

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

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DA INVASÃO PERINEURAL
COMO FATOR PREDITIVO DE RECIDIVA LOCAL EM
FELINOS COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
TRATADOS COM ELETROQUIMIOTERAPIA**

**Francielle Fernanda Quirino dos Santos
Médica Veterinária**

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DA INVASÃO PERINEURAL
COMO FATOR PREDITIVO DE RECIDIVA LOCAL EM
FELINOS COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
TRATADOS COM ELETROQUIMIOTERAPIA**

Francielle Fernanda Quirino dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Andrigo 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 Cirurgia Veterinária.

S237a

Santos, Francielle Fernanda Quirino dos

Avaliação retrospectiva da invasão perineural como fator preditivo de recidiva local em felinos com carcinoma de células escamosas tratados com eletroquimioterapia / Francielle Fernanda Quirino dos Santos. -- Jaboticabal, 2024

59 p.

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

Orientador: Andrigo Barboza de Nardi

1. Neoplasia cutânea. 2. Oncologia. 3. Bainha nervosa. 4. Prognóstico. 5. Gato. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DA INVASÃO PERINEURAL COMO FATOR PREDITIVO DE RECIDIVA LOCAL EM FELINOS COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS TRATADOS COM ELETROQUIMIOTERAPIA

AUTORA: FRANCIELLE FERNANDA QUIRINO DOS SANTOS

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

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



Documento assinado digitalmente
ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Data: 09/04/2024 07:27:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES
Data: 08/04/2024 19:06:42-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente
ANNELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS
Data: 09/04/2024 07:12:01-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de abril de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Francielle Fernanda Quirino dos Santos, natural de Contagem, Minas Gerais. Graduada no curso de Medicina Veterinária pela FEAD/ MG em julho de 2007. Pós-Graduada em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, em 2008. Pós-Graduada em Clínica Médica e Cirúrgica de Felinos, pelo Instituto Qualittas em 2011. Pós-Graduada em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, pelo Instituto Qualittas em 2015. Pós-Graduada em Oncologia em Pequenos Animais, pelo Instituto Qualittas em 2017. Curso extensivo de Eletroquimioterapia – VET Câncer 2017/2018. Curso extensivo de aperfeiçoamento em Cirurgias Oncológicas e Reconstructivas, Unesp Campus Jaboticabal em 2019. Mestranda do programa de Cirurgia Veterinária, Unesp – Jaboticabal.

“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”

- *Chico Xavier*

Dedico este trabalho aos meus mestres e
aos que tanto acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Não caberiam em poucas linhas o agradecimento de uma vida inteira. O curso de mestrado contempla dois anos de uma longa jornada de formação.

Agradeço inicialmente a Deus, por guiar meus passos e me permitir cuidar dos animais, seres tão maravilhosos e um dos meus propósitos de vida.

Agradeço aos meus pais, Celenita Quirino dos Santos e José Osmar Quirino dos Santos (in memoriam), pelo infinito apoio, renúncias e abdicação, para que pudesse me dedicar aos estudos desde minha graduação. Agradeço ao meu marido Marcelo pela ajuda em todo processo do mestrado e em todas as minhas especializações sempre me ajudando, apoiando e incentivando. Agradeço a minha filha Maria Vitória, grande amor da minha vida, que mesmo tão pequena me incentiva a me capacitar e ser cada vez mais uma profissional melhor. Agraço também a minha irmã Danielle e meu afilhado Gustavo por todo carinho e amor comigo sempre.

Agradeço aos meus animais e filhos de coração, que sempre são fontes de alegria para minha vida e da minha família. Amora, Crystal, Zuleika, Aurora, Leleo, Penelope, Britney e Mussun, que possam sempre receber o meu carinho.

A todos os professores que fizeram parte da minha caminhada e que lecionaram no dia a dia, com palavras de orientação e exemplos verdadeiros.

A realização desse projeto de pesquisa só foi possível graças ao imenso apoio de mestres que sempre admirei e que agora me ajudaram e desenvolver este trabalho juntos. Dedico este agradecimento a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desta etapa.

Agradeço a todos os pacientes e tutores que colaboraram com paciência, mesmo diante de momentos difíceis que vivenciaram.

Em especial, agradeço ao Prof. Andriago Barboza de Nardi, por abrir as portas deste mestrado, sendo meu orientador. Agradeço pelos vários ensinamentos, pela paciência, confiança e carinho em um momento muito difícil da minha vida e que ele fez total diferença para mim.

Agradeço com carinho ao meu querido Co orientador Marcelo Monte Mór Rangel, que foi fundamental para a realização deste projeto, me ajudando muito, sempre que necessário. Agradeço a disponibilidade e amizade sempre.

Agradeço também a Krishna Oliveira e a toda equipe do Vet Cancer pela disponibilidade e ajuda em todas as dúvidas e dificuldades que tive neste processo.

Agradeço ao Gabriel Carra, a Beatriz (Bia) e a Luciana pela disposição e paciência em me ajudar nas minhas dúvidas sempre com carinho e boa vontade. Agradeço a todos do Hospital veterinário da UNESP que de alguma forma contribuíram para esse projeto.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.2. Carcinoma de células escamosas felino	2
.....	3
2.3. Etiologia e fatores de risco.....	3
2.4. Apresentação clínica	5
2.5. Diagnóstico e estadiamento.....	5
2.6. Tratamento.....	6
2.7. Eletroquimioterapia.....	9
2.7.1. Eletropermeabilização	10
2.7.2. Parâmetros elétricos	10
2.7.3. Quimioterápicos e mecanismos de ação da EQT	11
2.7.4. Aplicação da EQT no CCE felino e humano.....	13
2.8. Fatores prognósticos	13
2.9.1 Invasão em bainha perineural	14
3. REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2 – Avaliação retrospectiva da invasão perineural como fator preditivo de recidiva local em felinos com carcinoma de células escamosas tratados com eletroquimioterapia	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
Aspectos éticos.....	26
Seleção de animais.....	26

Protocolo de eletroquimioterapia	28
Avaliação histopatológica transoperatória.....	27
Avaliação de resposta.....	29
Avaliação de segurança	29
Análise estatística.....	30
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	41



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 retrospectiva da invasão perineural como fator preditivo de recidiva local em felinos com carcinoma de células escamosas tratados com eletroquimioterapia"**, protocolo nº 9849/2023, 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 junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado **"Ad referendum"** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	01/12/2023 a 31/12/2023
Espécie / Linhagem	Felina
Nº de animais	Não especificado
Peso / Idade	Não especificado
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Prontuários clínicos

Jaboticabal, 29 de novembro de 2023.

Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora em exercício – CEUA FCAV

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

AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DA INVASÃO PERINEURAL COMO FATOR PREDITIVO DE RECIDIVA LOCAL EM FELINOS COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS TRATADOS COM ELETROQUIMIOTERAPIA

RESUMO - O carcinoma de células escamosas (CCE) é considerado uma neoplasia maligna que compreende cerca de 15-25% de todos os tumores cutâneos e de 70-80% de todos os tumores orais em felinos. Assim como em humanos, o CCE felino é caracterizado por um comportamento altamente invasivo localmente, entretanto, apresenta baixas taxas metastáticas. Diante disso, o tratamento local efetivo pode ser considerado curativo para a maioria dos pacientes, incluindo principalmente a cirurgia, a eletroquimioterapia (EQT), a criocirurgia ou a combinação destes. Ainda assim, essa doença pode se manifestar de forma mais agressiva em uma parcela dos pacientes, culminando em maiores taxas de recidiva, mesmo quando tratados adequadamente. Em humanos, a invasão perineural (IP) já foi descrita como uma importante via de disseminação tumoral, sendo associada ao CCE cutâneo e oral de alto risco, o que confere uma maior agressividade tumoral, culminando em maiores taxas metastáticas e de recidiva, maior resistência a terapias locais e menores tempos de sobrevivência. Em contrapartida, a IP em felinos com CCE ainda não foi descrita, assim como seu valor prognóstico. O presente estudo objetivou avaliar a IP em uma população de felinos com CCE tratados com EQT, correlacionando sua presença com a ocorrência de recidiva local e outras variáveis clínicas. Foram selecionados de forma retrospectiva 24 felinos com o diagnóstico histopatológico de CCE atendidos no centro oncológico Vet Câncer (São Paulo, SP, Brasil), durante o período de 2013 a 2021. A instituição da EQT como terapia única, a avaliação histopatológica da IP e a ausência de metástases a distância, foram padronizados como os critérios de inclusão. Dados referentes a presença de IP, resposta inicial a terapia, ocorrência de recidiva e efeitos adversos foram obtidos a partir dos prontuários clínicos. A taxa de resposta completa inicial foi de 96% (23/24). A IP foi identificada em 33% dos gatos (8/24 - grupo IP positivo), enquanto que 67% estavam livres desta invasão (16/24 - grupo IP negativo). Todos os pacientes do grupo IP positivo apresentaram recidiva local, enquanto que apenas 5 pacientes do grupo IP negativo recidivaram. Assim, o índice de recidiva foi significativamente maior nos felinos com IP do que os sem IP ($p=0,03$). Esses resultados são os primeiros acerca da IP em felinos com CCE e servem de premissa para que novos estudos sejam realizados, principalmente a fim de correlacionar a presença de IP com dados de sobrevivência e melhor definição de seu valor prognóstico.

Palavras-chave: Neoplasia cutânea; Oncologia; Bainha nervosa; Prognóstico; Gato.

RETROSPECTIVE EVALUATION OF PERINEURAL INVASION AS A PREDICTIVE FACTOR OF LOCAL RECURRENCE IN CATS WITH SQUAMOUS CELL CARCINOMA TREATED WITH ELECTROCHEMOTHERAPY

ABSTRACT – Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant neoplasia, which represents, approximately, 15-25% of all feline cutaneous tumors and 70-80% of all feline oral tumors. As in humans, feline SCC is characterized to be highly invasive locally, however, its metastatic rate is low. In front of this, an effective local treatment can be considered curative for the majority of the patients, and includes surgery, electrochemotherapy (ECT), cryosurgery, or a combination of them. Still, this neoplasia can be manifested more aggressively in a portion of patients, leading to higher recurrence rates, even if treated properly. In humans, the presence of perineural invasion (IP) has already been described as a relevant tumor dissemination route, being associated to the high-risk CCE and higher tumor aggressiveness, which results in higher metastatic and recurrence rates, resistance to local treatments and short survivals. However, IP has not been described in felines with CCE, as well as its prognostic value. This study aimed to evaluate the IP occurrence in a feline population with CCE treated with ECT, correlating its presence with the occurrence of local recurrence and other clinical variables. Twenty-four cats, with histopathological diagnosis of SCC, were retrospectively selected from the clinical records of the oncological center Vet Cancer (São Paulo, SP, Brazil), between 2013 and 2021. ECT as sole therapy, histopathological evaluation of IP, and absence of distant metastatic disease were the inclusion criteria. Data regarding to IP presence, initial response to therapy, local recurrence and adverse events were collected from the clinical records. Complete response rate was 96% (23/24). IP was identified in 33% of the cats (8/24 – IP-positive group), while 67% were free of this invasion (16/24 – IP-negative group). All the IP-positive patients developed local recurrence, while only 5 patients IP-negative recurred. Thus, the recurrence was significantly higher in cats IP-positive than those IP-negative ($p=0,03$). The data obtained are the first regarding IP occurrence in cats with SCC and paves the road for new studies to be developed, mainly to correlate the IP with survival data and better definition of its prognostic value.

Keywords: Cutaneous neoplasia; Oncology; Nervous sheath; Prognosis; Cat.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Representação esquemática do processo de invasão perineural. Diferentes moléculas (neurotrofinas) são liberadas pelas células tumorais e nervosas no microambiente tumoral, promovendo a migração de células tumorais em direção aos nervos e sua consequente invasão. NGF, fator de crescimento nervoso; GDNF, fator neurotrópico derivado da linhagem glial; NCAM, molécula de adesão celular neuronal; MMP, metaloproteinases de matriz (Adaptado de Zhang et al. 2018). ...15
- Figura 2.** Fotomicrografia histológica de paciente felino com CCE (IP positivo), apresentando células tumorais totalmente ao redor do nervo e em seu interior (H&E).28
- Figura 3.** Distribuição do número de sessões (A), ocorrência de recidiva (B) e escore de toxicidade (TOX) (C) entre os grupos com e sem IP. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o escore TOX ($p = 0.21$) e a ocorrência de recidiva ($p = 0.03$) entre os grupos.33
- Figura 4.** Diferença significativa entre os grupos utilizando a Análise de Componente Principal (ACP). As variáveis consideradas foram a presença de IP e a taxa de recidiva.33

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Dados clínicos e de tratamento nos 24 felinos com CCE incluídos no estudo 31

Tabela 2. Distribuição das lesões tumorais de acordo com a localização entre os grupos com e sem invasão perineural 34

Tabela 3. Classificação do escore de toxicidade (TOX) de acordo com a presença de IP 35

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia originada a partir da transformação maligna do epitélio escamoso, localizado principalmente na pele, cavidade oral e esôfago (Murphy, 2013). O CCE cutâneo é considerado uma das três neoplasias cutâneas mais frequentes em felinos, com incidência de aproximadamente 15% de todos os tumores cutâneos nesta espécie. Além disso, o CCE de cavidade oral representa 70-80% de todas as neoplasias orais malignas em felinos (Hauck; Oblak, 2020).

A etiologia do CCE cutâneo está fortemente associada a exposição a radiação ultravioleta (UV), e devido a isto, felinos de pelagem branca e esparsa com histórico de exposição solar, estão sob maior risco de desenvolvimento dessa neoplasia. Essa neoplasia surge de forma mais frequente em regiões da cabeça dos felinos, especialmente em áreas glabras de gatos de pelagem clara, incluindo o plano nasal, orelhas, têmporas, pálpebras (Thomson, 2007; Murphy, 2013; Hauck; Oblak, 2020). Por sua vez, o CCE oral ainda não possui fatores etiológicos bem estabelecidos, porém, correlaciona-se seu surgimento com o uso de certos anti-pulgas, alimentos enlatados e fumaça de cigarro (Bilgic et al., 2015; Sequeira et al., 2022).

A cirurgia é considerada o tratamento de primeira linha no CCE felino, oferecendo maiores chances de cura local, no entanto, sua abordagem enfrenta alguns desafios, como a localização complexa das lesões, dificultando a obtenção de margens completas, e os defeitos cosméticos que podem ser gerados. Diante disso, terapias adjuvantes mais conservadoras podem ser utilizadas em associação a cirurgia ou como terapia única (Hauck; Oblak, 2020).

Nos últimos anos, a eletroquimioterapia (EQT) surgiu como uma terapia local seletiva, que proporciona o tratamento do tecido tumoral, ao passo que preserva as estruturas anatômicas saudáveis. A EQT tem mostrado alta eficácia no controle do CCE felino, com respostas objetivas que chegam a 97%, sendo hoje considerada também,

uma terapia de primeira linha para os felinos acometidos, principalmente em lesões menores e menos invasivas (Tozon et al., 2014; Spugnini et al., 2009; Simčič et al., 2021; Ribeiro et al., 2023).

Apesar do tratamento local proporcionar grande chance de cura nesses pacientes, principalmente para lesões de estadiamento mais precoce, uma parcela de felinos manifesta a doença na sua forma mais agressiva, com altas taxas de recidiva local, mesmo após o tratamento adequado. Da mesma forma ocorre com pacientes humanos com CCE, no entanto, já existem fatores prognósticos bem estabelecidos que classificam esses pacientes como de “alto risco”, permitindo uma abordagem individualizada para tais (Schmults et al., 2013).

Dentre esses fatores prognóstico, a presença da invasão perineural (IP) ganha destaque, sendo considerada um dos fatores de malignidade mais importantes e estudados em humanos com CCE, sendo a sua presença associada a maiores taxas de recidiva e menores sobrevidas (McCord et al., 2000; Clayman et al., 2005; Carter et al., 2013; Haug et al., 2020).

Em contrapartida, a investigação de fatores prognósticos em felinos com CCE ainda é muito escassa na medicina veterinária, não existindo, até o momento, estudos que avaliem a IP nesses pacientes. Diante disso, hipotetizou-se que, assim como em humanos, felinos com CCE podem também apresentar a IP, e sua presença pode estar relacionada a maiores taxas de recidiva e, potencialmente, ser reconhecida como um fator prognóstico negativo.

Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar retrospectivamente a ocorrência da IP em felinos com CCE e correlacionar com a ocorrência de recidiva local e de outras variáveis clínicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2. Carcinoma de células escamosas felino

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia que se origina a partir da transformação maligna das células do epitélio escamoso, com alta incidência em

felinos, representando cerca de 15% de todas as neoplasias de origem cutânea nessa espécie (Murphy et al., 2013; Berlato et al., 2018; Hauck; Oblack, 2020).

As lesões de CCE podem surgir em diferentes sítios anatômicos compostos pelo epitélio escamoso, incluindo a epiderme, derme, coxins e região ungueal. Além disso, a mucosa oral e esofágica também são sítios de desenvolvimento para o CCE, que representa cerca de 70% de todos os tumores de cavidade oral em felinos (Murphy et al., 2013; Grandi; Rondelli, 2016; Hauck; Oblack, 2020). Outros locais relatados para desenvolver CCE em felinos incluem a conjuntiva, córnea, fossas nasais, laringe, pulmão, esôfago, bexiga, próstata, pênis, colo do útero, vagina e saco anal como exemplificado (Moretto; Correa, 2013).

O comportamento biológico do CCE se caracteriza como localmente invasivo, com possibilidade de infiltração em tecidos mais profundos, como músculos e ossos adjacentes em estágios mais avançados. Apesar disso, o CCE é considerado um tumor de baixa capacidade metastática, sendo o pulmão e linfonodos os sítios de predileção para disseminação regional e a distância, respectivamente (Murphy et al., 2013; Hauck; Oblack, 2020).

2.3. Etiologia e fatores de risco

Assim como em seres humanos, a etiologia do CCE é intimamente associada com a exposição crônica da pele a radiação ultravioleta (UV). Devido a isso, seu desenvolvimento é mais comum em felinos de pelagem pouco pigmentada, esparsa e com histórico de exposição solar crônica (Hauck; Oblak, 2020). Além disso, a cabeça é considerada o sítio anatômico mais comum para o desenvolvimento do CCE em felinos, devido à maior exposição solar. Além disso, as regiões da cabeça que possuem maior rarefação pilosa, incluindo plano nasal, pavilhão auricular e pálpebras, estão sob maior risco de desenvolvimento do CCE (Murphy, 2013).

Como os danos na pele possuem natureza cumulativa, a incidência do CCE é mais elevada em felinos com média de idade de 10 a 12 anos. Até o momento, ainda foram identificadas predisposição de gênero ou raça para o desenvolvimento de CCE, entretanto, gatos da raça Siamês, com suas extremidades menos pigmentadas, podem

ser menos propensos a desenvolver a doença (Thomson et al., 2007; Murphy et al., 2013). Por conseguinte, gatos de pelagem longa, como Himalaias e Persas, também apresentariam risco reduzido, uma vez que possuem maior cobertura pilosa protetiva. Assim, gatos domésticos de pelagem curta apresentam maior predisposição para o CEC.

O mecanismo proposto para o desenvolvimento do CCE cutâneo e sua associação com a exposição à radiação UV, também envolve o gene supressor tumoral TP53. Esse gene codifica a proteína p53, que impede que células com danos genéticos progridam no ciclo celular e propaguem esse dano às células-filhas. A radiação UV leva a mutações no gene TP53, levando a sua inativação e instabilidade genômica, e consequentemente, culminando na transformação neoplásica das células escamosas da epiderme (Hauck; Oblack, 2020). A forma mutante do gene TP53 foi detectada em 82% dos CCEs do pavilhão auricular felino, enfatizando a importante participação deste gene na prevenção do CCE induzido pelo sol (Villalobos; Kaplan, 2011). É importante ressaltar que essa mutação também é identificada em felinos e humanos com lesões cutâneas pré-neoplásicas, como a ceratose actínica (Favrot et al., 2009; Pipponen et al., 2021). A presença da mutação no gene TP53 também é detectada no CCE oral em felinos, com incidência reportada em até 69% dos gatos acometidos (Renzi et al., 2019).

Outros fatores também têm sido associados ao desenvolvimento do CCE cutâneo. A infecção pelo papilomavírus (PPV), associada à exposição à radiação UV, já foi reconhecida como um fator de risco no desenvolvimento do CCE cutâneo em seres humanos (Munday; Kiupel, 2010). O PPV, por si só, possui a capacidade de invadir e se replicar no interior dos queratinócitos, culminando na estimulação da diferenciação e proliferação dessas células, que muitas vezes já possuem alterações prévias pela exposição à radiação UV. O DNA do papilomavírus já foi identificado em felinos com ceratose actínica e CCE invasivo, entretanto, o significado dessa associação ainda não foi totalmente elucidado (Nespeca et al., 2006; O'Neill et al., 2011; Hauck; Oblack, 2020).

Com relação ao CCE oral em felinos, alguns estudos investigaram potenciais carcinógenos ambientais que podem contribuir para o seu desenvolvimento. Os fatores de risco incluem o uso de coleiras anti-pulgas e a ingestão de alimentos enlatados, especialmente aqueles à base de atum. Além disso, foram encontradas correlações

discretas, mas estatisticamente insignificantes, entre a exposição à fumaça do tabaco e o CCE oral felino (Bilgic et al., 2015; Sequeira et al., 2022).

2.4. Apresentação clínica

O CCE cutâneo se manifesta em felinos pelo desenvolvimento de lesões heterogêneas que podem variar entre lesões superficiais ou profundas, ulceradas ou não, proliferativas ou erosivas, de aspecto crostoso ou forma de couve-flor. Devido a maior exposição solar e maior rarefação pilosa, regiões da cabeça são as mais frequentemente acometidas, incluindo orelhas, têmporas, plano nasal, pálpebras e região periocular. Além disso, a ocorrência de múltiplas lesões em diferentes regiões da cabeça também é comum, uma vez que a influência da radiação solar ocorre de forma quase homogênea nessas regiões (Murphy et al., 2013; Hauck; Oblack, 2020) .

É frequente que os gatos acometidos pelo CCE cutâneo se apresentem com o histórico de terapia antibiótica e anti-inflamatória prévia, devido a suspeitas diagnósticas de lesões não neoplásicas, incluindo dermatopatias inflamatórias, infecciosas ou traumáticas. Esse cenário contribui para o diagnóstico tardio da doença, estando associado a estágios mais avançados e pior prognóstico no momento do diagnóstico assertivo (Rosolem et al., 2012).

Os sinais clínicos do CCE dependem da localização do tumor. Os tumores digitais geralmente causam claudicação e ulceração do dedo. Tumores nasais podem causar deformidade facial, secreção nasal e espirros. Os sinais de tumores orais incluem excesso de salivação, sangramento oral, anorexia, perda de dentes, disfagia, perda de peso e halitose (Villalobos; Kaplan, 2011).

2.5. Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico assertivo do CCE é fundamental para a intervenção terapêutica precoce, que culmina em um melhor prognóstico para a maioria dos casos. A apresentação clínica das lesões, combinada ao histórico do paciente, pode sugerir fortemente a suspeita diagnóstica de CCE. Entretanto, outras doenças cutâneas, benignas ou não, podem levar a lesões similares. Os principais diagnósticos diferenciais

incluem: epiteloma, papiloma escamoso, carcinoma basocelular, hemangiossarcoma cutâneo, leishmaniose, dermatofitose, entre outros (Thomson, 2007; Rosolem et al., 2012; Hauck; Oblack, 2020).

O exame citopatológico é um método rápido, fácil e não invasivo que pode fornecer o diagnóstico presuntivo de CCE, sendo considerado um bom exame de triagem na rotina. Entretanto, devido a presença concomitante de inflamação e infecções secundárias, a citologia resulta muitas vezes em diagnósticos inconclusivos. Dessa forma, a obtenção do diagnóstico definitivo é preconizada através avaliação histopatológica do tecido, que pode ser obtido por meio da técnica incisional ou excisional (Thomson, 2007; Murphy et al., 2013).

O sistema de estadiamento do CCE felino segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o tamanho tumoral e/ou profundidade da lesão (T – *tumor*) e a presença de metástases regionais (N – *node*) e a distância (M – *metastasis*) (Owen, 1980). Para a correta classificação, todos os pacientes com suspeita de CCE devem passar pelo estadiamento clínico e tumoral, incluindo exame clínico (avaliação e mensuração das lesões), laboratoriais (hemograma e bioquímicos), imaginológicos (ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e de crânio, tomografia computadorizada), assim como exames cito- ou histopatológicos dos linfonodos regionais, quando alterados macroscopicamente (Murphy et al., 2013).

2.6. Tratamento

O diagnóstico precoce permite maiores chances de eficácia terapêutica, especialmente porque os tumores pequenos e superficiais são mais passíveis de um controle local efetivo. Diante da baixa taxa metastática do CCE cutâneo, as terapias locais são consideradas eficazes, e até curativas, para grande parte dos casos. As opções de tratamento local utilizadas em felinos com CCE incluem cirurgia, eletroquimioterapia, crioterapia e, menos frequentemente, a radioterapia. Outras terapias locais também incluem a plesioterapia, terapia fotodinâmica (PDT) e quimioterapia intratumoral (Murphy et al., 2013; Moretto et al., 2013; Prado et al., 2017; Simčič et al., 2021). As terapias sistêmicas incluem a quimioterapia e o uso de inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2),

geralmente recomendadas para pacientes com tumores inoperáveis, pouco diferenciados ou metastáticos (Hauck; Oblack, 2020).

A cirurgia é considerada a principal opção de tratamento para a maioria dos pacientes com CEC, principalmente para lesões localizadas na pina da orelha, pálpebra e em lesões invasivas (Murphy et al., 2013; Hauck; Oblack, 2020). A grande limitação dessa modalidade está no fato de que, devido a localização complexa dessas lesões, a cirurgia pode acarretar comprometimento anatômico e funcional importantes, com resultado cosmético menos favorável em casos específicos. Se a excisão cirúrgica completa não for factível, ou se os tutores forem resistentes a procedimentos mais invasivos, terapias adjuvantes podem ser realizadas, como a criocirurgia, radioterapia ou eletroquimioterapia, cada qual com sua devida indicação (Simčič et al., 2021).

A crioterapia pode ser considerada para o controle local de tumores pequenos e superficiais ou tumores que foram extirpados de forma incompleta, sendo um exame pouco oneroso e prontamente disponível. Estudos relataram que a crioterapia fornece bom controle local por um ano ou mais para CCEs da córnea (Pucket; Gilmour, 2014; Prado et al., 2017).

A radioterapia (RT) é mais comumente empregada para tumores do plano nasal, cavidade nasal e cavidade oral (Villalobos; Kaplan, 2011; Bilgic et al., 2015; Gasymova et al., 2017). Diferentes protocolos estão disponíveis e podem ser indicados, no entanto, seu uso no CCE felino é limitado, devido ao maior custo do tratamento, necessidade de múltiplas anestесias e efeitos colaterais (Simčič et al., 2021). Gasymova et al. (2017) avaliou a radioterapia definitiva com fracionamento acelerado em gatos com CCE de plano nasal, obtendo bons resultados cosméticos e controle tumoral. Bilgic *et al.*, (2015) citam que os estudos que avaliam a eficácia da RT paliativa em cães e gatos com CCE oral são limitados, e que os poucos existentes, não são promissores.

A plesioterapia com o ⁹⁰Estrôncio consiste na aplicação tópica de uma fonte de radiação na lesão alvo. As doses de radiação tópica diminuem significativamente após uma profundidade de 2 mm. Portanto, o uso da plesioterapia é limitado a tumores superficiais ou incompletamente excisados, principalmente os do plano nasal ou da região ocular (Goodfellow et al., 2005; Moretto et al., 2013). Em um recente estudo

retrospectivo avaliando a eficácia da plesioterapia com estrôncio-90 para gatos com CCE do plano nasal, 13 de 15 gatos alcançaram uma resposta completa com um intervalo mediano livre de doença de 652 dias, com excelentes resultados cosméticos (Goodfellow et al., 2005).

A terapia fotodinâmica (TFD) é outra modalidade de tratamento local que tem sido utilizada para o tratamento do CCE. O processo envolve a administração tópica ou injeção intravenosa de um fotossensibilizador que se acumula preferencialmente nas células neoplásicas. Uma vez ativado pela luz de comprimento de onda específico, o fotossensibilizador causa citotoxicidade e necrose tecidual. A maior limitação do tratamento é a restrição da entrada na luz no tecido. Devido a isso, o uso da TFD é indicado em lesões superficiais, com 1,5 a 2 cm de profundidade (Buchholz; Walt, 2013). Buchholz et al. (2007) trataram 20 felinos com CCE cutâneo utilizando TFD com formulação lipossomal, obtendo uma taxa inicial de resposta completa de 100% e controle tumoral de 75%, depois de um ano.

Villalobos e Kaplan (2011) destacam que existem poucos relatos do uso de quimioterapia intratumoral para cães e gatos com CCE. A terapia intratumoral com um análogo da cisplatina foi ineficaz em gatos com CCE oral, muitos dos quais apresentaram sinais de toxicidade variando de letargia e inapetência a reações anafilactóides agudas. Em comparação, o tratamento intratumoral com carboplatina pareceu seguro e eficaz para gatos com CCE do plano nasal.

De forma geral, o CCE geralmente não é considerado um tumor quimiorresponsivo. No entanto, a quimioterapia pode ser considerada em certas circunstâncias, incluindo sua utilização em casos de tumores inoperáveis ou metastáticos. Protocolos de terapia de agente único ou combinado contendo bleomicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, doxorubicina e 5-fluorouracil já foram avaliados (Hauck; Oblack, 2020). No entanto, o emprego da quimioterapia em felinos com CCE permanece questionável, com baixas taxas de resposta e sem aparente benefício no aumento da sobrevida (Rosolem et al., 2012; Hauck; Oblack, 2020).

Diferentes estudos relataram aumento da expressão de COX-2 no CCE felino. Além de seus efeitos antiinflamatórios, os inibidores da COX-2 podem ter propriedades

antitumorais. No entanto, o papel dos inibidores de COX-2 no manejo do CCE ainda precisa de maior investigação (Moretto *et al.*, 2013).

Diante do exposto, lesões de CCE de menor tamanho e invasividade, tendem a responder de forma mais favorável aos tratamentos locais instituídos (Murphy *et al.*, 2013). No entanto, é extremamente comum felinos com lesões neoplásicas já em estadiamento avançado no momento do diagnóstico. Neste ponto, as opções de tratamento local como a cirurgia e a criocirurgia, são inviabilizadas devido a extensão da lesão e ao possível comprometimento anatômico e funcional que resultaria do procedimento.

Diante desses desafios, a eletroquimioterapia (EQT) surge como uma modalidade de tratamento mais conservadora, e que, devido sua seletividade inerente, proporciona um tratamento eficaz ao passo que preserva a anatomia e funcionalidade das estruturas saudáveis adjacentes (Mir *et al.*, 2006a; Spugnini *et al.*, 2019; Simčič *et al.*, 2021).

2.7. Eletroquimioterapia

A EQT é uma modalidade de tratamento local bem estabelecida na oncologia veterinária e humana, destacando-se como por sua eficácia e segurança, sendo benéfica não apenas como tratamento paliativo, mas também como abordagem curativa (Zimmerman; Scheurich *et al.*, 1981; Orlowski *et al.*, 1988; Mir, 2006b; Escoffre; Rols, 2012).

Em 2006 foram publicados os primeiros Procedimentos Operacionais Padrão (SOP), que padronizou o uso da EQT pela primeira vez na medicina humana (Mir *et al.*, 2006^b). Apesar da EQT ser utilizada na veterinária desde 1997, apenas em 2016 foi publicado o primeiro SOP que padroniza seu uso em cães e gatos (Tozon *et al.*, 2016), e mais recentemente, foram publicados os guias veterinários para o uso da EQT em tumores superficiais (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

A eletroquimioterapia (EQT) consiste na aplicação sistêmica ou local de quimioterápicos de baixa capacidade de internalização celular, combinados a aplicação de pulsos elétricos. Tal fenômeno culmina no aumento da permeabilização celular, internalização do fármaco aplicado e maximização de seu potencial citotóxico.

2.7.1. Eletropermeabilização

A membrana plasmática das células é composta por uma bicamada lipídica, mantida nesta conformação devido a ação de forças eletromagnéticas muito intensas, resultando em um potencial de repouso estável, que dificulta a internalização de moléculas hidrofílicas para o meio intracelular. Porém, com a aplicação dos pulsos elétricos, é gerado um potencial transmembrana induzido tão intenso que supera o potencial de repouso inicial da membrana, culminando na formação de pequenos poros ao longo da membrana, fenômeno este denominado de eletropermeabilização (Mir; Orłowski, 1999; Miklavčič et al., 2014; Yarmush et al., 2014).

Na EQT, a formação dos poros deve ocorrer de maneira reversível, em que a célula retorna rapidamente a sua conformação original. Dessa forma, o campo elétrico aplicado deve ser intenso o suficiente apenas para levar a formação de poros e permitir a entrada do quimioterápico. No entanto, se o campo elétrico aplicado atinge um limiar crítico, ocorre uma perturbação no fluxo iônico e ativação das vias de apoptose, levando a morte tanto das células tumorais como saudáveis. Esse fenômeno é denominado de eletropermeabilização irreversível, sendo indesejável quando se objetiva a realização da EQT (Mir; Orłowski, 1999; Yarmush et al., 2014; Spugnini; Baldi, 2019).

2.7.2. Parâmetros elétricos

A efetividade da EQT se baseia em alguns critérios essenciais: 1) presença do quimioterápico em concentrações suficientes na área a ser tratada; 2) cobertura de toda a área tumoral e margens pelo campo elétrico; 3) parâmetros elétricos adequados; 4) características tumorais; 5) escolha do quimioterápico e vias de administração; 5) aplicação adequada da técnica (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

O aparelho gerador de pulsos deve ser configurado para entregar os pulsos elétricos de acordo com parâmetros elétricos adequados, essenciais para a efetividade do tratamento. Os parâmetros elétricos mais comumente utilizados e relatados em diferentes estudos consistem em 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^b; Tozon et al., 2016).

O tempo para aplicação dos pulsos deve ser, preferencialmente, dentro 40 minutos, no entanto esse tempo pode ser estendido em casos de pacientes mais idosos ou com a função renal reduzida. No entanto, para qualquer caso, é indicado continuar a aplicação dos pulsos mesmo após passar o tempo preconizado, pois ainda haverá efeito antitumoral, mesmo que menor (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

2.7.3. Quimioterápicos e mecanismos de ação da EQT

Os principais fármacos antineoplásicos utilizados em protocolos de EQT são a bleomicina (BLM) e a cisplatina. Esses fármacos possuem uma dificuldade inerente de atravessar a bicamada lipídica, devido a suas propriedades hidrofílicas. Assim, quando utilizados como agentes únicos, não conseguem atingir uma concentração suficiente para um efeito citotóxico relevante, resultando em uma menor efetividade. Dessa forma, a eletropermeabilização celular permite a internalização desses fármacos de forma eficiente, maximizando seu efeito citotóxico e ação antitumoral (Mir et al., 1991; Orlowski et al., 1988; Gothelf; Mir; Gehl, 2003; Teissie; Golzio; Rols, 2005). Apesar de compartilharem essas características, a BLM é considerada o fármaco de escolha em protocolos de EQT, por diferentes razões, baseadas principalmente em suas características naturais e mecanismo de ação.

Naturalmente, a BLM possui uma maior dificuldade de atravessar a membrana plasmática do que a cisplatina. Sua internalização depende de uma proteína carreadora pobremente expressa na membrana celular. Combinado a isso, sua natureza hidrofílica e o tamanho de suas moléculas também limitam sua internalização natural. Porém, quando associada ao campo elétrico na EQT, as moléculas de BLM se difundem quase que por difusão passiva através da membrana, sendo sua internalização potencializada em 300 a 700x. Por sua vez, a cisplatina tem sua internalização potencializada em menor escala, cerca de 4-8x, quando associada ao campo elétrico (Mir et al., 2006^a)

O mecanismo de ação da BLM é denominado de “*morte celular mitótica*”, conferindo ao tratamento uma seletividade única. Uma vez no interior da célula, as

moléculas de BLM adentram no núcleo e levam a pequenas “quebras” no DNA celular. Essas pequenas quebras se multiplicam e se acumulam à medida que a célula se divide, culminando em uma fragmentação tão intensa do DNA que a célula não consegue mais se dividir e entra no processo de morte celular (Tounekti et al., 1993).

Considerando esse mecanismo, as células que morrem são aquelas que se replicam de forma frequente e disfuncional, sendo estas, as células neoplásicas. Dessa forma, a citotoxicidade da BLM é direcionada para as células tumorais, uma vez que as células do tecido saudável, mesmo que recebam os pulsos elétricos, permanecem saudáveis por serem quiescentes e metabolicamente estáveis (Tounekti, 1993; Mir, 2006^a; Tellado, Mir & Maglietti, 2022). Em contrapartida, o mecanismo de ação da cisplatina é por meio das vias de apoptose clássica, resultando na morte das células tumorais e saudáveis que receberam os pulsos elétricos (Mir et al., 2006^a).

Outra vantagem da BLM é a possibilidade de ser administrada pela via intravenosa, que permite uma distribuição homogênea de suas moléculas na região a ser tratada, garantindo uma melhor eficácia em tumores, múltiplos, grandes e/ou ulcerados. Além disso é uma via que confere maior segurança a administração, minimizando a contaminação pessoal e ambiental, mais comuns na aplicação intratumoral. A cisplatina, entretanto, deve ser administrada somente pela via intratumoral, devido ao maior risco de toxicidade renal e pulmonar quando aplicada pela via sistêmica (Mir et al., 2006^a; Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

O efeito antitumoral da EQT é proporcionado majoritariamente pelo efeito citotóxico direto do quimioterápico aplicado, conforme exposto. No entanto, existem mecanismos indiretos que também contribuem com a morte tumoral, denominados de efeitos imunológicos e anti-vasculares (Mir et al., 2006^a; Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

Os efeitos anti-vasculares ocorrem por duas vias principais, a imediata e a tardia. A ação imediata da EQT na vasculatura tumoral ocorre através de um processo chamado de “*vascular lock*”, resultante da vasoconstrição local e hipoperfusão transitória, com consequente encarceramento da droga no interior da área eletroporada. De forma mais tardia, a EQT também irá levar a morte das células endoteliais dos vasos sanguíneos tumorais, que também são células neoplásicas e de alta replicação, culminando na

destruição da vasculatura tumoral e consequente hipóxia (Mir, 2006^a; Sersa et al., 2008; Jarm et al., 2010).

O efeito imunológico é resultante da liberação de substâncias específicas, como os antígenos tumorais e moléculas sinalizadoras de perigo (*DAMPs*), pelas células que estão em processo de morte. Essas substâncias servem como sinalizadores, que são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos e monócitos, e apresentadas aos linfócitos T efetores nos órgãos linfáticos, estimulando a migração de células imunes para a região tumoral e a consequente morte celular imunogénica (Gerlini; Di Gennaro; Borgognoni, 2012; Calvet, 2014; Sersa, 2015).

2.7.4. Aplicação da EQT no CCE felino e humano

Assim como em felinos, o CCE é uma das neoplasias malignas cutâneas que mais afetam os seres humanos em todo o mundo, sendo também considerada como uma neoplasia localmente invasiva, que pode se tornar de difícil controle local devido ao diagnóstico tardio e estadiamento avançado (Tannehill-Gregg et al., 2006).

Nos últimos anos, a EQT surgiu como uma alternativa para o tratamento local do CCE em ambas as espécies, permitindo uma abordagem menos invasiva e bastante eficaz, preservando estruturas anatômicas importantes e obtendo respostas objetivas de 83 a 96%, em humanos e felinos, respectivamente (Mir, 2006^b; Tozon et al., 2014; Spugnini et al., 2009; Simčič et al., 2021; Bertino et al., 2022).

2.8. Fatores prognósticos

Conforme o exposto, o CCE felino e humano compartilham diversas similaridades quanto ao comportamento biológico, patogênese, fatores etiológicos e resposta a terapia (Tannehill-Gregg et al., 2006). Apesar de ser uma neoplasia considerada de baixa taxa metastática e possuir altas chances de controle e/ou cura com o tratamento local, uma parcela dos pacientes desenvolvem tumores mais agressivos, recidivantes e refratários ao tratamento.

Com o objetivo de identificar precocemente esses pacientes, diversas características histopatológicas já foram identificadas com valor prognóstico para os

humanos com CCE, incluindo a baixa diferenciação tumoral, invasão linfovascular, invasão além da derme, tamanho tumoral > 2cm, invasão perineural, entre outros (Schmuls et al., 2013). A presença desses fatores foi correlacionada com menores taxas de sobrevida, maiores taxas de metástases e de recidiva local, e por isso, classificados como pacientes de “alto risco” (Carter et al., 2013; Haugh et al., 2020).

Em contrapartida, a determinação do prognóstico em felinos com CCE se baseia em características clínicas empíricas e no estadiamento tumoral. O estadiamento tumoral, apesar de ser um fator prognóstico melhor definido, é pouco sensível em prever o prognóstico de forma precoce, limitando a identificação dos pacientes de “alto risco” em tempo hábil para instituir um tratamento e acompanhamento individualizados.

2.9.1 Invasão em bainha perineural

A invasão em bainha perineural, ou invasão perineural (IP), consiste em uma via de invasão tumoral na qual as células neoplásicas se proliferam ao longo da extensão dos nervos, no seu interior e ao seu redor, culminando na disseminação para sítios distantes. No entanto, a IP não é um processo unilateral, causado apenas por parte das células tumorais, mas envolve uma complexa e recíproca interação entre o microambiente tumoral e os componentes dos nervos (i.e. células de Schwann e neurônios). De forma geral, os fatores neurotróficos, ou neurotrofinas, são liberados pelas células tumorais no microambiente local, sendo detectados pelas células de Schwann e neurônios, que em resposta, também secretam fatores neurotróficos que promovem a proliferação, invasão e migração do tumor em direção aos nervos (Zhang et al., 2018; Chen et al., 2019; Misztal et al., 2021; Niu et al., 2022). São exemplos de neurotrofinas envolvidas neste processo: a molécula de adesão celular neuronal-1 (NCAM-1), o fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator neurotrópico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), entre outros (Figura 1). Os respectivos receptores das

neurotrofinas também são expressos pelas células tumorais e nervosas (Chen et al., 2019; Misztal et al., 2021).

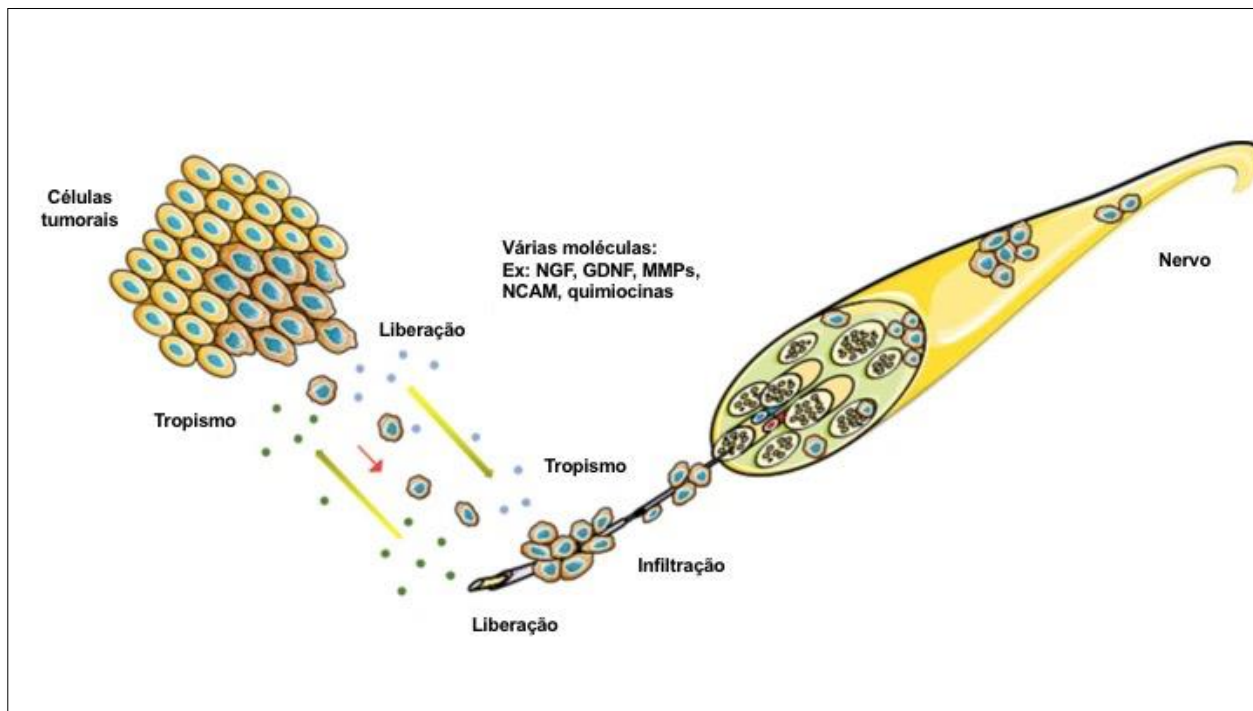


Figura 1. Representação esquemática do processo de invasão perineural. Diferentes moléculas (neurotrofinas) são liberadas pelas células tumorais e nervosas no microambiente tumoral, promovendo a migração de células tumorais em direção aos nervos e sua consequente invasão. *NGF*, fator de crescimento nervoso; *GDNF*, fator neurotrópico derivado da linhagem glial; *NCAM*, molécula de adesão celular neuronal; *MMP*, metaloproteinases de matriz (Adaptado de Zhang et al. 2018).

A IP já foi identificada como um dos marcadores de malignidade mais importantes em humanos com CCE, sendo descrita em diversos estudos e sua avaliação padronizada e obrigatória nos laudos histopatológicos (McCord et al., 2000; Clayman et al., 2005; Carter et al., 2013; Haugh et al., 2020). A incidência da IP em humanos com CCE cutâneo varia de 2,4 a 14%, aumentando para 24% em casos recidivantes. A identificação da IP também tem sido associada com a localização anatômica, grau de diferenciação, e tamanho tumoral. Segundo Campoli et al. (2014), 88,5% dos casos de CCE cutâneo estavam localizados em cabeça e pescoço e sua presença foi altamente associada a

tumores pobremente diferenciados. Por sua vez, Carter et al. (1983) demonstrou que IP esteve presente em 64% dos casos quando os tumores possuem dimensões maiores que 2,5 cm e 11% quando são menores de 2.5 cm.

No entanto, até o momento, não há investigações acerca da incidência de IP na espécie felina, e da sua associação com o comportamento tumoral e prognóstico. Assim, diante da similaridade entre o CCE humano e felino e da relevância da IP na patogênese do CCE humano, a investigação da IP em felinos representa um ponto de partida para a identificação de felinos de “alto risco”. Isso se torna imprescindível para a identificação daqueles pacientes com maiores chances de refratariedade ao tratamento e piores prognósticos, proporcionando um melhor planejamento terapêutico.

3. REFERÊNCIAS

- Berlato D, Murphy S, Laberke S, Verganti S (2018) Response, disease-free interval and overall survival of cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with a fractionated vs a single-dose protocol of strontium plesiotherapy. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 21:306-313.
- Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, Occhini A, Plaschke CC, Groselj A, Langdon C, Grau JJ, McCaul JA, Heuveling D, Cemazar M (2016) European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. **European Journal of Cancer**. 63:41-52.
- Bilgic, O., Duda, L., Sánchez, MD., & Lewis, JR. (2015). Feline oral squamous cell carcinoma: clinical manifestations and literature review. **Journal of veterinary dentistry**, 32:30-40.
- Buchholz, J. et al. (2007) Photodynamic therapy of feline cutaneous squamous cell carcinoma using a newly developed liposomal photosensitizer: preliminary results concerning drug safety and efficacy. **Journal of veterinary internal medicine**, 21:770-775.
- Buchholz, J & Walt, H. (2013) Veterinary photodynamic therapy: A review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, 10:342-34.
- 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.

Campoli M, Brodland DG, Zitelli J. (2014) A prospective evaluation of the clinical, histologic, and therapeutic variables associated with incidental perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 70:630-636.

Carter JB, Johnson MM, Chua TL, Karia PS, Schmults CD (2013) Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an 11-year cohort study. **JAMA dermatology**. 149:35-42.

Carter, RL, Foster, CS, Dinsdale, EA, & Pittam, MR (1983) Perineural spread by squamous carcinomas of the head and neck: a morphological study using antiaxonal and antimyelin monoclonal antibodies. **Journal of clinical pathology**, 36:269-275.

Chen SH, Zhang BY, Zhou B, Zhu CZ, Sun LQ, Feng YJ (2019) Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *Am. J. Cancer Res.* 9: 1.

Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK, Prieto VG, Altamirano E, Tucker SL, Strom SS, Kripke ML (2005) Mortality risk from squamous cell skin cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 23:759-65.

Escoffre JM, Rols MP (2012) Electrochemotherapy: progress and prospects. **Current pharmaceutical design**, 18:3406-3415.

Favrot C, Welle M, Heimann M, Godson DL, Guscetti F (2009) Clinical, histologic, and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma in situ. **Veterinary pathology**, 46:25-33.

Gasymova, E, Meier, V, Guscetti, F, Cancedda, S, Roos, M & Rohrer Bley, C. (2017). Retrospective clinical study on outcome in cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with an accelerated radiation protocol. **BMC veterinary research**, 13:1-8.

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

Goodfellow, M et al. (2006) A retrospective study of 90Strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. **Journal of feline medicine and surgery**, 8:169-176.

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.

Grandi F, Rondelli MCH (2016) Neoplasias Cutâneas In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodasky S, **Oncologia em cães e gatos** p. 501-511.

Hauck ML, Oblack ML (2020) Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues In: Withrow SJ, Vail DM Withrow and MacEwen's **Small Animal Clinical Oncology**, 6 ed. St Louis: Elsevier–Saunders, pp. 572–582.

Haug, K, Breuninger, H, Metzler, G, Eigentler, T, Eichner, M, Haefner, HM, & Schnabl, SM. (2020). Prognostic impact of perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma: results of a prospective study of 1,399 tumors. **Journal of Investigative Dermatology**, 140:1968-1975.

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.

McCord MW, Mendenhall WM, Parsons JT, Amdur RJ, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR (2000) Skin cancer of the head and neck with clinical perineural invasion. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**. 47:89-93.

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. Bases and rationale of the electrochemotherapy. **European Journal of Cancer Supplements**. 2006^a Nov 1;4(11):38-44.

Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, Geertsens PF, Rudolf Z, O'Sullivan GC, Marty M (2006^b) Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the CliniporatorTM by means of invasive or non-invasive electrodes. **European Journal of Cancer Supplements**. 4:14-25.

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

Mir LM, Orlowski S, Belehradek 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.

Misztal CI, et al. (2021). Molecular and cellular mechanisms of perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: potential targets for therapeutic intervention. **Cancers** 13:6011.

Moretto, AJG; Correa, F. G (2013). Radioterapia para carcinomas em animais domésticos. **Rev Cientif Eletronica Med Vet** 20:1-16.

Munday JS, Kiupel M. (2010) Papillomavirus-associated cutaneous neoplasia in mammals. **Veterinary pathology**, 47:254-64.

Murphy S. (2013) Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. **Journal of feline medicine and surgery**. 15:401-7.

Nespeca G, Grest P, Rosenkrantz WS, Ackermann M, Favrot C (2006) Detection of novel papillomaviruslike sequences in paraffin-embedded specimens of invasive and in situ squamous cell carcinomas from cats. **American journal of veterinary research**, 67:2036-2041.

Niu Y, Foerster S, & Muders M (2022) The role of perineural invasion in prostate cancer and its prognostic significance. **Cancers**, 14:4065.

O'Neill SH, Newkirk KM, Anis EA, Brahmabhatt R, Frank LA, Kania SA (2011) Detection of human papillomavirus DNA in feline premalignant and invasive squamous cell carcinoma. **Veterinary Dermatology**, 22:68-74.

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

Piipponen M, Riihilä P, Nissinen L, Kähäri VM (2021) The role of p53 in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. **Cancers**, 13:4507.

Prado, LOC et al. (2017). Evaluation of the cryosurgery for treatment of squamous cell carcinoma in cats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 69:877-882.

Pucket, JD & Gilmour, MA (2014) Intralesional 5-fluorouracil (5-FU) for the treatment of eyelid squamous cell carcinoma in 5 horses. **Equine Veterinary Education**, 26:333-335.

Renzi, A et al. (2019) Prevalence of p53 dysregulations in feline oral squamous cell carcinoma and non-neoplastic oral mucosa. **Plos one** 14:e0215621.

Rosolem MC, Moroz LR, Rodigheri SM (2012) Carcinoma de células escamosas em cães e gatos: Revisão de literatura. **PUBVET**, 6:1299.

Ribeiro, RCS, Anjos, DS, Pazzini, JM, Bertolo, PHL, Carra, GJU, & Nardi, ABD (2023) Evaluation of cell proliferation and apoptosis markers as predictive factors for electrochemotherapy in cutaneous squamous cell carcinoma of cats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 43:e06518.

Schmults, CD, Karia, PS, Carter, JB, Han, J., & Qureshi, AA (2013) Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. **JAMA dermatology**, 149:541-547.

Sequeira, I, Pires, MDA, Leitão, J, Henriques, J, Viegas, C, & Requicha, J (2022) Feline oral squamous cell carcinoma: a critical review of etiologic factors. **Veterinary Sciences**, 9:558.

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.

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 et al. (2015). Electroporation Enhances Bleomycin Efficacy in Cats with Periocular Carcinoma and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head. **J Vet Intern Med.** 29(5):1368-75.

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

Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Tonini G, Dotsinsky I, Mudrov N, Baldi A (2009) Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report. **The Veterinary Journal** 179:117–120.

Tannehill-Gregg, SH, Levine, AL, & Rosol, TJ (2006) Feline head and neck squamous cell carcinoma: a natural model for the human disease and development of a mouse model. **Veterinary and Comparative Oncology**, 4:84-97.

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, M, Mir, LM, & MAGLIETTI, F (2022) Veterinary Guidelines for Electrochemotherapy of Superficial Tumors. **Frontiers in Veterinary Science**, 9:868989.

Thomson, M (2007). Squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats and dogs. **Clin. Techn. Small Anim. Pract.** 22:42-45.

Tounekti O, Pron G, Belehradek 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.

Villalobos A, Kaplan L. (2011) **Oncologia em Cães e Gatos Geriátricos**, 1 ed. São Paulo: Rocca, pp. 430.

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.

Zhang, M., Zhu, Z. L., Gao, X. L., Wu, J. S., Liang, X. H., & Tang, Y. L. (2018). Functions of chemokines in the perineural invasion of tumors. **International Journal of Oncology** 52: 1369-1379.

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

CAPÍTULO 2 – Avaliação retrospectiva da invasão perineural como fator preditivo de recidiva local em felinos com carcinoma de células escamosas tratados com eletroquimioterapia

RESUMO - O carcinoma de células escamosas (CCE) é considerado uma neoplasia maligna que compreende cerca de 15-25% de todos os tumores cutâneos e de 70-80% de todos os tumores orais em felinos. Assim como em humanos, o CCE felino é caracterizado por um comportamento altamente invasivo localmente, entretanto, apresenta baixas taxas metastáticas. Diante disso, o tratamento local efetivo pode ser considerado curativo para a maioria dos pacientes, incluindo principalmente a cirurgia, a eletroquimioterapia (EQT), a criocirurgia ou a combinação destes. Ainda assim, essa doença pode se manifestar de forma mais agressiva em uma parcela dos pacientes, culminando em maiores taxas de recidiva, mesmo quando tratados adequadamente. Em humanos, a invasão perineural (IP) já foi descrita como uma importante via de disseminação tumoral, sendo associada ao CCE cutâneo e oral de alto risco, o que confere uma maior agressividade tumoral, culminando em maiores taxas metastáticas e de recidiva, maior resistência a terapias locais e menores tempos de sobrevivência. Em contrapartida, a IP em felinos com CCE ainda não foi descrita, assim como seu valor prognóstico. O presente estudo objetivou avaliar a IP em uma população de felinos com CCE tratados com EQT, correlacionando sua presença com a ocorrência de recidiva local e outras variáveis clínicas. Foram selecionados de forma retrospectiva 24 felinos com o diagnóstico histopatológico de CCE atendidos no centro oncológico Vet Câncer (São Paulo, SP, Brasil), durante o período de 2013 a 2021. A instituição da EQT como terapia única, a avaliação histopatológica da IP e a ausência de metástases a distância, foram padronizados como os critérios de inclusão. Dados referentes a presença de IP, resposta inicial a terapia, ocorrência de recidiva e efeitos adversos foram obtidos a partir dos prontuários clínicos. A taxa de resposta completa inicial foi de 96% (23/24). A IP foi identificada em 33% dos gatos (8/24 - grupo IP positivo), enquanto que 67% estavam livres desta invasão (16/24 - grupo IP negativo). Todos os pacientes do grupo IP positivo apresentaram recidiva local, enquanto que apenas 5 pacientes do grupo IP negativo recidivaram. Assim, o índice de recidiva foi significativamente maior nos felinos com IP do que os sem IP ($p=0,03$). Esses resultados são os primeiros acerca da IP em felinos com CCE e servem de premissa para que novos estudos sejam realizados, principalmente a fim de correlacionar a presença de IP com dados de sobrevivência e melhor definição de seu valor prognóstico.

Palavras-chave: Neoplasia cutânea; Oncologia; Bainha nervosa; Prognóstico; Gato.

Retrospective evaluation of perineural invasion as a predictive factor of local recurrence in cats with squamous cell carcinoma treated with electrochemotherapy

ABSTRACT – Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant neoplasia, which represents, approximately, 15-25% of all feline cutaneous tumors and 70-80% of all feline oral tumors. As in humans, feline SCC is characterized to be highly invasive locally, however, its metastatic rate is low. In front of this, an effective local treatment can be considered curative for the majority of the patients, and includes surgery, electrochemotherapy (ECT), cryosurgery, or a combination of them. Still, this neoplasia can be manifested more aggressively in a portion of patients, leading to higher recurrence rates, even if treated properly. In humans, the presence of perineural invasion (IP) has already been described as a relevant tumor dissemination route, being associated to the high-risk CCE and higher tumor aggressiveness, which results in higher metastatic and recurrence rates, resistance to local treatments and short survivals. However, IP has not been described in felines with CCE, as well as its prognostic value. This study aimed to evaluate the IP occurrence in a feline population with CCE treated with ECT, correlating its presence with the occurrence of local recurrence and other clinical variables. Twenty-four cats, with histopathological diagnosis of SCC, were retrospectively selected from the clinical records of the oncological center Vet Cancer (São Paulo, SP, Brazil), between 2013 and 2021. ECT as sole therapy, histopathological evaluation of IP, and absence of distant metastatic disease were the inclusion criteria. Data regarding to IP presence, initial response to therapy, local recurrence and adverse events were collected from the clinical records. Complete response rate was 96% (23/24). IP was identified in 33% of the cats (8/24 – IP-positive group), while 67% were free of this invasion (16/24 – IP-negative group). All the IP-positive patients developed local recurrence, while only 5 patients IP-negative recurred. Thus, the recurrence was significantly higher in cats IP-positive than those IP-negative ($p=0,03$). The data obtained are the first regarding IP occurrence in cats with SCC and paves the road for new studies to be developed, mainly to correlate the IP with survival data and better definition of its prognostic value.

Keywords: Cutaneous neoplasia; Oncology; Nervous sheath; Prognosis; Cat.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células (CCE) é considerado um dos três tumores mais incidentes na pele de felinos, representando cerca de 15 a 25% de todas as neoplasias cutâneas nessa espécie. Além disso, o CCE é considerado a neoplasia oral mais comum em felinos (Murphy et al., 2013; Berlato et al., 2018; Hauck; Oblack, 2020).

A etiologia do CCE cutâneo está intimamente associada a exposição crônica a radiação ultravioleta (UV) e os felinos de pelagem clara e glabra tem alta predisposição ao seu desenvolvimento, devido a menor proteção natural da pele aos raios UV (Thomson, 2007). Os sítios anatômicos mais comumente acometidos incluem regiões da cabeça, como pina da orelha, têmporas, plano nasal e região periocular, devido a menor cobertura pilosa e por serem regiões mais expostas ao sol (Murphy et al., 2013; Hauck; Oblack 2020).

O CCE é uma neoplasia com comportamento invasivo localmente, podendo destruir tecidos adjacentes ao tumor, como ossos e cartilagem. No entanto, sua capacidade metastática é considerada baixa e de desenvolvimento lento. Apesar disso, pode metastatizar por via linfática ou hematógena, sendo os principais sítios os linfonodos regionais e pulmões (Hauck; Oblack, 2020).

Os principais fatores que influenciam na decisão terapêutica são a localização e o estadiamento tumoral, que inclui o tamanho e extensão da lesão (Owen, 1980). Diante da menor propensão a disseminação metastática, o tratamento local é considerado a principal modalidade terapêutica no CCE cutâneo, incluindo principalmente a cirurgia, radioterapia, crioterapia e eletroquimioterapia (Murphy et al., 2013; Moretto *et al.*, 2013; Prado et al., 2017; Simčič et al., 2021). A cirurgia é considerada o tratamento que oferece maiores taxas de cura local, no entanto, a obtenção de margens de segurança se torna muito difícil em alguns casos, devido a localização complexa das lesões e ao estadiamento avançado (T3 e T4) ao diagnóstico (Murphy et al., 2013; Simčič et al., 2021).

A eletroquimioterapia (EQT) representa uma abordagem terapêutica local, já padronizada para o tratamento de humanos e felinos com CCE. A EQT se destaca por

sua eficácia e seletividade, que proporciona a destruição das células tumorais, ao mesmo tempo que preserva o tecido saudável adjacente, garantindo o tratamento das margens da lesão. Tal efeito proporciona maiores chances de conservação cosmética, anatômica e funcional do paciente. No entanto, assim como na cirurgia, o resultado também depende da extensão da lesão (Mir et al., 2006; Tozon et al., 2016; Simčič et al., 2021).

Apesar das diferentes possibilidades terapêuticas locais, uma parcela de pacientes humanos e felinos apresentam o CCE na sua forma mais agressiva e recidivante, mesmo com a instituição de terapias adequadas. Diferentes características histopatológicas já foram identificadas em pacientes humanos, associadas com piores prognósticos, classificando-os como pacientes de “alto risco” (Schmults et al., 2013; Carter et al., 2013; Haug et al., 2020). Dentre essas características, a invasão perineural (IP) ganha destaque, sendo considerado um dos marcadores de malignidade mais importantes nos humanos acometidos, associada a maiores taxas de recidiva local, metástases e piores prognósticos (McCord et al., 2000; Clayman et al., 2005; Carter et al., 2013; Haug et al., 2020). A IP é considerada uma complexa e recíproca via de disseminação tumoral que envolve interações dinâmicas entre as células tumorais e os componentes nervosos (e.g. células de Schwann e neurônios), culminando na migração, invasão e proliferação tumoral ao redor e no interior dos nervos (Misztal et al., 2021)

Em contrapartida, poucos fatores prognósticos foram estabelecidos para felinos com CCE, sendo o principal deles o estadiamento clínico e tumoral. No entanto, o estadiamento avançado é um marcador prognóstico tardio, quando poucas opções de controle local restam (Tozon et al., 2014; Simčič et al., 2021). Assim, é imprescindível a investigação por fatores prognósticos que otimizem identificação precoce dos felinos que possam apresentar maior risco de refratariedade ao tratamento e pior prognóstico, permitindo melhor planejamento terapêutico.

Assim, o presente estudo teve como objetivo primário avaliar a invasão perineural no CCE felino, e correlacionar sua presença com a ocorrência de recidiva local e outras variáveis clínicas, em uma população de felinos com CCE tratados com EQT.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente estudo clínico retrospectivo foi realizado de acordo com as diretrizes e regulamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/FCAV), Jaboticabal/SP (nº de protocolo 9849/2023).

Seleção de animais

Os prontuários clínicos dos felinos atendidos no centro oncológico Vet Câncer (São Paulo, SP, Brasil), durante o período de 2013 a 2021, foram avaliados retrospectivamente a fim de identificar os felinos com o diagnóstico de carcinoma de células escamosas (CCE), tratados com eletroquimioterapia (EQT). Os critérios para a inclusão dos animais no estudo foram o diagnóstico histopatológico de CCE, avaliação histopatológica da invasão em bainha perineural e a instituição da EQT como tratamento único. Como critérios de exclusão, foram considerados a presença de metástases a distância ao diagnóstico e pacientes submetidos a cirurgia, ou outros tratamentos locais e sistêmicos, associados a EQT.

Os dados coletados dos prontuários incluíram idade, gênero, raça, localização e número das lesões, avaliação de metástases a distância (ultrassonografia abdominal e radiografia de tórax), protocolo de EQT utilizado, número de sessões de EQT, efeitos adversos, resposta inicial a EQT e ocorrência de recidiva local. Informações sobre o tamanho tumoral, resposta a EQT após a recidiva, tempo livre de doença e tempo de sobrevida não estavam disponíveis para todos os pacientes, e por isso, não foram incluídas neste estudo.

Todos os laudos histopatológicos foram revisados para coleta de informações acerca do diagnóstico e presença de invasão em bainha perineural. A partir disso, os felinos eram divididos em dois grupos: Grupo IP positivo, para aqueles em que foi

detectada a invasão perineural; e Grupo IP negativo, para aqueles em que a invasão perineural não foi detectada.

O diagnóstico foi obtido através da análise histopatológica transoperatória em todos os pacientes do estudo, e logo após a confirmação diagnóstica, a EQT era aplicada. Todos os procedimentos foram realizados com os felinos sob anestesia geral. Para a indução anestésica foi utilizado propofol (Lipuro® 10 mg/ml; Braun, Melsungen, Alemanha) por via intravenosa, na dose de 5 mg/kg, seguido por intubação endotraqueal. Para a manutenção anestésica foi utilizado isoflurano (Genérico, Laboratório Biochimico, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil).

Avaliação histopatológica transoperatória

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). Em seguida, os cortes foram corados com azul de toluidina e analisados ao microscópio de luz (Nikon YS2).

A amostra tumoral foi mantida em solução de formol a 10% para o processamento convencional e análise posterior em lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina para confirmação e descrição mais detalhada das características morfológicas da neoplasia, incluindo a avaliação da invasão perineural. Para a avaliação da IP foi considerada a área padrão de 2.37 mm² e o número de campos variou entre 12 e 15 (400x). A amostra foi considerada “IP positiva” quando havia a presença de células tumorais invadindo o nervo (Figura 2). Todas as avaliações histopatológicas, por congelação e convencional, foram realizadas pelo mesmo patologista certificado.

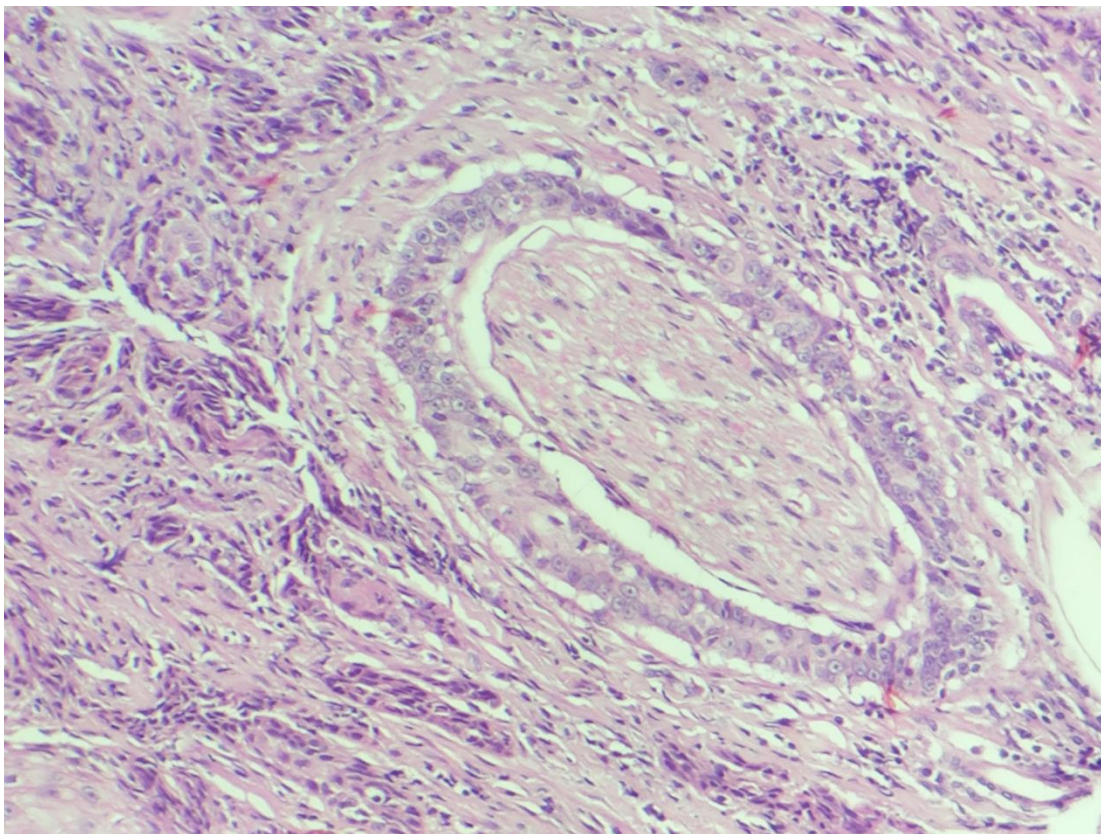


Figura 2. Fotomicrografia histológica de paciente felino com CCE (IP positivo), apresentando células tumorais totalmente ao redor do nervo e em seu interior (H&E).

Protocolo de eletroquimioterapia

A EQT iniciou-se com a aplicação intravenosa da bleomicina (Bleovet®), na dose de 15,000 UI/m², diluída em 5 mL de solução salina. Após 8 minutos, os pulsos elétricos eram aplicados por toda a extensão da lesão, assim como nas margens saudáveis circundantes, durante uma janela de tempo de 40 minutos, segundo as recomendações de Tellado, Mir e Maglietti (2022).

O protocolo de eletroporação instituído consistiu na aplicação de 8 pulsos elétricos de alta voltagem, com tensão de 1300 V/cm, frequência de 5Khz e duração de 100 µs, para cada disparo realizado. O aparelho gerador de pulsos utilizados foi o VETCP 125® (VET CÂNCER/IMPLASTIC, São Paulo, SP - Brasil), o qual é composto por duas

seqüências de três agulhas de aço inoxidável (1,1 mm de espessura cada), equidistantes por 5 mm e com distância de 3 mm entre as agulhas ipsilaterais.

Após a conclusão do procedimento, os pacientes recebiam dipirona (25 mg/kg, IV, dose única) e cetoprofeno (1 mg/kg, VO, dose única). Na ausência de complicações, os pacientes recebiam alta com a prescrição domiciliar de dipirona (25 mg/kg, VO, SID, 3-5 dias), cetoprofeno (1 mg/kg, VO, SID, 3-5 dias) e amoxicilina com clavulanato de potássio (15 mg/kg, VO, BID, 7 dias).

Os animais foram examinados nos dias 7, 14, 21 e 30 após o procedimento, e depois a cada 30 dias. Em cada retorno, era realizado o exame clínico geral do paciente, assim como a coleta de exames laboratoriais, incluindo hemograma completo e dosagens bioquímicas (creatinina, uréia, ALT e FA). Os exames de ultrassonografia abdominal e radiografia torácica eram realizados a cada três meses, para fins de estadiamento, ou de acordo com a necessidade do animal.

Avaliação de resposta

De acordo com o critério de avaliação de resposta RECIST (Eisenhauer et al., 2009), a resposta local foi categorizada em: RC (resposta completa) - desaparecimento completo da lesão; RP (resposta parcial) - redução da lesão em mais de 30%; DE (doença estável) - a lesão não aumenta mais de 20% nem diminui em mais de 30%; DP (doença progressiva) - aumento da lesão em mais de 20%.

A avaliação da resposta foi realizada 30 dias após cada sessão de EQT e uma nova sessão era recomendada se ainda houvesse evidência de lesão macroscópica. Em casos em que foram identificadas pequenas áreas suspeitas de lesão neoplásica, uma nova biópsia incisional era realizada para confirmação e planejamento de nova sessão de EQT.

Avaliação de segurança

Os efeitos adversos e toxicidade local foram classificados utilizando um escore de toxicidade de 6 pontos, desenvolvido por Lowe et al., onde: 0 - sem toxicidade, 1 - edema

leve, 2 - edema moderado/necrose < 1cm, 3 - edema severo, 4 - necrose profunda e 5 - edema severo e perda tecidual.

Análise estatística

A presença de invasão da bainha perineural, índice de recidiva e escore de toxicidade foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, não havendo distribuição normal, o teste de Wilcoxon será utilizado para a comparação das variáveis. Ademais, os grupos com e sem acometimento da bainha perineural foram submetidos a Análise de Componentes Principais (ACP), de acordo com a presença da IP e taxa de recidiva. Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa de software R® (versão 4.2.2, 2022), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Neste estudo foram selecionados 24 felinos com um total de 30 lesões de CCE diagnosticadas por meio do exame histopatológico. Destes, 96% (23/24) eram sem raça definida (SRD), e apenas um (4%) era da raça Angorá. As fêmeas foram mais acometidas (62.5% - 15/24) do que os machos (37.5% - 9/24), e a idade média geral ao diagnóstico foi de 11 anos. Dos 18 pacientes em que a informação acerca da coloração da pelagem estava disponível nos prontuários, 88% (16/18) possuíam pelagem branca, parcialmente (50%; 8/16) ou totalmente (50%; 8/16), e apenas um paciente era de pelagem de cor (preta) (Tabela 1).

A invasão em bainha perineural foi identificada em 33% dos gatos (8/24 - grupo IP positivo), enquanto que 67% estavam livres desta invasão (16/24 - grupo IP negativo) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados clínicos e de tratamento nos 24 felinos com CCE incluídos no estudo

Paciente #	Gênero/Idade (anos)	Coloração de pelagem	Localização tumoral	Invasão perineural	Total de sessões de EQT	Resposta inicial	Recidiva
1	F/8	Branco e amarelo	Região mentoniana	Sim	1	RC	Sim
2	F/11	Branco e preto	Lábio	Sim	2	RC	Sim
3	M/14	Branco	Orelha	Sim	1	RC	Sim
4	M/13	NE	Plano nasal	Sim	4	RC	Sim
5	F/13	Branco	Orelha	Sim	1	RC	Sim
6	M/11	Branco e cinza	Canto do olho	Sim	8	RC	Sim
7	M/8	Branco	Face (NE)*	Sim	4	RC	Sim
8	M/14	Branco e amarelo	Lábio	Sim	3	RC	Sim
9	F/9	Branco	Plano nasal	Não	1	RC	Nao
10	M/13	Branco	Plano nasal	Não	2	RC	Sim
11	F/5	Branco e preto	Região mentoniana	Não	2	RC	Sim
12	F/9	Preto	Cavidade oral	Não	1	RC	Não
13	F/9	Bege	Múltiplos sítios ^a	Não	2	RC	Sim
14	F/16	NE	Orelha	Não	2	RC	Não
15	M/5	Branco e preto	Múltiplos sítios ^b	Não	2	RC	Sim
16	F/8	NE	Cavidade nasal	Não	1	RC	Não
17	M/12	Branco	Múltiplos sítios ^c	Não	1	RP	Não
18	M/14	Branco	Orelha	Não	1	RC	Não
19	M/12	Branco, amarelo e cinza	Orelha	Não	1	RC	Não
20	F/8	NE	Plano nasal	Não	1	RC	Não
21	F/15	NE	Plano nasal	Não	1	RC	Nao
22	M/14	NE	Pálpebra	Não	1	RC	Nao
23	F/12	Branco	Orelha	Não	1	RC	Sim
24	F/6	Branco, preto e amarelo	Orelha	Não	1	RC	Não

^aPlano nasal, região mentoniana; ^bPlano nasal, olho, cavidade nasal, lábio; ^cPlano nasal, têmporas, pálpebra.

* F: Fêmea; M: Macho; NE: Não especificado; EQT: Eletroquimioterapia; RC: Resposta completa; RP: Resposta parcial.

O número de sessões de EQT realizadas variou de uma a oito sessões (Tabela 1). Dos 24 felinos selecionados, 13 (54,2%) passaram por uma sessão; 7 (29,2%) por duas sessões; 1 (4,2%) por três sessões, 2 (8,4%) por quatro sessões e 1 (4,2%) por oito sessões. Todos os pacientes do grupo IP negativo passaram por 1 a 2 sessões de EQT (11 pacientes, 1 sessão e 5 pacientes, 2 sessões). Em contrapartida, no grupo de pacientes IP positivo, 50% dos pacientes passaram por 1 a 2 sessões (3 pacientes, 1 sessão e 1 paciente, 2 sessões), enquanto que os outros 50% passaram por 3 a 8 sessões (1 paciente, 3 sessões; 2 pacientes, 4 sessões e 1 paciente, 8 sessões) (Figura 3A).

Dos 24 pacientes, 23 (96%) alcançaram RC inicialmente, e apenas um alcançou RP (grupo IP negativo), resultando em uma taxa de resposta global inicial de 100%. No entanto, posteriormente à obtenção da RC, a recidiva local da doença ocorreu em 13 pacientes, resultando em uma taxa de recidiva global de 54%.

Cinco dos 13 pacientes que sofreram recidiva local (38,4%) eram do grupo IP negativo, resultando em uma taxa de recidiva de 31% (5/16) neste grupo. Em contrapartida, todos os 8 pacientes do grupo IP positivo, sofreram recidiva, resultando em uma taxa de recidiva de 100% (8/8) neste grupo (Figura 3B). Diante disso, considerando o Teste de Wilcoxon, o índice de recidiva local foi significativamente maior nos felinos com IP do que aqueles sem IP ($p=0.03$). Ainda, de acordo com a ACP, pôde-se verificar que existe um agrupamento por similaridade de acordo com a presença de IP (grupos IP positivo e IP negativo) e taxa de recidiva, confirmando-se que há diferença significativa entre estas variáveis (Figura 4).

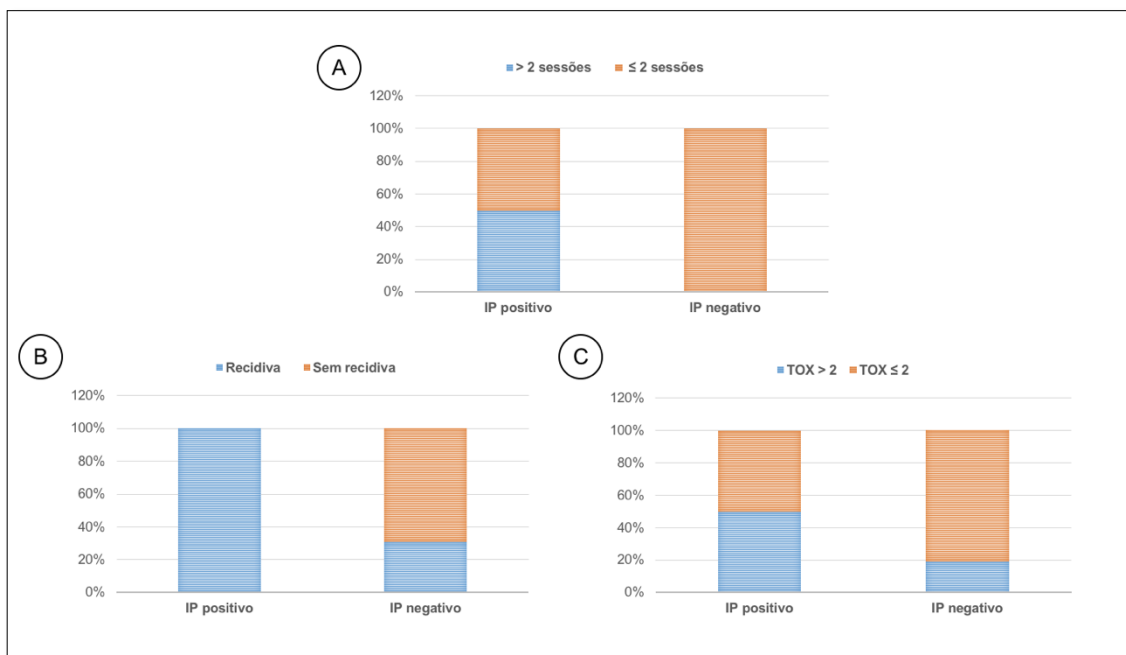


Figura 3. Distribuição do número de sessões (A), ocorrência de recidiva (B) e escore de toxicidade (TOX) (C) entre os grupos com e sem IP. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o escore TOX ($p = 0.21$) e a ocorrência de recidiva ($p = 0.03$) entre os grupos.

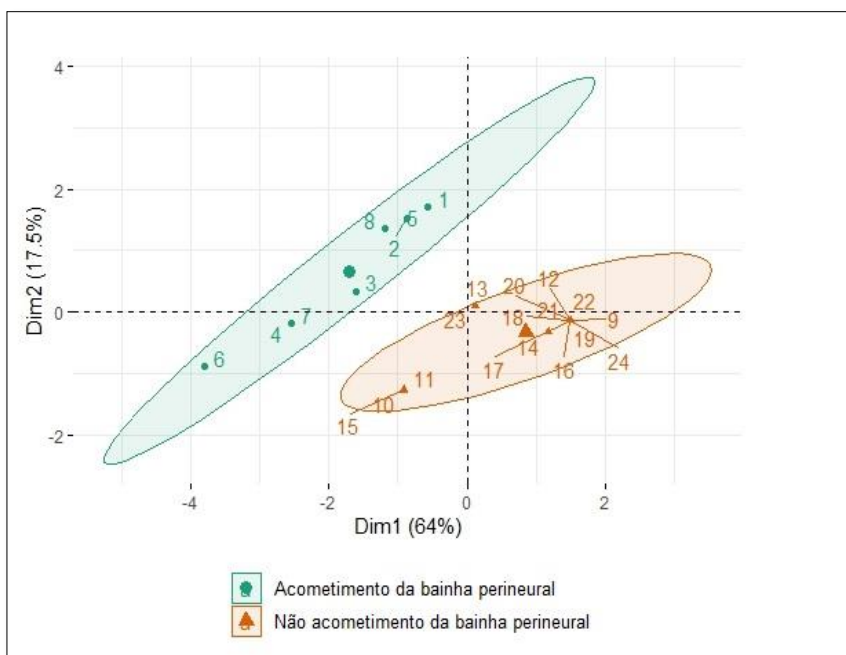


Figura 4. Diferença significativa entre os grupos utilizando a Análise de Componente Principal (ACP). As variáveis consideradas foram a presença de IP e a taxa de recidiva.

Com relação à localização anatômica, todos os felinos apresentaram lesões tumorais em região de cabeça. Dos 24 felinos, 20 desenvolveram lesão em apenas um sítio anatômico e três felinos desenvolveram múltiplas lesões (duas ou mais) em diferentes sítios da cabeça. De forma geral, as regiões mais acometidas foram plano nasal (33%; 8/24) e orelha (29%; 7/24). As regiões restantes incluíram cavidade oral, lábio, cavidade nasal, pálpebra, canto do olho, olho, região temporal e mentoniana (Tabela 1 e 2). No grupo IP negativo, os sítios mais acometidos foram plano nasal (7/16; 44%) e orelha (5/16; 31%). No grupo IP positivo, as regiões de orelhas e lábios representaram 50% dos sítios anatômicos afetados, com dois pacientes para cada (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das lesões tumorais de acordo com a localização entre os grupos com e sem invasão perineural

Localização tumoral	Lesões (n)	Total (%)	Grupo IP positivo (n=8)	Grupo IP positivo (%)	Grupo IP negativo (n=16)	Grupo IP negativo (%)
Plano nasal	8	26,7	1	12,5	7	44
Orelha	7	23,3	2	25	5	31
Lábio	3	10	2	25	1	6,2
Cavidade oral	1	3,3	0	0	1	6,2
Cavidade nasal	2	6,7	0	0	2	12,5
Pálpebra	2	6,7	0	0	2	12,5
Olho	1	3,3	0	0	1	6,2
Canto do olho	1	3,3	1	12,5	0	0
Têmpora	1	3,3	0	0	1	6,2
Região mentoniana	3	10	1	12,5	2	12,5
Não especificada	1	3,3	1	12,5	0	0
Número de lesões	30	100	8	-	22	-

No que se refere a segurança do tratamento, nenhum paciente veio a óbito decorrente da toxicidade local desenvolvida, assim como nenhum paciente veio a óbito decorrente do procedimento. De forma geral, o escore de toxicidade (TOX) foi ≤ 2 em 16,5% dos pacientes (4/24) e > 2 em 67% (16/24). Não foi possível classificar o escore TOX em quatro pacientes deste estudo, devido a ausência de informações nos registros clínicos que fossem suficientes para a classificação (Tabela 3). Dos 16 pacientes que apresentaram TOX > 2 , 5 eram do grupo IP positivo (5/8; 62,5%) e 11 do grupo IP negativo (11/16; 68,7%) (Figura 3C). E ainda, dos 13 pacientes que recidivaram, 8 apresentaram TOX > 2 , enquanto que dos 11 pacientes que não recidivaram, também 8 apresentaram TOX > 2 . De acordo com o teste de Wilcoxon, não houve correlação estatística significativa entre o TOX e a ocorrência de IP ($p = 0.21$) e de recidiva ($p = 0.42$).

Tabela 3. Classificação do escore de toxicidade (TOX) de acordo com a presença de IP.

	Escore TOX ¹					
	1	2	3	4	5	NE ²
<i>Grupos</i>						
IP positivo (n)	0	2	4	0	1	1
IP negativo (n)	1	1	5	3	3	3
Total n (%)	(4%)	3 (12,5%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)	4 (16,6%)	4 (16,6%)

Resultado não foi significativo ($p=0.21$) para diferenças entre os dois grupos (IP negativo e IP positivo) de acordo com o escore TOX, utilizando o teste de Wilcoxon.

¹Lowe et al., 2017; ²NE: não especificado.

DISCUSSÃO

A identificação de pacientes humanos com carcinoma de células escamosas de alto risco se baseia em diferentes fatores, incluindo a profundidade de invasão, a diferenciação tumoral e a invasão perineural (IP). A IP foi identificada como um dos

marcadores de malignidade mais importantes em pacientes humanos com CCE cutâneo e oral, sendo associada a um pior prognóstico, altas taxas de recidiva local (16-45%) e de metástase em linfonodos (10-50%) (Karia et al., 2017).

Apesar da IP ser um fator prognóstico bem definido e padronizado em humanos com CCE, ainda não há estudos que avaliem sua ocorrência em felinos acometidos pela neoplasia. Assim, esse estudo objetivou avaliar, de forma retrospectiva, a ocorrência da IP em um grupo de felinos com CCE e correlacionar sua presença com a ocorrência de recidiva local e outras variáveis clínicas.

Para fins de padronização, todos os pacientes selecionados neste estudo receberam a eletroquimioterapia (EQT) como tratamento local único. Atualmente, a EQT é considerada uma opção de tratamento local de primeira linha para felinos com CCE, permitindo uma abordagem mais conservadora e com notória eficácia, proporcionando respostas objetivas que variam de 83 a 97%, em humanos e felinos, respectivamente (Mir, 2006^b; Simčič et al., 2021; Bertino et al., 2022).

A abordagem cirúrgica também é considerada uma modalidade terapêutica local efetiva e oferece grandes chances de cura local da doença, principalmente em lesões em estágio mais precoces (T1 e T2), com destaque para lesões localizadas em pina de orelha (Murphy et al., 2013). Lana et al. (1997) avaliou diferentes modalidades de tratamentos locais (cirurgia, radioterapia e criocirurgia) em 61 felinos com CCE em plano nasal e pina, com a cirurgia proporcionando o maior tempo livre de doença, de 594 dias. No entanto, ainda não há estudos que comparem a eletroquimioterapia com a cirurgia, radioterapia ou criocirurgia em felinos com CCE.

Dos 18 pacientes em que foi possível identificar a coloração da pelagem a partir dos prontuários clínicos, 17 (94%) desenvolveram CCE primariamente cutâneo, sendo de pelagem parcialmente ou totalmente branca. Em contrapartida, apenas um paciente era de pelagem de cor (preta), sendo também o único que desenvolveu CCE extra-cutâneo, de forma primária, em cavidade oral (Paciente #12). A radiação solar é considerada o fator etiológico mais bem estabelecido no CCE felino cutâneo, justificando a sua maior prevalência em felinos de pelagem clara ou branca, e em região de cabeça, corroborando com os dados deste estudo. No entanto, o CCE oral não possui natureza

actínica e sua etiologia é distinta, sendo comum seu desenvolvimento também em animais de pelagem escura.

Dentre 24 felinos deste estudo, 23 (96%) alcançaram RC inicialmente, sendo proporcionalmente similar à taxa de RC de 81,8% (9/11) obtida no estudo de Tozon et al. (2014), que avaliou prospectivamente 11 felinos com CCE superficial tratados com EQT. Similarmente, Spugnini et al. (2015) obteve uma taxa de RC de 80.7% em gatos com lesões de CCE periocular e lesões avançadas de CCE na cabeça. Por sua vez, Simčič et al. (2021) obteve uma taxa de RC de 65% em 61 gatos com CCE em plano nasal. Entretanto, essa comparação deve ser feita com cautela diante da diferença do tamanho amostral entre os estudos.

No presente estudo, a recidiva local ocorreu em 13 dos 23 pacientes que obtiveram RC, resultando em uma taxa de recidiva 54%. Essa taxa pode ser considerada alta quando comparada às taxas de recidiva obtidas em outros estudos, que variaram de 18% a 22,5%. (Tozon et al., 2016; Simčič et al., 2021). No entanto, a heterogeneidade entre a localização tumoral e estadiamento das lesões entre diferentes populações de felinos nestes estudos podem ter influenciado nestes resultados, tornando complexa uma comparação fidedigna.

Ainda referente a recidiva local, todos os pacientes do grupo IP positivo sofreram recidiva após a obtenção da RC (8/8), enquanto que apenas 31,2% (5/16) dos pacientes do grupo IP negativo recidivaram. Assim, o índice de recidiva local foi significativamente maior em felinos com IP ($p=0,03$). Conforme o exposto, não há dados na literatura vigente que avaliem a ocorrência da IP em felinos com CCE, sendo este, os primeiros resultados preliminares obtidos acerca de tal avaliação e sua correlação com a recidiva local. Em humanos com CCE cutâneo e oral, a presença da IP é fortemente associada com maiores taxas de recidiva local (Rahima et al., 2004; Carter et al., 2013; Haug et al., 2020), corroborando com os resultados preliminares deste estudo.

Apesar da alta taxa de recidiva, todos os felinos com IP apresentaram uma resposta inicial satisfatória (100% RC). Devido a falta de informações acerca dos mecanismos que levam a IP em felinos com CCE, é difícil determinar as causas para tal fato. No entanto, é possível sugerir duas hipóteses: 1) a resposta inicial favorável pode

ser devido a alta eficácia da EQT sobre as células tumorais, independente do grau de malignidade e 2) a IP pode ser um processo inicialmente brando, no entanto, uma via de disseminação progressiva, silenciosa, e de difícil controle, resultando na permanência da doença microscópica, o que culminaria em uma recidiva local posterior.

Os resultados ainda demonstraram que foram necessárias mais sessões de EQT (3 a 8 sessões) para a obtenção de RC em metade dos pacientes do grupo IP positivo, em comparação com o grupo sem IP, em que todos os pacientes passaram por 1 a 2 sessões. Esse dado pode sugerir uma possível participação da IP nos mecanismos de resistência e malignidade do CCE. Dessa forma a instituição de um maior número de sessões para o controle da doença e um acompanhamento mais cauteloso, pode ser recomendada nestes pacientes, mesmo após a obtenção da RC.

Apesar de 83% das lesões (25/30) serem de CCE cutâneo, três felinos com acometimento oral e intranasal também foram inclusos (Tabela 2). Esses pacientes desenvolveram CCE primariamente na cavidade oral (Paciente #12; região gengival de mandíbula esquerda, envolvendo o molar caudal), e na cavidade nasal (Paciente #16). O outro paciente apresentou lesões em cavidade nasal e plano nasal concomitantes (Paciente #15), não sendo possível determinar se a doença intranasal foi resultado de uma progressão do CCE cutâneo ou se foi primário. No estudo de Tozon et al. (2013), a localização da lesão (orelha x plano nasal) não influenciou na resposta a EQT, exceto por dois pacientes que apresentaram doença progressiva posterior para cavidade nasal e oral. Em comparação, no presente estudo, apenas um paciente (Paciente #2; grupo IP positivo; Tabela 2) apresentou curso similar da doença, com uma lesão inicial em lábio superior, que recidivou e progrediu para cavidade nasal e oral.

É importante ressaltar que o CCE oral é considerado o tumor de cavidade oral mais comum em gatos, sendo uma neoplasia de comportamento mais agressivo e com pior prognóstico, quando comparado ao CCE cutâneo. Além disso, também apresentam menores taxas de sobrevida e de resposta aos tratamentos instituídos (Tozon et al., 2013; Bilgic et al., 2015). Por sua vez, o CCE intranasal representa cerca de 10% de todas as neoplasias intranasais em gatos, possui comportamento localmente invasivo, e por exigir uma abordagem cirúrgica mais complexa, o controle local efetivo se torna ainda mais

difícil do que no CCE cutâneo (Mukaratirwa et al., 2001). Assim como em felinos, o CCE oral em humanos é uma neoplasia de maior agressividade quando comparado a sua forma cutânea. Diversos estudos já investigaram a ocorrência de IP em humanos com CCE oral, revelando uma incidência de até 80% nestes pacientes e um pior prognóstico associado (Binmadi & Basile, 2011; Shen et al., 2014; Misztal et al., 2021).

Apesar do CCE oral possuir natureza mais agressiva e apresentar piores respostas às terapias, o paciente que desenvolveu CCE primariamente na cavidade oral (Paciente #12 – IP negativo), atingindo RC após uma única sessão de EQT. Essa resposta favorável pode ser devido ao estadiamento tumoral precoce que o paciente apresentou ao diagnóstico, com dimensões tumorais de aproximadamente 2-2,5 cm (estádio T2). De forma geral, é bem estabelecido que lesões de CCE em estádios precoces (T1 e T2) apresentam melhores respostas a EQT, e isso pode ter contribuído com esse resultado favorável. Em contraste, outro paciente (Paciente #2 – IP positivo) desenvolveu recidiva de um CCE cutâneo com progressão para a cavidade oral e nasal, atingindo remissão parcial após uma nova sessão de EQT. No entanto, estes resultados ainda são preliminares e não podem confirmar que felinos com CCE oral IP negativos irão responder melhor a EQT do que felinos IP positivos, uma vez que o estágio da doença para o paciente #12 e #2 eram bastante distintos.

É importante ressaltar ainda que, três (12,5%) pacientes desenvolveram múltiplas lesões, em diferentes áreas da cabeça (Tabela 2). Todos estes três pacientes eram IP negativos e apenas um não recidivou. Além disso, dos 5 pacientes que recidivaram do grupo IP negativo, dois (40%) possuíam lesões em múltiplos sítios. O desenvolvimento do CCE em diferentes áreas da cabeça é relativamente comum, considerando que é uma região com maior exposição ao sol e com menor cobertura pilosa, podendo levar ao processo de carcinogênese de forma concomitante e homogênea. Apesar de não haver informações na literatura que avaliem o número de lesões como fator prognóstico, é importante considerar que o tratamento se torna mais complexo nesses pacientes, assim como maiores as taxas de recidiva.

A segurança do tratamento neste estudo foi avaliada de acordo com o escore TOX local (Lowe et al., 2017; Simčič et al., 2021). A maioria (68%) dos pacientes com TOX >

2 eram do grupo IP negativo, no entanto, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre o escore TOX e a ocorrência de IP. Devido a diferença no tamanho amostral dos grupos IP negativo e positivo, esse resultado é ainda preliminar e pode não ser determinante. Com relação a recidiva, de acordo com Simčič et al. (2021), os gatos com TOX > 2 apresentaram três vezes mais chances de sofrerem recidiva da doença. Em contrapartida, no presente estudo, não foi encontrada diferença estatística significativa entre essas variáveis ($p>0,05$).

Além da recidiva local, os estudos com humanos com CCE também evidenciam correlação significativa da presença da IP com a ocorrência de metástases e menor tempo de sobrevida (Rahima et al., 2004; Carter et al., 2013; Haug et al., 2020). Infelizmente, diante do caráter retrospectivo do presente estudo, não foi possível a obtenção dos dados de sobrevivência para todos os pacientes, devido a perda do acompanhamento a longo prazo. Tal fato impossibilitou a obtenção completa dos dados sobre tempo livre de doença, tempo de sobrevida e causa do óbito.

O estadiamento tumoral T (Tis-T4; Owen, 1980) é definido pelo grau de invasão e pelo tamanho da lesão, e o sucesso do tratamento local, seja pela cirurgia, radioterapia, criocirurgia ou EQT, é diretamente impactado por estes fatores (Murphy et al., 2013). Por ser um fator prognóstico relevante no CCE em felinos, a correlação do estágio T com a presença da IP seria de fundamental importância neste estudo. No entanto, não foi possível a classificação de todos os pacientes quanto ao estadiamento, devido a falta de registro das dimensões das lesões para parte dos pacientes no momento do diagnóstico.

CONCLUSÃO

Este estudo é pioneiro na avaliação da IP em felinos com CCE. Os resultados preliminares obtidos sugerem a IP como possível fator preditivo de recidiva local em felinos com CCE, destacando o seu papel como um possível marcador prognóstico nessa espécie, assim como já confirmado em seres humanos. Em conjunto com tais resultados, esse estudo também descreve a avaliação histopatológica da IP, sendo de grande valia para os patologistas e clínicos.

Por fim, estes resultados servem de premissa para que novos estudos sejam conduzidos de forma prospectiva, com maior tamanho amostral e considerando diferentes dados de sobrevivência, determinando de forma mais assertiva o valor prognóstico da IP em felinos com CCE.

REFERÊNCIAS

Berlato D, Murphy S, Laberke S, Verganti S (2018) Response, disease-free interval and overall survival of cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with a fractionated vs a single-dose protocol of strontium plesiotherapy. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 21:306-313.

Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, Occhini A, Plaschke CC, Groselj A, Langdon C, Grau JJ, McCaul JA, Heuveling D, Cemazar M (2016) European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. **European Journal of Cancer**. 63:41-52.

Bilgic, O., Duda, L., Sánchez, MD., & Lewis, JR. (2015). Feline oral squamous cell carcinoma: clinical manifestations and literature review. **Journal of veterinary dentistry**, 32:30-40.

Binmadi, NO, & Basile, JR (2011) Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. **Oral oncology**, 47:1005-1010.

Carter JB, Johnson MM, Chua TL, Karia PS, Schmults CD (2013) Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an 11-year cohort study. **JAMA dermatology**. 149:35-42.

Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK, Prieto VG, Altamirano E, Tucker SL, Strom SS, Kripke ML (2005) Mortality risk from squamous cell skin cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 23:759-65.

Hauck ML, Oblack ML (2020) Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues In: Withrow SJ, Vail DM Withrow and MacEwen's **Small Animal Clinical Oncology**, 6 ed. St Louis: Elsevier–Saunders, pp. 572–582.

Haug, K, Breuninger, H, Metzler, G, Eigentler, T, Eichner, M, Haefner, HM, & Schnabl, SM. (2020). Prognostic impact of perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma: results of a prospective study of 1,399 tumors. **Journal of Investigative Dermatology**, 140:1968-1975.

Karia, PS, Morgan, FC, Ruiz, ES, & Schmults, CD (2017) Clinical and incidental perineural invasion of cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review and pooled analysis of outcomes data. **JAMA dermatology**, 153:781-788.

Lana SE. et al. (1997) Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 33:329-332.

Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, Soden DM, Lubas G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. *Vet Comp Oncol.* (2017) 15(3):775-784.

McCord MW, Mendenhall WM, Parsons JT, Amdur RJ, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR (2000) Skin cancer of the head and neck with clinical perineural invasion. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**. 47:89-93.

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

Misztal, C. I. et al. (2021). Molecular and cellular mechanisms of perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: potential targets for therapeutic intervention. **Cancers**, 13:6011.

Moretto, AJG & Correa, FG (2013) Radioterapia para carcinomas em animais domésticos. **Rev Cientif Eletronica Med Vet** 20:1-16.

Mukaratirwa, S, Van der Linde-Sipman, JS & Gruys, E (2001) Feline nasal and paranasal sinus tumours: clinicopathological study, histomorphological description and diagnostic immunohistochemistry of 123 cases. **Journal of feline medicine and surgery**, 3:235-245.

Murphy S. (2013) Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. **Journal of feline medicine and surgery**. 15:401-7.

Owen LN. "Clinical stages of canine / feline tumors of the oral cavity" In: *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*. Vol 23. 1st ed. Geneva: World Health Organization (1980).

Prado, LOC et al. (2017). Evaluation of the cryosurgery for treatment of squamous cell carcinoma in cats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 69:877-882.

Rahima, B, Shingaki, S, Nagata, M, & Saito, C (2004) Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, 97:423-431.

Schmults, CD, Karia, PS, Carter, JB, Han, J., & Qureshi, AA (2013) Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. **JAMA dermatology**, 149:541-547.

Shen, WR, Wang, YP, Chang, JYF, Yu, SY, Chen, HM, & Chiang, CP (2014) Perineural invasion and expression of nerve growth factor can predict the progression and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine**, 43:258-264.

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.

Thomson, M (2007). Squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats and dogs. **Clin. Techn. Small Anim. Pract.** 22:42-45.

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.