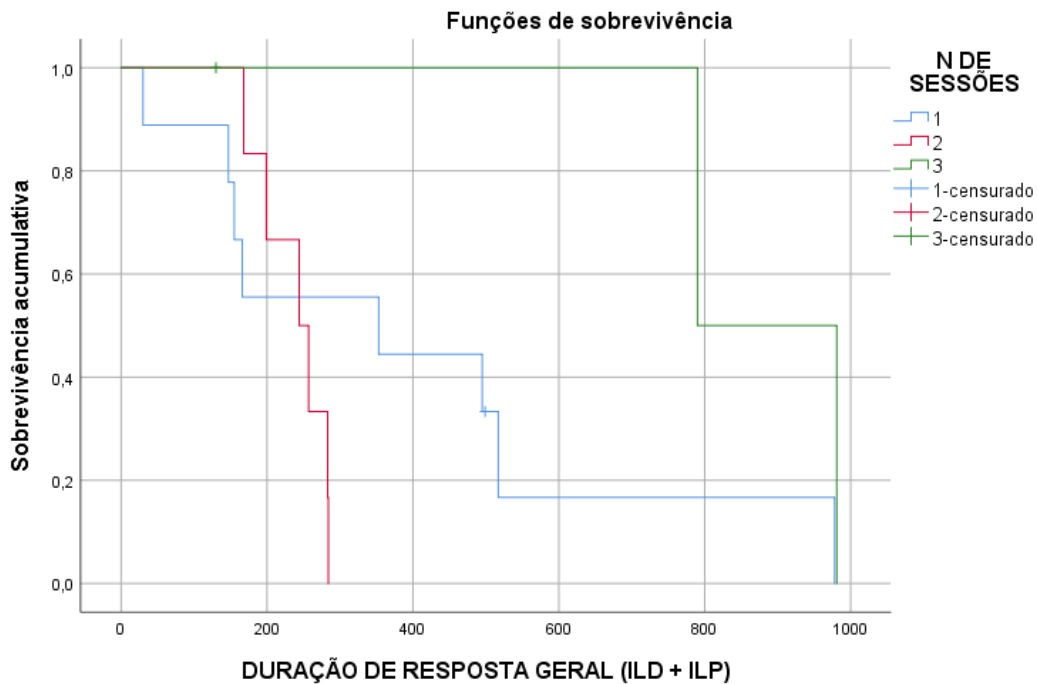


Figura 9. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ($p < 0,05$) para tempo de duração de resposta segundo o número de sessões. 1S = uma única sessão ($n=12$); 2S duas sessões ($n=5$); 3S = três sessões ($n=3$) ($P = 0,069$). Pacientes vivos ao final do estudo foram censurados.

6. DISCUSSÃO

O CUT representa a neoplasia maligna vesical mais comumente diagnosticada na espécie canina, surgindo com maior frequência em região de trígono. O tratamento cirúrgico é considerado a terapia local de eleição, no entanto, a impossibilidade de preservação da região trigonal limita sua aplicação, tornando-a pouco viável na maioria dos casos. Dessa forma, a terapia medicamentosa, com o uso de quimioterápicos e AINEs, representa a modalidade terapêutica mais utilizada nesses pacientes, mesmo que proporcionando o controle da doença por um limitado período de tempo. Assim, novas abordagens terapêuticas são necessárias para um controle local mais eficaz e duradouro do CUT vesical (Fulkerson e Knapp, 2020; Knapp et al., 2020).

Nesse contexto, a EQT se apresenta como uma alternativa de tratamento ablativo local, com as vantagens de possuir baixo custo e ser uma terapia seletiva,

que permite a conservação de estruturas anatômicas importantes, principalmente quando os tumores estão em sítios de difícil ressecção cirúrgica. Nos últimos anos, diversos estudos clínicos foram publicados demonstrando a efetividade da EQT em diferentes tipos tumorais, tanto em humanos, quanto em animais (Plaschke et al., 2016; Maglietti et al., 2017; Gehl et al., 2018; Spugnini et al., 2019; Tellado et al., 2020; Simcic et al., 2021).

Nesse contexto, a EQT tem demonstrado resultados promissores em diferentes tipos de carcinomas em cães, incluindo os carcinomas de células escamosas, carcinomas de sacos anais e carcinomas nasais (Spugnini et al., 2008; Maglietti et al., 2017; Spugnini et al., 2019; Simcic et al., 2021). A EQT também demonstrou ser segura em estudos preliminares com carcinomas pancreáticos e hepatocelulares em humanos, representando uma possibilidade viável para o tratamento de tumores viscerais (Granata et al., 2015; Djokic et al., 2018).

No entanto, até o momento, apenas dois estudos foram publicados relatando o uso da EQT em cães com CUT vesical (dois e três cães, em cada estudo), com resultados distintos entre si (Rangel et al., 2018; Dos Anjos et al., 2020). Diante disso, considerando as particularidades anatômicas da bexiga, assim como os efeitos causados pela EQT nesse órgão, são necessários estudos com uma maior amostra populacional de cães para a determinação da segurança e viabilidade da aplicação da técnica em pacientes caninos, e futuramente, possibilitar sua aplicação também em humanos.

Com base no exposto, este estudo retrospectivo avaliou, primariamente, a segurança e viabilidade do uso da EQT no tratamento do CUT vesical em um grupo de 21 cães. Além disso, também objetivou-se definir o protocolo de aplicação mais adequado e, ainda, obter informações preliminares quanto a sua eficiência sobre esses tumores.

No presente estudo, os dados demográficos relacionados a predisposição de gênero, idade ao diagnóstico e *status* reprodutivo estiveram de acordo com diferentes autores, com a maior parcela dos pacientes inclusos sendo fêmeas (61,9%), a idade média ao diagnóstico de 11 anos, para ambos os gêneros, e a maior parcela dos pacientes sendo castrados (95,2%) (Arnold et al., 2011; Knapp et al., 2014; De Brot et al., 2018; Grassinger et al., 2019).

Diversos estudos relatam que cães das raças Terrier Escocês, Terrier Branco das Terras Altas Ocidentais e Pastor Australiano possuem maior predisposição ao desenvolvimento do CUT vesical (Knapp et al., 2014; Grassinger et al., 2017; Marvel et al., 2017; De Brot et al., 2018). No entanto, cães de tais raças não foram representados neste estudo, o qual apresentou maior incidência (38%) de cães das raças Shih-tzu e Poodle. Esse fato pode estar relacionado às diferenças na distribuição racial entre a população canina dos Estados Unidos, Europa e Brasil.

Segundo Mir et al. (2006), o mecanismo de ação da EQT com a BLM leva a destruição seletiva das células tumorais eletropermeabilizadas, levando ao processo de morte tecidual e necrose tumoral. Nesse contexto, é possível assumir que a utilização da técnica em tumores vesicais que se infiltram na última camada de revestimento da bexiga, ou que já estão invadindo órgãos adjacentes (estádios T2 com invasão de serosa e T3, respectivamente), acarretaria riscos significativos de complicações severas, como o desenvolvimento de ruptura vesical e uroperitônio, considerados emergências urológicas.

Diante disso, a ausência de infiltração tumoral na camada serosa, confirmada por análise histopatológica transcirúrgica, foi padronizada como um critério de segurança na seleção de pacientes elegíveis ao tratamento no centro oncológico do qual foram obtidos os dados. Por conseguinte, todos os cães inclusos neste estudo foram diagnosticados com CUT em estágio T1 ou T2 sem invasão de serosa.

A maioria dos cães (90,4% - 19/21) foram classificados em estágio T2, e apenas 9,6% (2/21) classificados como T1, corroborando com os dados encontrados na literatura, que demonstram que os tumores T2, músculo-invasivos, representam cerca de 68-78% da casuística do CUT em cães (Knapp et al., 2014; De Brot et al., 2018).

No presente estudo, nenhum dos pacientes veio a óbito durante o procedimento ou no pós-operatório imediato, assim também como não houve a ocorrência de rompimento vesical, uroperitônio ou deiscência de sutura. De forma similar, Rangel et al. (2018) realizaram a EQT com BLM em dois cães com CUT, também adotando a ausência de infiltração tumoral em camada serosa como critério de segurança na seleção dos pacientes. Os dois animais deste estudo também não desenvolveram as complicações acima mencionadas. Tais resultados positivos, obtidos em ambos os

estudos, reforçam a importância da avaliação histopatológica da serosa como critério de segurança na seleção de pacientes.

O quimioterápico de escolha para a realização da EQT no presente estudo foi a BLM, por via intravenosa, uma vez que este fármaco possui um mecanismo de ação seletivo contra o tecido tumoral, minimizando a quantidade de tecido necrótico formado após o procedimento, e conseqüentemente, a formação de êmbolos neoplásicos que podem se deslocar e levar a obstruções das vias urinárias. Além disso, a administração intravenosa propicia uma distribuição uniforme do fármaco, permitindo o tratamento de toda a parede da bexiga, além da área tumoral, atingindo também possíveis focos microscópicos de tumor (Tounekti et al., 1993; Mir et al., 2006; Rangel et al., 2018).

Com relação aos efeitos adversos e taxas de complicações após o procedimento, mais de 90% dos pacientes deste estudo desenvolveram efeitos adversos leves (escore VCOG = 1), que consistiram em polaciúria, estrangúria e disúria, sinais similares àqueles manifestados na apresentação inicial.

O único sinal clínico apresentado por todos os pacientes, e que ainda não havia sido manifestado na apresentação inicial, foi a incontinência urinária transitória, com duração variando de 7 a 86 dias. Estes dados estão de acordo com o estudo de Rangel et al. (2018), o qual relatou efeitos adversos leves nos dois cães tratados com EQT, incluindo a incontinência urinária com duração de 56 e 76 dias. O desenvolvimento desse quadro pode ser decorrente da inflamação e edema transitórios causados pela EQT na mucosa da bexiga, levando a espasmos musculares involuntários.

Dois pacientes (9,5%) deste estudo, entretanto, desenvolveram estenose de ureter 69 e 73 dias após a segunda sessão, respectivamente, sendo classificados com escore VCOG = 3. O desenvolvimento da estenose ureteral pode ser atribuído à formação local de fibrose cicatricial, efeito esperado após a EQT devido a morte do tecido tumoral, no entanto, há um maior risco para sua ocorrência quando o tecido fibrótico formado é mais extenso.

Apesar disso, a taxa de complicação deste estudo foi bem inferior quando comparada às dos estudos que avaliam a cistectomia total ou parcial como tratamento local para o CUT canino. No estudo de Saeki et al. (2015), 70% dos cães (7/10) que passaram pela cistectomia total com desvio ureteral em prepúcio ou vagina,

apresentaram complicações importantes que incluíram deiscência de sutura da ureterostomia, azotemia, obstrução ureteral e pielonefrite.

A cistectomia parcial, apesar de ser um procedimento de menor complexidade, quando comparado a cistectomia total, ainda apresenta uma taxa de complicação considerável. No estudo Stone et al. (1996), dois dos 11 cães tratados com cistectomia parcial apresentaram deiscência de sutura e uroperitônio. De forma similar, no estudo de Marvel et al. (2017), 43% dos cães que passaram por esse procedimento (16/37) apresentaram complicações, sendo as mais graves: deiscência de sutura, uroperitônio e extensa hemorragia transoperatória.

A disseminação de células neoplásicas do CUT em parede abdominal é uma complicação passível de ocorrer decorrente da manipulação cirúrgica da bexiga acometida pelo tumor. Segundo o estudo de Higuchi et al. (2013), 75% (18/24) dos cães desenvolveram essa complicação após o procedimento de cistotomia, e apresentaram tempo médio de sobrevida de apenas 57 dias. Já no estudo Marvel et al. (2017), 10% (4/37) dos cães que passaram por cistectomia parcial apresentaram disseminação tumoral em parede abdominal. Em contrapartida, nenhum dos pacientes do presente estudo apresentou disseminação tumoral ou focos metastáticos em parede abdominal decorrentes da cistotomia e EQT. Esses resultados podem ser atribuídos aos critérios de segurança adotados durante a manipulação vesical, reforçando a ideia de que os mesmos são efetivos em minimizar os riscos de ocorrência dessa complicação.

Com relação a taxa de óbito do presente estudo, apenas 9,5% dos cães (2/21) vieram a óbito em decorrência do CUT, sendo um devido a progressão local do tumor e o outro devido ao desenvolvimento de metástase pulmonar. Essa taxa foi significativamente inferior àquela encontrada no estudo de Bradburry et al. (2021), em que 91% dos cães (43/47), tratados com cistectomia parcial e/ou quimioterapia, vieram a óbito devido a progressão da doença. No entanto, é importante considerar que no estudo supracitado foram inclusos cães em estadiamento mais avançado (T3) que foram tratados apenas com quimioterapia, o que pode também ter contribuído para essa maior taxa de progressão. No estudo de Stone et al. (1996), que também analisou a eficácia da cistectomia parcial, 45% dos cães (5/11) vieram a óbito devido

a progressão da doença. Nesse último estudo, porém, nenhum dos pacientes foi classificado em estágio T3.

No presente estudo, o cão que veio a óbito devido a progressão local da doença passou por uma sessão de EQT, com obtenção de RP e recusa dos tutores por novas sessões ou outro tipo de tratamento. Ainda assim, seu tempo de sobrevivência foi de 517 dias, considerado ainda acima da média para cães com CUT tratados com terapias medicamentosas e/ou cirúrgicas (Marconato et al., 2011; Knapp et al., 2016; Marvel et al., 2017; Bradburry et al., 2021).

Segundo Knapp et al. (2014), a taxa metastática do CUT canino é considerada baixa no momento do diagnóstico (16%), porém, essa taxa pode chegar a mais de 50% no momento do óbito, sendo os pulmões o sítio mais afetado. Em contrapartida, no presente estudo, apenas um animal desenvolveu metástases, sendo esta, em pulmões. No entanto, a avaliação torácica para o estadiamento foi realizada apenas por radiografia, sendo importante considerar que a identificação de nódulos pulmonares menores que 3 mm só é possível por meio da tomografia computadorizada de tórax (Armbrust et al., 2012).

Neste estudo, a ultrassonografia abdominal foi padronizada como o exame de imagem para monitoração da resposta à terapia para todos os pacientes. Segundo Fulkerson e Knapp (2015), a ultrassonografia é considerada o exame de imagem com melhor custo-benefício para a monitoração de resposta em pacientes com tumores vesicais submetidos a diferentes terapias, uma vez que sua realização seja sempre com o mesmo operador e o animal com a mesma repleção vesical e posição, critérios estes adotados no presente estudo.

Com relação a avaliação de resposta, a taxa de resposta objetiva deste estudo foi de 100%, com 61,9% dos cães apresentando RC e 23,8% apresentando RP. Nenhum dos cães foi classificado como DE ou DP, dentro do período de observação. Essa taxa de resposta foi consideravelmente superior àquelas dos estudos que avaliam o uso de diferentes protocolos medicamentosos (quimioterápicos e/ou AINES) como terapia única para cães com CUT, que variam de 17,6% a 39,2% (Knapp et al., 1994; Arnold et al., 2011; Marconato et al., 2011; Knapp et al., 2016; Rippi et al., 2016).

Marconato et al. (2011) utilizaram o protocolo de gencitabina com piroxicam, obtendo resposta objetiva de 27%, com 5,4% dos pacientes obtendo RC, 21,6%, RP,

51,4% DE e 21,6%, DP. De forma similar, Knapp et al. (2016) avaliou o protocolo de vimblastina associada ao piroxicam, o qual proporcionou resposta objetiva de 39,2%, no entanto nenhum animal atingiu RC. É importante ressaltar que nesses dois estudos acima descritos, houve uma taxa de ocorrência de tumores em estágio avançado (T3) de 22 a 23%, respectivamente, enquanto que no presente estudo não houve tumores nesse estadiamento. Ainda assim, é possível inferir com os resultados obtidos que a EQT ofereceu uma melhor taxa de resposta objetiva e controle da doença, quando comparados aos resultados já publicados com tratamentos medicamentosos.

Com relação a duração da resposta a terapia, o presente estudo obteve uma DMR global de 370 dias, e o tipo de resposta (RC e RP) não pareceu influenciar essa variável ($P=0,924$). Em comparação, a duração da resposta nesse estudo foi superior àquelas obtidas por Marvel et al. (2017) e Braduburry et al. (2021), que avaliaram a cistectomia parcial em cães com CUT distante do trígono e obtiveram uma duração de resposta global de 235 dias e 85 dias, respectivamente.

A DMR obtida no presente estudo também foi superior àquelas encontradas em diversos estudos publicados que avaliaram a eficácia de terapias medicamentosas, que variaram de 96 a 199 dias (Henry et al., 2003; Arnold et al., 2011; Knapp et al., 2013; Gustafson et al., 2019).

Um dos maiores desafios no tratamento do CUT vesical é a alta taxa de recidiva após a cistectomia parcial, que pode variar de 66 a 100%, mesmo quando o tumor é removido com margens histológicas completas (Stone et al., 1996; Marvel et al., 2017; Braduburry et al., 2021). Esses resultados podem ser justificados pelo “efeito de cancerização em campo”, que hipotetiza que a ação dos carcinógenos sobre o urotélio vesical ocorre de forma uniforme, levando ao desenvolvimento de múltiplos focos metastáticos microscópicos por toda a parede da bexiga (Strandgaard et al., 2020).

Em comparação, no presente estudo, dos 13 cães que atingiram RC, 5 sofreram recidiva local do tumor, configurando uma taxa de recidiva de 38,4%, consideravelmente inferior àquelas dos estudos mencionados previamente. O tempo médio para o desenvolvimento da recidiva nestes cães foi de 354 dias, sendo superior às medianas de duração de resposta obtidas nos estudos de Marvel et al. (2017) e Braduburry et al. (2021), que foram de 101 dias e 85 dias, respectivamente, para os cães que sofreram progressão ou recidiva.

A menor taxa de recidiva alcançada no presente estudo pode ser atribuída ao fato de que a toda a parede da bexiga foi tratada com a EQT, destruindo possíveis focos microscópicos de tumor ao longo do urotélio aparentemente saudável, minimizando assim, a ocorrência de novos crescimentos. E ainda, a aplicação dos pulsos elétricos por toda a parede da bexiga, também minimiza a ocorrência de implantação de células tumorais em tecido vesical saudável.

Além disso, nos dois estudos previamente mencionados (Marvel et al., 2017; Bradburry et al., 2021) a terapia medicamentosa (quimioterápicos e/ou AINEs) foi instituída após a cirurgia, o que não ocorreu no presente estudo. Esse fato indica que, mesmo sendo instituída como terapia única, a EQT promoveu um controle de recidiva e progressão da doença de forma mais eficiente que a terapia multimodal nesses estudos.

Curiosamente, segundo os resultados obtidos no presente estudo, o TMS do grupo de cães que atingiram a RC e sofreram recidiva tumoral (n=5) foi significativamente maior (P=0,016) que aqueles que atingiram RC mas não sofreram recidiva do tumor (n=8). Esse dado pode ser considerado contraditório, uma vez que a ocorrência de recidiva indica a progressão da doença. Entretanto, o TMS inferior dos cães que não sofreram recidiva pode ser atribuído ao fato de que os mesmos acabaram desenvolvendo outras comorbidades que levaram ao seu óbito antes do desenvolvimento da recidiva. Já os cães que sofreram a recidiva, teriam vivido tempo suficiente para que a mesma tenha se manifestado. Além disso, a ocorrência da recidiva não pareceu influenciar a DMR entre esses dois grupos de pacientes (P=0,983).

Com relação ao tempo de sobrevida, estudos que avaliaram a cistectomia parcial como tratamento para tumores de bexiga distantes do trígono, obtiveram uma mediana de sobrevida de 348 a 498 dias (Norris et al., 1992; Stone et al., 1996; Marvel et al., 2017; Bradubury et al., 2021). Nesses estudos a quimioterapia adjuvante e/ou AINEs foram associadas a cirurgia para a maioria dos pacientes, sendo difícil determinar se sua instituição no pós-cirúrgico proporcionou aumento na sobrevida desses animais. No entanto, é importante considerar que no estudo de Marvel et al. (2017), a mediana de sobrevida obtida para o grupo de cães tratados com cistectomia parcial associada com o piroxicam (com ou sem quimioterapia) foi significativamente

superior a sobrevida global de todos os pacientes (722 dias vs. 348 dias, respectivamente).

Ao contrário dos estudos supracitados, no presente estudo, não foi realizada terapia médica adjuvante no pós-EQT e 76,1% dos pacientes (16/21) apresentaram tumores em trígono vesical. Assim, mesmo diante do pior prognóstico associado a localização trigonal e a não associação de fármacos adjuvantes a EQT, o TMS obtido foi de 419 dias, sendo equivalente ou superior aos obtidos nos estudos previamente mencionados.

O TMS obtido neste estudo também foi superior àqueles obtidos em estudos que avaliaram o uso da quimioterapia (e/ou AINEs) como tratamento único (mediana de sobrevida variando de 108 dias a 338 dias) (Knapp et al. 1994; Henry et al., 2003; Boria et al., 2005; Marconato et al., 2011; Knapp et al., 2013; Knapp et al., 2016; Gustafson et al., 2019).

Esses resultados indicam, de forma preliminar, que a EQT demonstrou ser uma alternativa terapêutica eficiente para o tratamento de CUT localizados em sítios anatômicos desfavoráveis, possibilitando a conservação da anatomia vesical. É importante ressaltar que estudos futuros ainda são necessários para determinar se instituição da terapia medicamentosa adjuvante a EQT traria benefício no aumento da sobrevida destes animais.

Referente ao intervalo entre as sessões de EQT do presente estudo, este período variou de 33 a 70 dias, com média de intervalo entre a primeira e segunda sessão de 52 dias e entre a segunda e terceira sessão de 45 dias. Durante as avaliações foi possível determinar que os pacientes que passavam por um novo procedimento em menores intervalos de tempo (33-40 dias), possuíam maior quantidade de tecido necrótico na região tumoral. Esse fato pode ser justificado pelo mecanismo de morte celular mitótica causada pela BLM, sendo este um processo mais lento de morte celular e que depende do nível de replicação tumoral, podendo levar um maior período de tempo para se obter a resposta e recuperação do tecido local (Tounekti et al., 1993; Mir et al., 2006). A partir disso, é possível determinar que as sessões sejam realizadas, preferencialmente, com intervalos entre 45 a 60 dias.

O número de sessões de EQT realizadas nesse estudo variou de uma a três sessões (grupos 1S, 2S e 3S, respectivamente), com 57,1% dos pacientes (12/21)

pertencentes ao grupo 1S. Dentre os 13 pacientes que obtiveram RC, 10 atingiram logo na primeira sessão (76,9%), dois (15,3%) atingiram na segunda sessão, e apenas um paciente (7,6%) necessitou de três sessões para obtenção da RC. No entanto, na análise estatística comparativa, o número de sessões não pareceu influenciar nas variáveis de duração de resposta e tempo de sobrevida entre os grupos ($P > 0,05$).

Na análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, o número de sessões também não pareceu influenciar o tempo de sobrevida ($P = 0,062$) e a duração da resposta ($P = 0,069$). No entanto, esses dados devem ser interpretados com cautela, uma vez que a diferença de tamanho amostral entre os grupos 1S, 2S e 3S pode constituir um viés a essa análise.

Apesar dos dois pacientes que vieram a óbito por sofrerem progressão local e a distância do CUT pertencerem do grupo 1S, é importante considerar que nesse grupo também estava o paciente que ficou o maior período livre da doença neste estudo (978 dias em RC). Além disso, dos 7 cães com RC do grupo 1S, apenas um sofreu recidiva tumoral, enquanto que nos grupos 2S e 3S, a recidiva tumoral ocorreu em dois dos três pacientes que atingiram RC, respectivamente. Esses dados demonstram que houve uma maior proporção de recidiva nos grupos 2S e 3S, podendo ser devido ao comportamento biológico mais agressivo dos tumores nesses pacientes.

Esses resultados indicam que a EQT ofereceu um controle local e efeito antitumoral independente do número de sessões, considerando ainda que a maioria dos pacientes que atingiram RC, a obtiveram logo na primeira sessão. Essa boa resposta inicial do CUT a EQT está de acordo com diferentes trabalhos publicados que demonstram a eficiência desse tratamento sobre diversos tipos de carcinomas (Spugnini et al., 2008; Maglietti et al., 2017; Spugnini et al., 2019), que apesar de serem de diferentes origens, compartilham o mesmo tipo histológico e resposta similar a EQT.

Para os cinco cães que obtiveram RP nesse estudo (5/21; 23.8%), não foram realizadas novas sessões devido a recusa dos tutores. Destes, apenas um paciente desenvolveu progressão local após o período de observação, vindo a óbito por este motivo 517 após atingir a RP. O TMS e a DMR foram similares entre os grupos de

cães com RP e RC ($P=0,208$ e $P=0,924$, respectivamente). Ou seja, esses resultados demonstram que o controle da doença foi alcançado mesmo naqueles pacientes que ainda possuíam a doença macroscópica.

Os resultados deste estudo demonstraram que a EQT foi uma terapia segura em tumores de bexiga, com baixo índice de complicações e boa tolerabilidade, proporcionando controle local significativo da doença. Apesar de ser um estudo retrospectivo, os dados coletados foram advindos de um único centro oncológico, onde foram padronizados os critérios de seleção de pacientes, protocolo terapêutico e monitoração pós-procedimento para todos os pacientes inclusos.

No entanto, a avaliação da eficiência da técnica foi realizada de forma preliminar e a interpretação comparativa entre as variáveis de tempo de sobrevida e duração de resposta devem ser feitas com cautela, uma vez que não houve distribuição homogênea dos pacientes entre os grupos comparados de acordo com o número de sessões e com o tipo de resposta. Ainda são necessários novos estudos prospectivos com o propósito de avaliação da eficiência da EQT em tumores vesicais, utilizando um maior tamanho amostral e realizando análises comparativas entre diferentes grupos de tratamento (EQT x terapia convencional).

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo retrospectivo, é possível concluir que a EQT com BLM intravenosa demonstrou ser uma alternativa terapêutica segura e viável para pacientes com CUT vesical, quando cumpridos os critérios de segurança determinados e os protocolos de aplicação da técnica e de monitoração pós-cirúrgica.

Dessa forma, foram determinados como os principais critérios de segurança para a instituição da EQT em tumores vesicais:

- Determinação da ausência de infiltração neoplásica na camada serosa, através da avaliação histopatológica, antes da aplicação da EQT.
- Manipulação cuidadosa da bexiga durante o procedimento de cistotomia e aplicação da EQT.

- Utilização da BLM por via intravenosa no protocolo de EQT, e aplicação dos pulsos elétricos na área tumoral e em toda a parede da bexiga.
- Monitoração pós-cirúrgica intensiva nas primeiras 48 horas e, posteriormente, semanal, por meio de avaliações clínicas e ultrassonografia abdominal ou tomografia computadorizada, para a determinação da necessidade de novas sessões.
- Realização de novas sessões preferencialmente no intervalo 45-60 dias, de acordo com a resposta observada durante as monitorações periódicas por imagem.

8. REFERÊNCIAS

Abbo AH, Jones DR, Masters, AR, Stewart JC, Fourez, L, & Knapp, D W (2010) Phase I clinical trial and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C in dogs with localized transitional cell carcinoma of the urinary bladder **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 24(5), 1124-1130.

Allstadt SD, Rodriguez Jr CO, Boostrom B, Rebhun RB, Skorupski KA (2015) Randomized phase III trial of piroxicam in combination with mitoxantrone or carboplatin for first-line treatment of urogenital tract transitional cell carcinoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 29:261-267.

Anjos DS, Bueno C, Magalhães LF, Magalhães GM, Mattos-Junior E, Pinto MM, Calazans SG (2018) Electrochemotherapy with bleomycin associated with doxorubicin induces tumor regression and decreases the proliferative index in canine cutaneous squamous cell carcinomas. **BioRxiv**, 474262.

Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F (2017) Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. **European Urology** 71:96-108.

Armbrust LJ, Biller DS, Bamford A, Chun R, Garrett LD, Sanderson MW (2012) Comparison of three-view thoracic radiography and computed tomography for detection of pulmonary nodules in dogs with neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 240:1088-1094.

Arnold EJ, Childress MO, Fourez LM, Tan KM, Stewart JC, Bonney PL, Knapp DW (2011) Clinical trial of vinblastine in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 25:1385-1390.

- Autorino R, Di Lorenzo G, Damiano R, Giannarini G, De Sio M, Cheng L, Montironi R (2009) Pathology of the prostate in radical cystectomy specimens: a critical review. **Surgical Oncology** 18:73-84.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, Van Rhijn BW, Comperat E, Rouprêt M (2013) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. **European Urology** 64:639-653.
- Boria PA, Glickman NW, Schmidt BR, Widmer WR, Mutsaers AJ, Adams LG, Knapp DW (2005) Carboplatin and piroxicam therapy in 31 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Veterinary and Comparative Oncology** 3:73-80.
- Boston S, Singh A (2014) Total cystectomy for treatment of transitional cell carcinoma of the urethra and bladder trigone in a dog. **Veterinary Surgery** 43:294-300.
- Bradbury ML, Mullin CM, Gillian SD, Weisse C, Bergman PJ, Morges MA, Clifford CA (2021) Clinical outcomes of dogs with transitional cell carcinoma receiving medical therapy, with and without partial cystectomy **The Canadian Veterinary Journal: La Revue Veterinaire Canadienne** 62:133-140.
- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Lotan Y (2013) Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European Urology** 63:234-241.
- Calvet CY, Famin D, André FM, Mir LM (2014) Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. **Oncoimmunology** 3, e28131.
- Carvalho M, Brum A, Vasconcellos L (2016) **Neoplasias Do Sistema Urinário** In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodasky S, Oncologia em cães e gatos p. 386-398.
- Cemazar M, Milacic R, Miklavcic, D Dolzan V, Sersa G (1998) Intratumoral cisplatin administration in electrochemotherapy: antitumor effectiveness, sequence dependence and platinum content. **International Journal on Toxic and Non Toxic Anti Cancer Agents** 9:525-530.
- Cemazar M, Tamzali Y, Sersa G, Tozon N, Mir L M, Miklavcic D, Teissie J (2008) Electrochemotherapy in veterinary oncology **Journal of veterinary internal medicine**, 22:826-831.
- Cindrič H, Kos B, Miklavčič D (2021) Electrodes and Electric Field Distribution in Clinical Practice In: **Electroporation in Veterinary Oncology Practice**. Springer: Cham, pp. 21-59.
- Childress MO, Adams LG, Ramos-Vara JA, Freeman LJ, He S, Constable PD, Knapp DW (2011) Results of biopsy via transurethral cystoscopy and cystotomy for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and urethra in dogs: 92 cases

(2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 239:350-356.

Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL (2007) Clinical implications and utility of field cancerization. **Cancer Cell International** 7:1-12.

De Brot S, Robinson BD, Scase T, Grau-Roma L, Wilkinson E, Boorjian SA, Mongan NP (2018) The dog as an animal model for bladder and urethral urothelial carcinoma: Comparative epidemiology and histology **Oncology letters** 16:1641-1649.

Dos Anjos DS, Buosi RG, Roratto I, dos Reis Mesquita L, Matiz ORS, Fonseca-Alves CE, Spugnini EP (2020) Preliminary assessment of electrochemotherapy feasibility in dogs with vesical transitional cell carcinoma. **Veterinary Research Forum** 11:289

Eisenhauer EA, et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 11). **European journal of cancer** 45:228-47.

Escoffre JM, Rols MP (2012) Electrochemotherapy: progress and prospects Current pharmaceutical design, 183406-3415.

Frandsen SK, Gibot L, Madi M, Gehl J, Rols MP (2015) Calcium electroporation: evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. **PLoS One** 10:e0144028.

Front D, et al. (1990) Administered dose and tumor dose of bleomycin labeled with cobalt-57 in mice and men **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine** 31:1784-1790.

Fulkerson CM, Knapp DW (2020) Tumors of the urinary system In: Withrow SJ, Vail DM **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 6 ed. St Louis: Elsevier–Saunders, pp.572–582.

Fulkerson CM, Knapp DW (2015) Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: a review. **The Veterinary Journal** 205:217-225.

Gehl J, et al. (2018) Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. **Acta Oncologica**, 57:874-882.

Gerlini G, Di Gennaro P, Borgognoni L (2012) Enhancing anti-melanoma immunity by electrochemotherapy and in vivo dendritic-cell activation. **Oncoimmunology** 1:1655-1657.

Giuffrida MA, Brown DC, Ellenberg SS, Farrar JT (2018) Development and psychometric testing of the Canine Owner-Reported Quality of Life questionnaire, an instrument designed to measure quality of life in dogs with cancer. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 252:1073-1083.

Glickman LT, Schofer FS, Mckee LJ, Reif JS, Goldschmidt MH (1989) Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. **Journal of Toxicology and Environmental Health** 28:407-414.

Glickman LT, Raghavan M, Knapp DW, Bonney PL, Dawson MH (2004) Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 224:1290-1297.

Gothelf A, Mir LM, Gehl J (2003) Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer Treatment Reviews** 29:371-387

Grassinger JM, Merz S, Aupperle-Lellbach H, Erhard H, Klopffleisch R (2019) Correlation of BRAF variant V595E, breed, histological grade and cyclooxygenase-2 expression in canine transitional cell carcinomas. **Veterinary Sciences** 6:31.

Greene SN, Lucroy MD, Greenberg CB, Bonney PL, Knapp DW (2007) Evaluation of cisplatin administered with piroxicam in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 231:1056-1060.

Gustafson T L, Biller B (2019) Use of toceranib phosphate in the treatment of canine bladder tumors: 37 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association** 55:243-248.

Hahn NM, Bonney PL, Dhawan D, Jones DR, Balch C, Guo Z, Ostrander EA (2012) Subcutaneous 5-azacitidine treatment of naturally occurring canine urothelial carcinoma: a novel epigenetic approach to human urothelial carcinoma drug development. **The Journal of Urology** 187:302-309.

Hanazono K, Fukumoto S, Endo Y, Ueno H, Kadosawa T, Uchide T (2014) Ultrasonographic findings related to prognosis in canine transitional cell carcinoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 55:79-84.

Heller DA, De Lorimier L, Fan TM (2006) An update on diagnosing and treating urinary bladder transitional cell carcinoma in dogs. **Veterinary Medicine-Bonner Springs Then Edwardsville**, 101:369.

Henry CJ, Mccaw DL, Turnquist SE, Tyler JW, Bravo L, Sheafor S, Scott MA (2003) Clinical evaluation of mitoxantrone and piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder carcinoma. **Clinical Cancer Research** 9:906-911.

Higuchi T, Burcham GN, Childress MO, Rohleder JJ, Bonney PL, Ramos-Vara JA, Knapp DW (2013) Characterization and treatment of transitional cell carcinoma of the abdominal wall in dogs: 24 cases (1985–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 242:499-506.

Honkisz SI, Naughton JF, Weng HY, Fourez LM, Knapp DW (2018) Evaluation of two-dimensional ultrasonography and computed tomography in the mapping and measuring of canine urinary bladder tumors. **The Veterinary Journal** 232:23-26.

Hume C, Seiler G, Porat-Mosenco Y, Caceres A, Shofer F, Sorenmo K (2010) Cystosonographic measurements of canine bladder tumours. **Veterinary and Comparative Oncology** 8:122-126.

Huppés R, Crivellenti LZ, De Nardi AB, Lima BR, Cintra CA, Castro JLC, Adin CA (2017) Radical cystectomy and cutaneous ureterostomy in 4 dogs with trigonal transitional cell carcinoma: description of technique and case series. **Veterinary Surgery** 46:111-119.

Jarm T, Cemazar M, Miklavcic D, Sersa G (2010) Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. **Expert Review of Anticancer Therapy** 10:729-746.

Khan KNM, Knapp DW, Denicola DB, Harris RK (2000) Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. **American Journal Of Veterinary Research** 61:478-481.

Knapp DW, Glickman NW, Denicola DB, Bonney PL, Lin TL, Glickman LT (2000) Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations** 5:47-59.

Knapp DW, Ramos-Vara JA, Moore GE, Dhawan D, Bonney PL, Young KE (2014) Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. **ILAR journal** 55:100-118.

Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR, Denicola DB, Kuczek T (1994) Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 8:273-278.

Knapp DW, Henry CJ, Widmer WR, Tan KM, Moore GE, Ramos-Vara JA, Bonney PL (2013) Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of veterinary internal medicine** 27:126-133.

Knapp DW, Peer WA, Conteh A, Diggs AR, Cooper BR, Glickman NW, Murphy AS (2013) Detection of herbicides in the urine of pet dogs following home lawn chemical application. **Science of the total environment** 456:34-41.

Knapp DW, Dhawan D, Ramos-Vara JA, Ratliff TL, Cresswell GM, Utturkar S, Hahn N M (2020) Naturally-occurring invasive urothelial carcinoma in dogs, a unique model to drive advances in managing muscle invasive bladder cancer in humans. **Frontiers in Oncology** 9:1493.

Koutros S, Silverman DT, Alavanja MC, Andreotti G, Lerro CC, Heltshe S, Beane Freeman LE (2016) Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. **International Journal Of Epidemiology** 45:792-805.

Kubota Y, Nakada T, Yanai H, Kakizaki H, Sasagawa I, Watanabe M (1996) Electropermeabilization in bladder cancer chemotherapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology** 39:67-70.

London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, Cherrington JM (2003) Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. **Clinical Cancer Research** 9:2755-2768.

London CA (2009) Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topics In Companion Animal Medicine** 24:106-112.

Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, Soden DM, Lubas G (2017) The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. **Veterinary And Comparative Oncology** 15:775-784.

Maglietti F, Tellado M, Olaiz N, Michinski S, Marshall G (2017) Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode. **Radiology and Oncology** 51:422-430.

Mali B, Miklavcic D, Campana LG, Cemazar M, Sersa G, Snoj M, Jarm T (2013) Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. **Radiology and Oncology** 47:32.

Marconato L, Zini E, Lindner D, Suslak-Brown L, Nelson V, Jeglum AK (2011) Toxic effects and antitumor response of gemcitabine in combination with piroxicam treatment in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 238:1004-1010.

Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, Mir LM (2006) Electrochemotherapy—An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. **European Journal of Cancer Supplements** 4:3-13.

Marvel SJ, Séguin B, Dailey DD, Thamm DH (2017) Clinical outcome of partial cystectomy for transitional cell carcinoma of the canine bladder. **Veterinary and comparative oncology** 15:1417-1427.

McMillan SK, Boria P, Moore GE, Widmer WR, Bonney PL, Knapp DW (2011) Antitumor effects of deracoxib treatment in 26 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 239:1084-1089.

Messer JS, Chew DJ, McLoughlin MA (2005) Cystoscopy: techniques and clinical applications. **Clinical Techniques in Small Animal Practice** 20:52-64.

Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Serša G (2014) Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. **Biomedical Engineering Online** 13:1-20.

Mir LM, Orłowski S, Belehradec JJ, Paoletti C (1991) Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology** 27:68-72.

Mir LM (2006) Bases and rationale of the electrochemotherapy. **European Journal of Cancer Supplements** 4:38-44.

Mir LM, Orłowski S (1999) Mechanisms of electrochemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews** 35:107-118.

Mitsui K, Kato K, Nakamura K, Yamada Y, Honda N, Fukatsu H, Yoshikawa K (2002) Effective treatment of bladder tumor-bearing mice by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy. **Drug Delivery** 9:249-252.

Mochizuki H, Shapiro SG, Breen M (2015) Detection of BRAF mutation in urine DNA as a molecular diagnostic for canine urothelial and prostatic carcinoma. **PLoS one** 10:e0144170.

Monteiro LL, Witjes JA, Agarwal PK, Anderson CB, Bivalacqua TJ, Bochner BH, Dinney C (2019) ICUD-SIU International Consultation on Bladder Cancer 2017: management of non-muscle invasive bladder cancer. **World Journal Of Urology** 37:51-60.

Mutsaers AJ, Widmer WR, Knapp DW (2003) Canine transitional cell carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 17:136-144.

Norris AM, Laing EJ, Valli VE, Withrow SJ, Macy DW, Ogilvie GK, Jacobs RM (1992) Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980–1985). **Journal of veterinary Internal Medicine** 6:145-153.

Ogihara M, Yamaguchi O (2000) Potentiation of effects of anticancer agents by local electric pulses in murine bladder cancer. **Urological Research** 28:391-397.

Okajima E, Hiramatsu T, Hirao K, Ijuin M, Hirao Y, Babaya K, Ohishi H (1981) Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in dogs. **Cancer Research** 41:1958-1966.

Orłowski S, Belehradec JJ, Paoletti C, Mir LM (1988) Transient electroporation of cells in culture: increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. **Biochemical Pharmacology** 37:4727-4733.

Owen LN, World Health Organization (1980). TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/edited by LN Owen (No. VPH/CMO/80.20). **World Health Organization**.

Park J, Park S, Song C, Doo C, Cho YM, Ahn H, Kim CS (2007) Effectiveness of adjuvant chemotherapy in transitional cell carcinoma of the urinary bladder with lymph node involvement and/or lymphovascular invasion treated by radical cystectomy. **Urology** 70:257-262.

Patrick DJ, Fitzgerald SD, Sesterhenn IA, Davis CJ, Kiupel M (2006) Classification of canine urinary bladder urothelial tumours based on the World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification. **Journal Of Comparative Pathology** 135:190-199.

Pompeo AC, Carrerette FB, Glina S, Ortiz V, Ferreira U, Fonseca CE, Sociedade, BDP (2008) Bladder cancer-treatment of invasive and metastatic carcinoma. **Revista da Associacao Medica Brasileira** 54:290.

Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggermann, P (2018) Electrochemotherapy as a new modality in interventional oncology: a review. **Technology in Cancer Research & Treatment** 17:1-12

Pron G, Belehradek J, Mir LM (1993) Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. **Biochemical and biophysical research communications**, 194:333-337

Raghavan M, Knapp DW, Bonney PL, Dawson MH, Glickman LT (2005) Evaluation of the effect of dietary vegetable consumption on reducing risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 227:94-100.

Ramos-Vara JA, Miller MA, Boucher M, Roudabush A, Johnson GC (2003) Immunohistochemical detection of uroplakin III, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in canine urothelial tumors. **Veterinary Pathology** 40:55-62.

Rangel MMM, de Oliveira KD, Freytag JO, Quadros PG, Suzuki DOH (2018) Electrochemotherapy on Bladder-Preliminary Results. **Biomedical Journal** 1:3.

Rangel MMM, Luz J, Oliveira KD, Ojeda J, Freytag JO, Suzuki DOH (2019) Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. **Austral Journal of Veterinary Sciences** 51:45-51.

Rippy SB, Gardner HL, Nguyen SM, Warry EE, Portela RF, Drost WT, London CA (2016) A pilot study of toceranib/vinblastine therapy for canine transitional cell carcinoma. **BMC Veterinary Research** 12:1-10.

Roberts JT, Von der Maase H, Sengeløv L, Conte PF, Dogliotti L, Oliver T, Arning M (2006) Long-term survival results of a randomized trial comparing

gemcitabine/cisplatin and methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin in patients with locally advanced and metastatic bladder cancer. **Annals of Oncology** 17:v118-v122.

Rossmann P, Zabka TS, Ruple A, Tuerck D, Ramos-Vara JA, Liu L, Knapp DW (2021) Phase I/II Trial of Vemurafenib in Dogs with Naturally Occurring, BRAF-mutated Urothelial Carcinoma. **Molecular Cancer Therapeutics** 20:2177-2188.

Saeki K, Fujita A, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R (2015) Total cystectomy and subsequent urinary diversion to the prepuce or vagina in dogs with transitional cell carcinoma of the trigone area: a report of 10 cases (2005–2011). **The Canadian Veterinary Journal** 56:73.

Schrempp DR, Childress MO, Stewart JC, Leach TN, Tan KM, Abbo AH, Knapp DW (2013) Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 242:1534-1538.

Sersa G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajsek M, Sentjurc M, Cemazar M (2008) Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. **British Journal Of Cancer** 98:388-398.

Sersa G, Teissie J, Cemazar M, Signori E, Kamensek U, Marshall G, Miklavcic D (2015) Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. **Cancer Immunology, Immunotherapy** 64:1315-1327.

Sersa G (2006) The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. **European Journal of Cancer Supplements** 4:52-59.

Simčič P, et al. (2021) A retrospective multicentric study of electrochemotherapy in the treatment of feline nasal planum squamous cell carcinoma **Veterinary Sciences** 8:53.

Spugnini EP, Vincenzi B, Baldi F, Citro G, Baldi A (2006) Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. **Anticancer Research** 26:4585-4589.

Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, Citro G, Porrello A (2007) Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 59:375-381.

Spugnini EP, Citro G, Mellone P, Dotsinsky I, Mudrov N, Baldi A (2007) Electrochemotherapy for localized lymphoma: a preliminary study in companion animals **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** 26:343-346.

Spugnini EP, Vincenzi B, Amadio B, Baldi A (2019) Adjuvant electrochemotherapy with bleomycin and cisplatin combination for canine soft tissue sarcomas: A study of 30 cases. **Open Veterinary Journal** 9:88-93.

Spugnini EP, Baldi A (2019) Electrochemotherapy in veterinary oncology: state-of-the-art and perspectives **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 49:967-979.

Stone EA, George TF, Gilson SD, Page RL (1996) Partial cystectomy for urinary bladder neoplasia: surgical technique and outcome in 11 dogs. **Journal of Small Animal Practice** 37:480-485.

Strandgaard T, Nordentoft I, Lamy P, Christensen E, Thomsen MBH, Jensen JB, Dyrskjøt L. (2020). Mutational analysis of field cancerization in bladder cancer. **Bladder Cancer** 6:253-264.

Suzuki DO, Anselmo J, de Oliveira KD, Freytag JO, Rangel MM, Marques JL, Ramos A (2015) Numerical model of dog mast cell tumor treated by electrochemotherapy. **Artificial Organs** 39:192-197.

Sylvester RJ, Van Der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Kurth K (2006) Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. **European Urology** 49:466-477.

Teissie J, Golzio M, Rols MP (2005) Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects** 1724:270-280.

Tellado MN, Maglietti FH, Michinski SD, Marshall GR, Signori E (2020) Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors influencing treatment outcome. **Radiology and Oncology** 54:68.

Tounekti O, Pron G, Belehradec J, Mir LM (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. **Cancer Research** 53:5462-5469.

Tozon N, Tratar UL, Znidar K, Sersa G, Teissie J, Cemazar M (2016) Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. **Journal of Visualized Experiments: JoVE** 116.

Tozon N, Pavlin D, Sersa G, Dolinsek T, Cemazar M (2014) Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 16:291-299.

Tozon N, Milevoj N, Impellizeri J (2021) Electrochemotherapy in veterinary oncology In: **Electroporation in Veterinary Oncology Practice**. Springer:Cham, pp. 63-112.

Tsamouri MM, Steele TM, Mudryj M, Kent MS, Ghosh PM (2021) Comparative Cancer Cell Signaling in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder in Dogs and Humans. **Biomedicines** 9:1472.

Valli VE, Norris A, Jacobs RM, Laing E, Withrow S, Macy D, Henderson RA (1995) Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. **Journal of Comparative Pathology** 113:113-130.

Van Den Bosch S, Witjes JA (2011) Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: a systematic review. **European Urology** 60:493-500.

Vásquez JL, Ibsen P, Lindberg H, Gehl J (2015) In vitro and in vivo experiments on electrochemotherapy for bladder cancer. **The Journal of Urology** 193:1009-1015.

VCOG (2011) Veterinary cooperative oncology group-common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. **Veterinary and Comparative Oncology** 14:417-446.

Yamaguchi O, Irisawa C, Baba K, Ogihara M, Yokota T, Shiraiwa Y (1994) Potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses in mouse bladder tumor *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 172:291-293.

Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D (2014) Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. **Annual Review of Biomedical Engineering** 16:295-320.

Wallmeroth A, Wagner U, Moch H, Gasser TC, Sauter G, Mihatsch MJ (1999) Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT2-4): an autopsy study on 367 patients. **Urologia Internationalis** 62:69-75.

Walters L, Martin O, Price J, Sula MM (2018) Expression of receptor tyrosine kinase targets PDGFR- β , VEGFR2 and KIT in canine transitional cell carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology** 16:E117-E122.

Wongsetthachai P, Pramatinwai C, Banlunara W, Kalpravidh M (2011) Urinary bladder wall substitution using autologous tunica vaginalis in male dogs. **Research in Veterinary Science** 90:156-159.

Zimmermann U, Scheurich P (1981) High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. **Planta** 151:26-32.

Granata V, Fusco R, Piccirillo M, et al. (2015) Electrochemotherapy in locally advanced pancreatic cancer: preliminary results. **International Journal of Surgery** 18:230-236.

Djokic M, Cemazar M, Popovic P, et al. (2018) Electrochemotherapy as treatment option for hepatocellular carcinoma, a prospective pilot study. **European Journal of Surgical Oncology** 44:651-657.

Egeland C, Baeksgaard L, Johannesen HH, et al. (2018) Endoscopic electrochemotherapy for esophageal cancer: a phase I clinical study. **Endoscopy International Open** 6:E727.

Falk Hansen H, Bourke M, Stigaard T, et al. (2020) Electrochemotherapy for colorectal cancer using endoscopic electroporation: a phase 1 clinical study. **Endoscopy International Open** 8:E124–E132.