



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Artigo de Revisão

Eletroquimioterapia - uma solução terapêutica para Melanoma Oral Maligno Canino

Miguel Silva e Cruz

Coimbra, julho de 2025



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Artigo de Revisão

Eletroquimioterapia - uma solução terapêutica para Melanoma Oral Maligno Canino

Coimbra, julho de 2025

Miguel Silva e Cruz

Constituição do Júri

Professora Doutora Sofia Ferreira Anastácio

Professora Doutora Joana Nunes Ribeiro Dias

Professor Doutor Gonçalo Daniel dos Santos Frouco

Trabalho realizado sob orientação de

Professor Doutor Gonçalo Frouco e de

Professora Mariana Gonçalves



Dissertação de Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao
Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG.



Agradecimentos

Obrigado. Seis anos se passaram e parecendo que nada mudou, tudo se tornou mais colorido e grandioso. O decorrer desta etapa da minha vida não foi de todo das mais fáceis que já ultrapassei, mas foi, certamente, das mais desafiantes e gratificantes de toda a minha existência. Devo isto, acima de tudo, ao menino que, desde que se lembra, ambicionou um dia “ser o médico dos animais”, e que não deixou que nada nem ninguém o demovesse dessa ideia peregrina, mas que com o tempo se apercebeu de que, na vida, nada se consegue sozinho. Quero, por isso, deixar um agradecimento especial a quem contribuiu para que me tornasse no Homem que sou hoje.

Antes de mais, à minha doce Coimbra, cidade de velhos encantos e vivências, detentora de uma beleza peculiar; acolheste-me como teu, ajudaste-me a realizar o maior sonho da minha vida e a formar laços com pessoas que levo para sempre. Obrigado.

EUVG e todos os docentes, formaram-me tanto a nível profissional como pessoal. Obrigado.

HVSB, abriu-me portas e acolheu-me como parte integrante da sua família nesta minha aventura de me mudar para a capital durante seis longos meses. Obrigado.

Aos meus orientadores desta dissertação Dr. Gonçalo Frouco, Dra. Mariana Gonçalves e Dra. Anna Maria Siodla por todo o tempo, paciência e conhecimento que contribuíram em muito para que isto se realizasse, obrigado.

Pais, foram os meus alicerces nesta jornada. Viram-me chorar, desesperar, errar inúmeras vezes, mas nunca me deixaram esquecer do meu propósito e de todas as minhas ambições. Riram, chamaram-me à razão quando foi preciso, mas, acima de tudo, aplaudiram e ficaram orgulhosos de cada conquista minha. Obrigado.

Mano, és e sempre serás o meu melhor amigo, estiveste lá quando eu mais precisei e nunca me deixaste sentir sozinho e desamparado em momento algum. Obrigado.

Avós do meu coração, sei o quanto vos custou quando souberam que ia viver para longe de vocês, mas também sei o quanto os vossos olhos brilhavam de cada vez que vos contava do quão eu estava feliz a fazer o que realmente gosto, fazendo questão de o dizer, orgulhosamente, a toda a gente que conheciam. Obrigado.

Madrinha, viste-me crescer, impulsionaste-me a ser mais e melhor e foste como uma segunda mãe para mim. Espero que, estejas tu onde estiveres, fiques orgulhosa de tudo o que eu alcancei. Obrigado.

Bia, Carol, Nando, Sofss, Sarita, Evangel, Ana, Xuxas, Luísa e Maria foram ponto de sustento neste tortuoso percurso e reproduziram a definição da palavra “família” em cada tarde na praça a

beber finos, cada serão de estudo em semanas de frequências ou em cada jantar que me preparavam, quando não me apetecia cozinhar. Obrigado.

Madrinha Sofia, aturaste-me enquanto caloiro chato e falador, sem nunca te faltar paciência para tal. Obrigado.

Os meus quatro adorados afilhados, Carolina, Tomás, Maria e Jorge, deram-me muitas dores de cabeça, mas com isso conseguiram fazer de mim uma pessoa mais responsável e adulta. Obrigado.

Companheiros de vida, Lacerda, Cavaco e Inês, estão e sempre estiveram lá para me ouvir e apoiar, mesmo que as nossas decisões de vida nos tenham afastado “geograficamente”. Obrigado.

Amigos de Lisboa, Mariana, Bea, Dani, Gonçalo, Sofia, Lú e muitos outros, adorei tudo o fizeram por mim, e sei que vocês nunca desaparecerão do meu coração. Obrigado.

A todos, mesmo que o muito pareça pouco, Obrigado.

Índice geral

1. INTRODUÇÃO	4
2. ONCOLOGIA VETERINÁRIA	5
2.1. NEOPLASIAS DA CAVIDADE ORAL	6
2.2. MELANOMA MALIGNO EM CÃES	8
2.2.1. Apresentação, Etiologia, Incidência e Fatores de risco.....	9
2.2.2. Diagnóstico e Prognóstico	10
2.2.3. Tratamento	11
3. ELETROQUIMIOTERAPIA.....	14
3.1. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA	14
3.2. ELEIÇÃO DE PACIENTES E CONSIDERAÇÕES PRÉ-TRATAMENTO.....	17
3.3. QUIMIOTERÁPICOS ASSOCIADOS À ELETROQUIMIOTERAPIA.....	18
3.3.1. Bleomicina	19
3.3.2. Cisplatina	20
3.3.3. Cloreto de Cálcio	21
3.4. TIPOS DE ELÉTODOS E O SEU PULSO ELÉTRICO.....	21
3.4.1. Elétrodos não invasivos	22
3.4.2. Elétrodos invasivos	22
3.5. ELETROQUIMIOTERAPIA NO MELANOMA ORAL MALIGNO EM CÃES	23
3.6. VANTAGENS E DESVANTAGENS	25
3.7. POSSÍVEIS EVOLUÇÕES TUMORAIS	27
3.8. PERSPETIVAS FUTURAS.....	28
4. CONCLUSÃO	29
5. BIBLIOGRAFIA	30

Índice de figuras

Figura 1 Representação esquemática da anatomia da cavidade oral canina.	7
Figura 2 Aspirado de Melanoma, de cão, com presença de variabilidade de tamanho nuclear e de grânulos de melanina no citoplasma celular.	9
Figura 3 Aspirado de Melanoma Amelanótico, de cão, com presença de variabilidade de tamanho nuclear e sem presença de grânulos de melanina no citoplasma celular.....	9
Figura 4 Representação esquemática do fenómeno de EQT.....	16
Figura 5 Mecanismo de passagem intracelular de fármacos por meio de eletroporação.	17
Figura 6 Aspeto macroscópico de um melanoma de estadio II em cão, onde foi aplicada a técnica de EQT.....	24
Figura 7 Palato duro de cão com presença de melanoma pigmentado, tratado com EQT.	25
Figura 8 Eventuais progressões tumorais.	28

Índice de tabelas

Tabela 1 TNM – Critérios para o estadiamento de MOM em cães segunda a “World Health Organization”	11
Tabela 2 MTS com base em várias terapias aplicadas no tratamento do MOM canino.	13
Tabela 3 Esquematização das vantagens e desvantagens da EQT.....	25

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ATP- Adenosina trifosfato

cm- Centímetros

cm³- Centímetro cúbico

EQT- Eletroquimioterapia

IHQ- Imunohistoquímica

Kg- Quilograma

m²- Metro quadrado

mg- miligrama

ml- mililitro

MOM- Melanoma Oral Maligno

MTS- Mediana do tempo médio de sobrevivência

PAAF- Punção Aspirativa por Agulha Fina

PE- Pulsos elétricos

RM- Ressonância Magnética

TC- Tomografia computadorizada

UI- Unidades Internacionais

UV- Radiação Ultravioleta

%- Percentagem

≤ - Menor ou igual

> - Maior

µg- Micrograma

Eletroquimioterapia – uma solução terapêutica para Melanoma Oral Maligno Canino

Miguel Cruz^a, Anna Maria Siodla^b, Mariana Gonçalves^{a,c}, Gonçalo Frouco^{a,d}

^a EUVG- Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (miguelcruz2001@gmail.com; mariana_inesg@hotmail.com; goncalo.frouco@euvg.pt)

^b HVSB- Hospital Veterinário de São Bento, Rua de S. Bento, 358-A, 1200-822, Lisboa, Portugal (anna.maria@veterinario.pt)

^c HVBV- Hospital Veterinário Baixo Vouga, Estrada Nacional 1, 355, 3750-742, Águeda, Portugal (mariana_inesg@hotmail.com)

^d CIVG- Centro de Investigação Vasco da Gama/ EUVG- Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (goncalo.frouco@euvg.pt)

Resumo

As doenças oncológicas representam uma das principais preocupações tanto para os médicos veterinários especializados nesta área como para os tutores dos animais afetados. Ao longo dos anos, tem-se verificado que terapias tradicionalmente utilizadas no tratamento destas patologias, como a excisão cirúrgica total, a radioterapia ou a quimioterapia sistémica isoladas, estão atualmente a ser combinadas com novas abordagens ou mesmo substituídas em certos casos, permitindo alcançar resultados clínicos bastante promissores. O melanoma é o tumor maligno oral mais comum em cães, caracterizando-se por um comportamento agressivo e um prognóstico reservado. O seu diagnóstico baseia-se em citologia, biópsia e imunohistoquímica (IHQ), sendo o estadiamento tumoral essencial para a definição do seu tratamento.

A eletroquimioterapia (EQT) é uma modalidade terapêutica emergente, localmente ablativa, constituindo uma das novas opções no tratamento de vários processos neoplásicos superficiais, nomeadamente no melanoma oral maligno canino. Esta combina a administração de baixas doses de agentes quimioterápicos, como a bleomicina e a cisplatina, com a administração de pulsos elétricos (PE). Estes PE promovem o fenómeno designado de eletroporação, de forma a aumentar a permeabilidade das células tumorais de modo que estas entrem em apoptose, preservando, em simultâneo, os tecidos adjacentes com minimização dos efeitos secundários.

Apesar das vantagens evidenciadas, a implementação da EQT ainda apresenta algumas limitações como a necessidade de equipamentos específicos, a obrigatoriedade de anestesia e a variabilidade de resposta, consoante o diagnóstico histológico do tecido e a localização do tumor. No entanto, novas perspetivas ao nível de investigação e da clínica de animais de companhia poderão ultrapassar estas limitações e contribuir para a implementação da EQT como principal técnica terapêutica para o melanoma oral maligno canino.

Palavras-chave: Bleomicina; Canino; Eletroquimioterapia; Eletroporação; Melanoma oral; Oncologia veterinária.

Abstract

Oncological diseases are among the primary concerns for both veterinary specialists in this field and the owners of affected animals. Over the years, it has been observed that therapies traditionally used in the treatment of these pathologies, such as complete surgical excision, radiotherapy, or systemic chemotherapy alone, are now being combined with novel approaches or even replaced in certain cases, leading to highly promising clinical outcomes. Melanoma is the most common malignant oral tumour in dogs, characterised by aggressive behaviour and a poor prognosis. Its diagnosis is based on cytology, biopsy, and immunohistochemistry (IHC), with tumour staging being essential to define the appropriate treatment strategy.

Electrochemotherapy (ECT) is an emerging, locally ablative therapeutic modality, representing one of the new treatment approaches for various superficial neoplasm, including canine malignant oral melanoma. This technique combines the administration of low doses of chemotherapeutic agents, such as bleomycin and cisplatin, with the application of electric pulses (EPs). These EPs induce a phenomenon known as electroporation, increasing the permeability of tumour cells to promote apoptosis while simultaneously preserving adjacent tissues and minimising side effects.

Despite its evident advantages, the implementation of ECT still presents some limitations, including the need for specific equipment, the requirement for anesthesia, and variability in response depending on the histological diagnosis of tissue and tumor location. However, new advances in research and companion animal clinical practice may overcome these limitations and support the adoption of ECT as a primary therapeutic approach for canine oral malignant melanoma.

Key words: Bleomycin; Canine; Electrochemotherapy; Electroporation; Oral melanoma; Veterinary oncology.

1. INTRODUÇÃO

A Medicina Veterinária constitui-se como uma área profissional de elevada complexidade, que combina desafios técnico-científicos com significativa demanda emocional. O crescente vínculo humano-animal e a maior conscientização sobre o bem-estar dos animais de estimação têm levado os tutores a investirem em cuidados veterinários mais avançados, incluindo na prevenção, diagnóstico precoce e terapias oncológicas especializadas. Esse fenómeno, aliado aos avanços na medicina veterinária, tem contribuído para o aumento da esperança média de vida dos cães de companhia, o que, paradoxalmente, aumenta a incidência de doenças crónicas e neoplásicas nesta população. As neoplasias destacam-se pela intrincada abordagem diagnóstica e terapêutica, frequentemente associada a incertezas prognósticas. Consequentemente, a oncologia veterinária não apenas impõe desafios médicos, mas também gera um considerável impacto psicossocial nos tutores, manifestando-se em ansiedade e apreensão durante o processo de tratamento. Relativamente às neoplasias que afetam os cães, as neoplasias orais são particularmente relevantes na medicina veterinária, não só pela sua frequência, mas também pela sua localização anatómica, que frequentemente compromete funções essenciais como a alimentação, vocalização e respiração. Além disto, estas neoplasias são de difícil tratamento cirúrgico uma vez que na maior parte das vezes, é muito difícil obter margens cirúrgicas (Junqueira & Carneiro, 2017; Zachary, 2017). Entre estas, o melanoma oral maligno (MOM) canino é considerado a neoplasia oral mais comum nos cães, representando cerca de 30 a 40% dos tumores orais diagnosticados nesta espécie (He *et al.*, 2024). O MOM caracteriza-se por ser uma neoplasia altamente agressiva, com comportamento localmente invasivo e grande propensão para metastização precoce, principalmente para gânglios linfáticos regionais e pulmões. Do ponto de vista clínico, a sua importância advém não só da elevada taxa de recorrência e metastização, mas também das limitações de terapias convencionais na obtenção de resultados duradouros (Vail *et al.*, 2019; Polton *et al.*, 2024).

Um dos problemas da ineficácia de tratamento neste tipo de patologias é a dificuldade que moléculas farmacológicas têm em atravessar as membranas celulares das células tumorais. As membranas celulares funcionam como uma barreira que condiciona e regula, seletivamente, a troca de moléculas entre as células e o ambiente externo (Rols, Golzio & Teissié, 2021). Moléculas que não conseguem atravessar esta barreira facilmente, podem tornar o tratamento de variadas patologias complexo, nomeadamente o MOM canino. De modo a superar esta dificuldade, ao longo dos anos, este tema tem sido alvo de uma vasta pesquisa, com o objetivo de desenvolver e aprimorar continuamente, métodos que permitam a inserção de fármacos no interior das células, de forma

segura e eficaz. Apesar de atualmente ainda não existir um método que possa ser considerado como padrão a ser utilizado nestes casos, existem, especialmente no que toca ao MOM em cães, muitos estudos que apontam que a eletroquimioterapia (EQT) seja uma técnica inovadora, segura e eficaz, que permite a entrada do quimioterápico para o interior das células tumorais, de forma seletiva (Cemazar *et al.*, 2008; Tellado *et al.*, 2020; Rols, Golzio & Teissié, 2021).

Neste seguimento, o objetivo desta revisão bibliográfica é apresentar uma visão geral da literatura sobre o melanoma oral canino e da técnica da EQT, como um tratamento inovador na medicina veterinária para esta patologia.

2. ONCOLOGIA VETERINÁRIA

Uma neoplasia é considerada, por Villalobos e Kaplan (2007), como sendo uma patologia “insidiosa, nefasta, complexa, obstinada e disruptiva”.

As neoplasias são uma doença de caráter genético, irreversível, onde ocorre a mutação de genes específicos. Isto resulta num crescimento descontrolado e imprudente de células cancerígenas que proliferam, exacerbando lesões micro e macroscópicas, que dominam o corpo do paciente, à medida que se acumulam nele. Fatores epigenéticos, definidos como modificações hereditárias na expressão génica sem alteração da sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN), estão também eles, intimamente correlacionados, com o aparecimento e o subsequente desenvolvimento do tumor. A interação entre estes mecanismos regulatórios e fatores ambientais pode desencadear a ativação ou silenciamento de genes-chave potenciando a carcinogénese e influenciando o comportamento biológico do tumor, enquanto patologia clínica (Villalobos & Kaplan, 2007; Zachary, 2017; Withrow *et al.*, 2019).

Este aparecimento tumoral, de caráter genético, pode originar dois tipos de tumores. Os tumores benignos que são descritos como geralmente expansivos, tendo a capacidade de comprimir tecidos adjacentes e os tumores malignos que são normalmente invasivos. Nos tumores malignos existe alteração da adesão celular, motilidade e a produção de proteases, isto permite que as células cancerígenas penetrem nos tecidos ao redor da massa, podendo gerar metástases, tornando estas estruturas independentes no que toca ao seu crescimento local e à sua irrigação sanguínea (Zachary, 2017).

Nos dias de hoje, o surgimento de doenças oncológicas nos animais de companhia é algo bastante comum, tendo os gatos bastante mais propensão para tumores malignos (78,7%), quando comparados

com os cães (46.2%) (Pinello et al., 2022). Estes processos são, na maioria das vezes, desafiantes, visto que apresentam uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade, estando os tutores, cada vez mais informados e alertados sobre este tipo de patologias. A elevada casuística e a falta de verdadeiras soluções terapêuticas para alguns tumores levam a um desenvolvimento constante de novas terapêuticas, que visam o aperfeiçoamento ou até mesmo a substituição de terapias mais ultrapassadas e com diversos efeitos adversos (Withrow *et al.*, 2019).

2.1. NEOPLASIAS DA CAVIDADE ORAL

A cavidade oral pode ser dividida em duas regiões: o vestíbulo oral, que é delimitado lateralmente pelas bochechas e pelos lábios, e medialmente pelas gengivas e pelos dentes, e a cavidade oral propriamente dita, que é limitada dorsalmente pelo palato duro, ventralmente pela língua, lateral e rostralmente pelos dentes e pela gengiva e caudalmente pelos arcos glossopalatinos (Eubanks, 2007).

A cavidade oral de um canídeo é recoberta externamente pelos lábios, que contribuem para a expressão facial do animal, por intervenção da musculatura mímica. É constituída por 42 dentes na sua totalidade, que se apresentam fixos à maxila e à mandíbula, por meio das suas raízes. A gengiva envolve toda a porção da raiz do dente, deixando apenas exposta a porção da coroa do mesmo, protegendo-o assim contra a entrada de bactérias para os tecidos periodontais e, por conseguinte, para a circulação sanguínea. Existe outra região na cavidade oral, que também é predisposta ao aparecimento tumoral, tal como a língua, que para além da sua importante função na digestão, ainda apresenta outras funções como a socialização com outros animais e até mesmo a termorregulação do próprio animal. Por fim, mas não menos importante, o palato reveste a região dorsal da cavidade oral e subdivide-se em palato duro, que está presente na porção rostral desta e em palato mole, situado mais caudalmente, promovendo a conexão com a faringe (Eubanks, 2007; Requicha *et al.*, 2015).

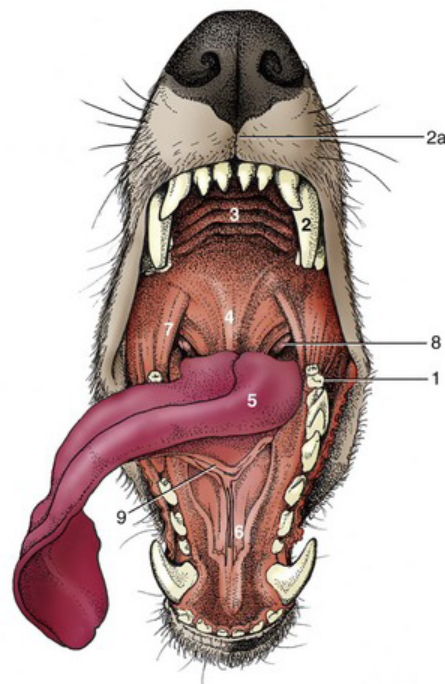


Figura 1 Representação esquemática da anatomia da cavidade oral canina. (1) Vestíbulo. (2) Dente Canino. (2a) Sulco Nasolabial. (3) Palato Duro. (4) Palato Mole. (5) Língua. (6) Carúncula Sublingual. (7) Arco Glossopalatino. (8) Amígdala. (9) Freio Lingual. Adaptado de Dyce, Sack & Wensing, 2010.

A cavidade oral é uma região com várias funções fisiológicas, visto que é a responsável pela apreensão, mastigação, insalivação e deglutição do alimento ingerido e pela consequente aquisição dos nutrientes necessários para o desenvolvimento e manutenção da vida saudável do animal. Apresenta uma mucosa, fisiologicamente, descrita como sendo lisa, fina e rosada, composta por um epitélio pavimentoso estratificado com presença de queratina (Junqueira & Carneiro, 2017; Zachary, 2017).

As lesões orais que nos surgem em contexto clínico podem ter diversas origens. Despistar a natureza de cada uma delas, apenas com observação macroscópica, é muito difícil ou mesmo impossível. Lesões inflamatórias, como a estomatite linfoplasmocítica, estomatite ulcerativa ou até estomatite purulenta e hiperplásicas, como hiperplasia gengival ou a calcificação circunscrita são lesões que aparecem frequentemente e que, muitas vezes, mascaram a presença de neoplasias, sejam elas benignas ou malignas (Withrow *et al.*, 2019). As lesões benignas representam uma percentagem considerável das patologias orais, sendo as mais recorrentes o fibroma odontogénico periférico, o papiloma filiforme viral e o ameoblastoma (Withrow *et al.*, 2019; Satthathum *et al.*, 2023). No que toca aos tumores orais malignos em cães, estes apresentam uma percentagem de cerca de 6-7% de todos os tumores malignos, estando a cavidade oral identificada como sendo a quarta região corporal com

maior prevalência para este tipo de patologias. Estes aparecem em cães de meia-idade (4-11 anos), sendo o MOM, o carcinoma de células escamosas e o fibrossarcoma os mais relatados na clínica de canídeos (Satthathum *et al.*, 2023).

Perante isto, um bom exame oral efetuado por um médico veterinário, aquando da realização de um exame físico de rotina, não deve ser dispensado. Isto é deveras importante, dada a complexidade anatómica da região e a abundância de aparecimento de patologias nesta cavidade nos nossos animais de companhia, o que pode levar ao subdiagnóstico de neoplasias orais (Eubanks, 2007). Neste sentido, está relatado bibliograficamente, que é comum o diagnóstico tardio de neoplasias da cavidade oral. O seu diagnóstico acontece muitas vezes por acaso, durante um exame de rotina, ou então surge porque a patologia já se apresenta em estadios muito avançados. A presença de sinais clínicos como halitose, sialorreia, perda de peso, epistaxis, disfagia, hemoptise e até mesmo dor na abertura da boca, são recorrentes objetos de queixa por parte dos tutores (Simons, 2015).

2.2. MELANOMA MALIGNO EM CÃES

O Melanoma é o tumor maligno oral mais comum em cães, raro em gatos, com especial atenção a cães com uma pigmentação significativa e apresenta-se como um desafio clínico para os veterinários de todo o planeta (Vail *et al.*, 2019; Polton *et al.*, 2024).

Os MOM são classificados como tumores mesenquimais, ou seja, que resultam de células com origem mesenquimal, sendo a sua aparência distinta, pois possuem células que se assemelham a células epiteliais, outras apresentam uma forma fusiforme e outras têm um formato arredondado (Zachary, 2017; Withrow *et al.*, 2019; Smedley, Sebastian, & Kiupel, 2022). Os melanócitos, que apontam como precursores os melanoblastos, são células produtoras de melanina (pigmento que dá cor à pele, mucosas e outras estruturas), onde se originam os melanomas. Estes contêm, tipicamente, um nucléolo único e grande no interior do núcleo, podendo o citoplasma possuir grânulos de melanina (partículas finas e acinzentadas), que permitem identificá-los com facilidade; no entanto, muitas dessas células não são portadoras desta pigmentação (melanomas amelanóticos), sendo estes melanoblastos e melanócitos resultantes da neuroectoderme embrionária (Modiano *et al.*, 1999; Vail *et al.*, 2019; Withrow *et al.*, 2019; Pazzi, Steenkamp, & Rixon, 2022)(Figuras 2 e 3, respetivamente).

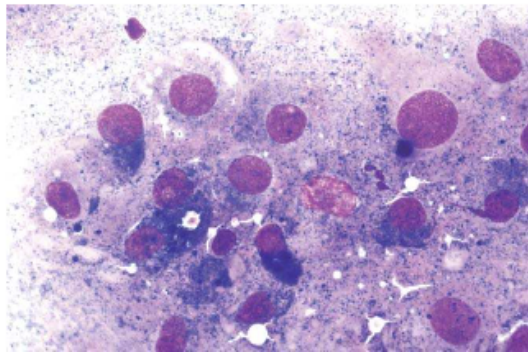


Figura 2 Aspirado de Melanoma, de cão, com presença de variabilidade de tamanho nuclear e de grânulos de melanina no citoplasma celular. Adaptado de Withrow *et al.*, 2019.

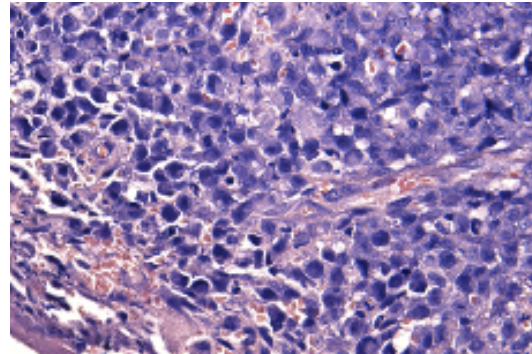


Figura 3 Aspirado de Melanoma Amelanótico, de cão, com presença de variabilidade de tamanho nuclear e sem presença de grânulos de melanina no citoplasma celular. Adaptado de Mikiewicz *et al.*, 2019.

2.2.1. Apresentação, Etiologia, Incidência e Fatores de risco

Com base na localização anatômica, o melanoma exibe comportamentos diferentes. Este é, muitas vezes, descrito pelos tutores, como sendo um nódulo pequeno, com cor acastanhada ou preta, embora estes também se possam apresentar como massas grandes, irregulares ou achatadas (Murakami *et al.*, 2011). Tumores como o melanoma maligno, podem desenvolver-se em diversas localizações anatômicas, como a cavidade oral (44-62%), pele (27-44%), dígitos (8-10%), região subungueal, descritos de forma decrescente de prevalência, estando também reportado o aparecimento destes processos tumorais nos olhos (1-3%), almofadas plantares, cavidade nasal, trato gastrointestinal e sacos das glândulas anais (He *et al.*, 2024; Polton *et al.*, 2024).

A etiopatogénese do melanoma canino envolve mutações sequenciais nos melanócitos que conduzem à desregulação de vias de sinalização celular, promovendo proliferação descontrolada e evasão dos mecanismos apoptóticos. Sabe-se também que, ao contrário do que acontece na medicina humana, onde o aparecimento de melanomas está intimamente relacionado com a exposição à radiação ultravioleta (UV), na medicina veterinária, isto será pouco provável acontecer em cães devido à proteção da pele por pêlo e à sua localização preferencial na cavidade oral, o que minimiza a exposição à UV (Polton *et al.*, 2024). Estão ainda descritos outros fatores que poderão estar correlacionados com o aparecimento deste, tais como a idade avançada, dos 10 aos 12 anos, zonas de pele com coloração escurecida, predisposição racial para cães como scottish terriers, golden retrievers, poodles, dachshunds, chow-chows, cocker spaniels, entre outros. Até à data, nenhum estudo

comprovou qualquer relação entre o género do animal e a predisposição para o desenvolvimento de melanoma (Zachary, 2017; Polton *et al.*, 2024).

2.2.2. Diagnóstico e Prognóstico

A apresentação de vários tipos de lesões pigmentadas e de tumores torna o diagnóstico do melanoma mais complicado, especialmente dos melanomas amelanóticos (Modiano *et al.*, 1999; Rolim *et al.*, 2012). A citologia através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) pode auxiliar o diagnóstico, mas deve-se realizar uma biópsia excisional da lesão, para posterior exame histopatológico, de forma a poder detetar características de malignidade, algo que a PAAF não consegue fornecer. Alternativamente, o diagnóstico desta patologia também pode ser realizado com o recurso à imunohistoquímica (IHQ) (Smedley, Sebastian, & Kiupel, 2022; Stevenson, Klahn, LeRoith & Huckle, 2023; Polton *et al.*, 2024).

Os melanomas em cães apresentam um comportamento biológico muito variável, sendo o prognóstico muito influenciado, tanto por fatores clínicos, como histopatológicos. Tal como já referido, a localização anatômica tem uma elevada influência no prognóstico, visto que os melanomas situados na pele, que são mais frequentemente diagnosticados como sendo nevo, têm melhor prognóstico quando comparados com os melanomas da cavidade oral, que são tendencialmente mais agressivos, pois tendem a apresentar elevado grau de malignidade. Outros fatores como o índice mitótico (quantidade de células em divisão) elevado, a deteção de invasão vascular, linfática ou neurológica, e a presença de ulceração, agravam também o prognóstico do paciente. Posto isto, refere-se que a avaliação do índice Ki-67 constitui um importante fator de prognóstico, pois este mede a taxa de proliferação das células da amostra (Smedley, Sebastian, & Kiupel, 2022).

O estadiamento dos pacientes diagnosticados com MOM é recomendado. Este implica a realização de um exame físico completo, hemograma, painel de bioquímicas, análises à urina, citologia de todas as lesões cutâneas e dos linfonodos regionais ao tumor, mesmo que no exame físico se encontrem de tamanho normal. A realização de radiografias torácicas em pelo menos três projeções, tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) e ecografia abdominal, são exames recomendáveis pois vão avaliar a presença de metástases, e também do grau de invasão da lesão primária (Tellado *et al.*, 2020; Stevenson, Klahn, LeRoith, & Huckle, 2023; Polton *et al.*, 2024). Com base neste estadiamento, foi estabelecida uma classificação que permite dividir os MOM em quatro estadios. Os critérios de classificação que permitem identificar os MOM nestes quatro estadios são:

“T”, que representa a extensão do tumor primário, “N”, a afeção dos nódulos linfáticos regionais e “M”, a presença de metástases à distância, estando isso ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 TNM – Critérios para o estadiamento de MOM em cães segunda a “World Health Organization”. Adaptado de (Owen, 1980).

Critérios de classificação		Classificação por estadio
T: Tumor Primário	T1 Tumor $\leq$ dois cm de diâmetro T2 Tumor dois a quatro cm de diâmetro T3 Tumor $>$ quatro cm de diâmetro	Estadio I T1 N0 M0 Estadio II T2 N0 M0 Estadio III T2 N1 M0 ou T3 N0 M0 Estadio IV Qualquer T, qualquer N e M1
N: Nódulos Linfáticos Regionais	N0 Sem evidência de envolvimento regional N1 Histológica/citologicamente com evidência de envolvimento regional N2 Nódulos visíveis	
M: Metástases	M0 Sem evidência de metástases M1 Com evidência de metástases	

2.2.3. Tratamento

O Melanoma maligno é uma patologia fatal, com invasão local e elevada propensão ao desenvolvimento de metástases, que apresenta uma fraca resposta aos tratamentos implementados como protocolo usual, de prognóstico reservado e com elevada morbimortalidade (Murakami *et al.*, 2011).

A cirurgia por excisão total do tumor, com intenção curativa, como é o caso de mandibulectomias e maxilectomias parciais em caso de ressecção tumoral com origem em gengivas e mucosa na proximidade do osso, tem vindo, ao longo dos anos, a ser o tratamento de eleição para o MOM. Esta abordagem médica é eficaz e recomendada, mas apresenta alguns problemas, visto que apenas é elegível para tumores localizados em regiões anatómicas passíveis de se aceder cirurgicamente e onde se consiga garantir a sua execução com margens cirúrgicas limpas, de modo a evitar a disseminação

das células tumorais localmente e o surgimento de metástases em outras regiões anatómicas (Pazzi, Steenkamp, & Rixon, 2022).

A radioterapia, com efeito curativo, promove morte celular, consequente dos danos causados no ADN após a aplicação de radiação ionizante. Esta técnica apresenta um papel importante no tratamento de MOM quando a cirurgia não é possível ou quando esta só consegue ser feita de forma incompleta (Cunha *et al.*, 2018; Pazzi, Steenkamp, & Rixon, 2022). Esta também evidencia grande utilidade quando referida como tratamento paliativo, no que se refere ao tratamento de metástases ou linfonodos distantes (Cunha *et al.*, 2018).

A quimioterapia sistémica, após a abordagem cirúrgica, foi considerada o tratamento de eleição para pacientes com MOM com risco metastático durante as últimas décadas, mas a taxa de sobrevivência destes manteve-se sempre baixa, especialmente nos pacientes com estadios de doença mais avançados (IV) (Stevenson *et al.*, 2023). Para além disto, a utilização de quimioterapia sistémica é usada como agente radio-potenciador e para prevenir o aparecimento ou o avanço metastático (Cunha *et al.*, 2018). Esta terapia não é também a mais aconselhada, visto que cerca de dois terços dos pacientes apresentam resistência a carboplatina, um dos quimioterápicos mais utilizados para este tipo de tumores (Cunha *et al.*, 2018; Pazzi, Steenkamp, & Rixon, 2022).

Com o avançar da medicina, novas terapias começam a ser implementadas como tratamento desta patologia, e juntamente com técnicas mais antigas ou até mesmo em substituição destas. Isto tem como objetivo ultrapassar limitações terapêuticas como a presença de tumores inoperáveis ou que submetam os animais a cirurgias desfigurantes, neoplasias resistentes aos tratamentos já instituídos ou até mesmo a minimização dos efeitos secundários que advêm destas (Spugnini *et al.*, 2016; Campana *et al.*, 2019; Condello *et al.*, 2022). São exemplos destas novas abordagens terapêuticas para o melanoma canino a imunoterapia, onde a vacinação tem um papel importante na estimulação do sistema imunitário do animal, de modo a combater antígenos específicos do tumor; a genoterapia por meio da transferência genética de IL-12, que, por sua vez, promove a formação de um efeito terapêutico a nível sistémico em variadas neoplasias, nomeadamente, no MOM; a associação da IL-12, (através da sua administração intratumoral, de modo a que o tumor inicie a produção desta localmente e assim despolete uma resposta inflamatória controlada e dirigida às células tumorais aquando de um estímulo do sistema imunitário), com a EQT também está descrita, pois estas duas técnicas conseguem atuar em sinergismo no que toca ao controlo de tumores superficiais primários; e por último a EQT usada isoladamente é uma outra terapêutica inovadora que tem vindo a desenvolver-se ao longo dos

anos com resultados promissores (Rols, Golzio & Teissié, 2021; Pazzi, Steenkamp, & Rixon, 2022). Na Tabela 2 está representada a mediana do tempo médio de sobrevivência (MTS) em animais com MOM sujeitos a várias técnicas, a EQT e terapias consideradas como convencionais, ou seja, o tempo em que 50% dos pacientes sujeitos a uma determinada técnica ainda se encontram com vida, após o começo dela.

Tabela 2 MTS com base em várias terapias aplicadas no tratamento do MOM canino.

Estadio	EQT (meses) ¹	Cirurgia com intenção curativa (meses) ^{2*}	Radioterapia (meses) ³	Quimioterapia sistêmica(meses) ⁴
Estadio I	16,5	28-29	12-13	8
Estadio II	9	26-27	9	8
Estadio III	7,5	6-7	4	16**
Estadio IV	4,5	NA	3	5
	(Nemec <i>et al.</i> , 2020; Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022)	(Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022)	(Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022)	(Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022)

(1)Dados referentes à utilização de bleomicina sem outra terapia em coadjuvação; (2) Dados referentes à realização de cirurgia com a utilização de quimioterapia sistêmica variada, como coadjuvante em alguns casos; (3) Dados referentes à utilização de radioterapia com associação de cirurgia inicial e/ou quimioterapia sistêmica em alguns casos; (4) Dados referentes à utilização de carboplatina com cirurgia inicial ou outros tratamentos em coadjuvação; (*) Os valores da realização de cirurgia são superiores, mas apresentam uma grande dependência da localização anatômica do tumor; (**) O valor esperado seria cada vez mais baixo com o aumento do estadio da doença, mas este pode ter sido influenciado por várias componentes; (NA) Não Aplicável.

3. ELETROQUIMIOTERAPIA

A técnica EQT é realizada de forma inovadora desde a década de 90, quando se descreveu a aplicação de pulsos elétricos (PEs) não citotóxicos num tumor subcutâneo após a administração intramuscular de bleomicina, na tentativa de potenciar o seu efeito. Isto apresentava variadas vantagens não só na redução do volume tumoral, mas também na eliminação completa de tumores induzidos em modelos experimentais, sendo desde então classificada como uma estratégia terapêutica com elevado potencial, no que toca à oncologia veterinária e humana (Tozon, Tamzali & Cemazar, 2016; Cemazar & Sersa, 2019).

3.1. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA

Atualmente, a EQT continua a demonstrar excelentes resultados no controlo local de tumores cutâneos e subcutâneos. Esta pode ser efetuada de forma isolada ou associada a outras técnicas, já não sendo vista apenas como técnica paliativa, mas também enquanto técnica curativa, em variadas espécies, nomeadamente no cão, gato, cavalo e no próprio ser humano. São de realçar alguns tumores onde esta técnica é muito aplicada, como o MOM em cães, o carcinoma de células escamosas em gatos e o sarcoma equino, entre outras (Spugnini *et al.*, 2016; Tozon, Tamzali & Cemazar, 2016; Maglietti *et al.*, 2020).

A EQT é, então, uma técnica ablativa localmente, constituída por componentes físicos, onde é aplicado um PE, de modo a causar eletroporação nas células-alvo e uma componente química, que consta na introdução de quimioterápicos no interior das células (Nemec *et al.*, 2020; Tellado *et al.*, 2020).

Para se obter a melhor resposta antitumoral com a EQT, existem variáveis que devem ser controladas pelo executor da técnica. Os parâmetros elétricos devem ser selecionados de modo a causar eletroporação reversível das membranas celulares, estes devem ter uma duração e uma forma de aplicação adequada, de acordo com as moléculas que se querem inserir no interior da célula. Por outro lado, os fármacos escolhidos para se associar à eletroporação devem ser altamente citotóxicas dentro das células tumorais, sem que ocorra saída através da membrana para as células saudáveis envolventes (Cemazar & Sersa, 2019; Nemec *et al.*, 2020).

Quando se aplica PEs curtos e intensos sobre a membrana celular, gera-se uma tensão transmembranar. A membrana celular é constituída por uma bicamada fosfolipídica, onde as cabeças

hidrofílicas estão viradas para a sua parte exterior e as caudas hidrofóbicas situam-se na sua porção interna. Após aplicação PEs, as moléculas de água, começam a penetrar a bicamada fosfolipídica, acontecendo isto, essencialmente, em células neoplásicas que por definição são menos estáveis, quando comparadas com células normais. Em consequência disto, e das diferentes propriedades elétricas da membrana celular, do citoplasma e do meio externo, acontece uma reorganização da geometria da membrana, havendo formação de poros temporários e aumentando permeabilidade celular (Cemazar *et al.*, 2008; Spugnini *et al.*, 2016; Maglietti *et al.*, 2020; Mahnič-Kalamiza & Miklavčič, 2021). O aumento desta permeabilidade transitória e a diferença de concentração de fármacos do exterior das células para o interior destas, leva a que pequenas moléculas polares entrem para o espaço intracelular por processos de difusão simples (Cemazar *et al.*, 2008; Campana *et al.*, 2016; Spugnini *et al.*, 2016; Condello *et al.*, 2022). Este aumento rápido de concentração do fármaco no interior das células leva ao aumento da sua citotoxicidade (Cemazar *et al.*, 2008).

O efeito citotóxico da EQT não está apenas limitado às células tumorais, uma vez que esta técnica tem a capacidade de atingir células endoteliais dos vasos sanguíneos, fazendo com que, desta forma, o aporte sanguíneo ao tumor desapareça (Cemazar *et al.*, 2008; Miklavčič *et al.*, 2014). Adicionalmente, a clivagem de ADN destas células tumorais, por meio da ação dos quimioterápicos, promove a sua degenerescência e previne a ocorrência dos seus processos de mitose, induzindo-as a entrarem em apoptose, fazendo com que desapareçam com o auxílio do sistema imunitário do animal (Miklavčič *et al.*, 2014; Spugnini *et al.*, 2016). Isto apresenta-se representado na Figura 4.

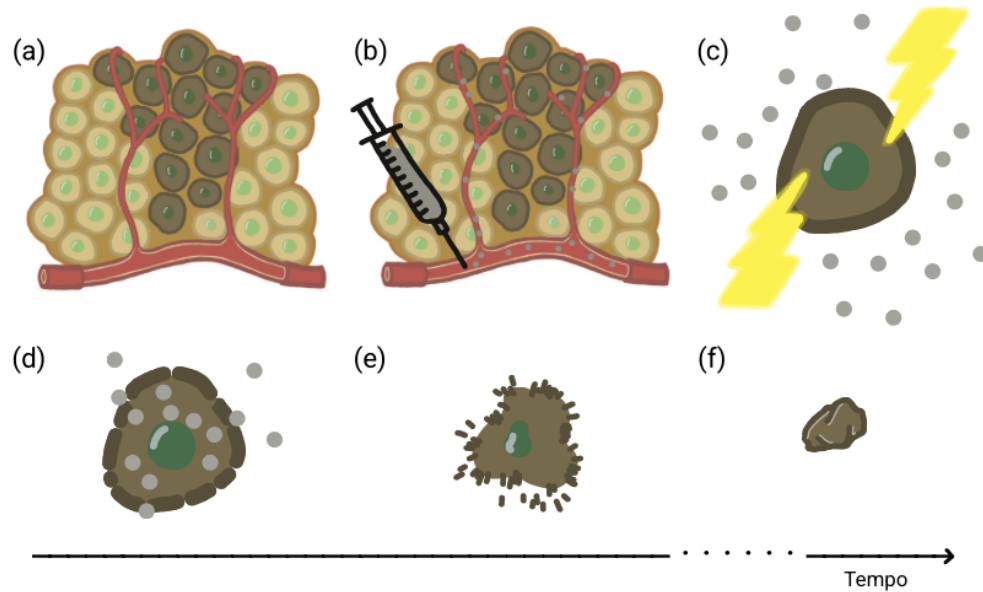


Figura 4 Representação esquemática do fenômeno de EQT. (a) Estrutura que engloba as células tumorais, rodeadas de células saudáveis, com a respetiva irrigação sanguínea. (b) Injeção de quimioterápico via endovenosa. (c) Aplicação de PEs nas células tumorais. (d) Entrada do quimioterápico para a célula tumoral. (e) Entrada das células tumorais em apoptose. (f) Remissão completa das células tumorais. Fonte: Original.

Quando uma célula é sujeita à aplicação de PEs, duas situações podem ocorrer: eletroporação reversível ou irreversível (Maglietti *et al.*, 2020; Condello *et al.*, 2022). A aplicação de eletroporação de forma irreversível é uma técnica sem interesse a nível terapêutico, neste tipo de patologias. Esta causa danos permanentes na membrana celular, provocando perda da capacidade de hemostase destas, levando à morte das suas células, que muitas vezes estão localizadas próximas de estruturas delicadas, como grandes vasos sanguíneos e nervos (Rubinsky *et al.*, 2015; Maglietti *et al.*, 2020; Condello *et al.*, 2022). No que toca à eletroporação reversível, existe então a formação de poros temporários na membrana celular, permitindo a passagem de fármacos lipofóbicos e hidrofílicos para o interior da célula. Na formação destes poros membranares é necessária aplicação de um PE de amplitude e duração controladas de modo a manter a viabilidade das células. Com base nisto, estão descritas duas teorias de mecanismos que permitem este aumento de permeabilidade. O primeiro descreve que, após a aplicação do PE, há uma destabilização da membrana, fazendo com que haja um rearranjo dos fosfolípidos, redirecionando as cabeças hidrofílicas e as caudas hidrofóbicas de modo a formar um poro reversível, com duração de cerca de um minuto. O segundo mecanismo envolve o agrupamento de proteínas transmembranas de modo que se originem pseudo-túneis, para que haja a possibilidade de passagem das moléculas através deles (Cemazar *et al.*, 2008; Spugnini *et al.*, 2016) (Figura 5).

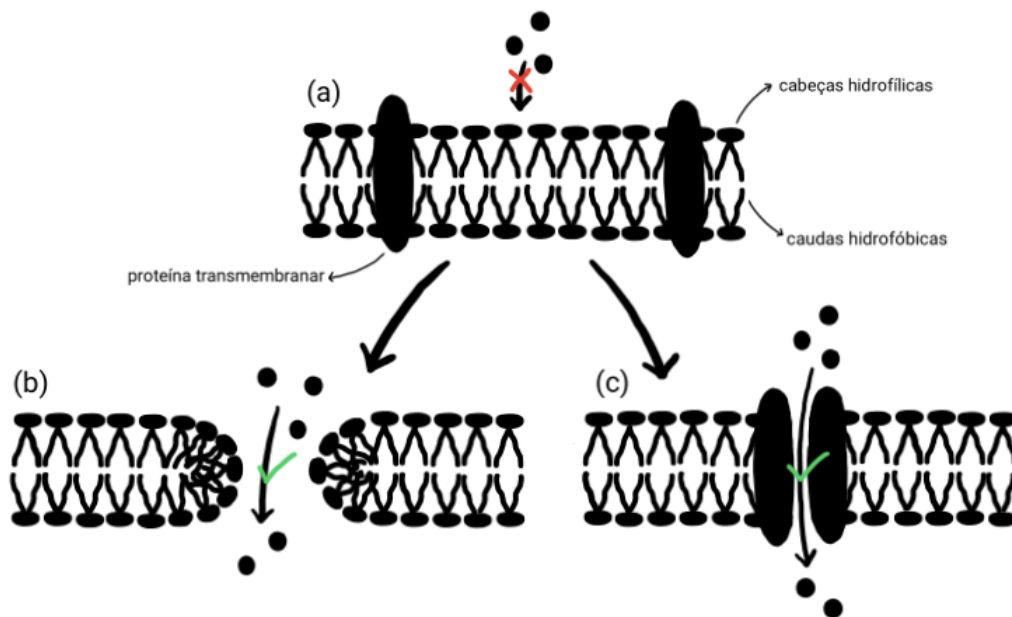


Figura 5 Mecanismo de passagem intracelular de fármacos por meio de eletroporação. (a) Membrana citoplasmática antes de aplicação do PE, sem possuir permeabilidade para moléculas lipofóbicas e hidrofílicas. (b) Mecanismo de formação de um poro por meio da reorganização dos fosfolípidos. (c) Mecanismo de formação de pseudo-túneis através das proteínas transmembranares. Fonte: Original.

3.2. ELEIÇÃO DE PACIENTES E CONSIDERAÇÕES PRÉ-TRATAMENTO

Uma técnica como a EQT apresenta toda uma panóplia de critérios que devem ser cumpridos. Esta técnica deve ser, preferencialmente, efetuada em tumores cutâneos ou subcutâneos, primários ou metastáticos, que não respondam corretamente aos tratamentos convencionais. É muito útil em tumores que possam apresentar sangramento ou ulceração, que causem dor ou desconforto ao animal, ou seja, que afetem a qualidade de vida do paciente. Por fim, esta técnica ainda pode ser aplicada em pacientes que apresentem tumores de grandes dimensões e onde haja necessidade de diminuir o seu tamanho para se conseguir realizar cirurgia posteriormente, ou quando, simplesmente, o tutor após a explicação de todos os procedimentos, se recuse à realização de outras terapias mais convencionais e mais agressivas (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

A seleção dos pacientes deve seguir critérios específicos, com a prévia recolha de dados como idade, peso, sexo, raça, diagnóstico histopatológico, histórico de alergias ou hipersensibilidade a quimioterápicos e exposição prévia a esses fármacos, a fim de determinar a dose cumulativa. Adicionalmente, é necessário aferir o tamanho tumoral e, em fêmeas, verificar a possibilidade de gestação ou lactação, devido aos potenciais efeitos teratogénicos da quimioterapia. O paciente deve

apresentar parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dentro dos intervalos de referência, além de avaliação cardíaca por ecocardiografia e exames de imagem (radiografias torácicas em três projeções, ecografia abdominal e tomografia computadorizada toraco-abdominal) para exclusão de metástases e invasão óssea (Campana *et al.*, 2016; Tellado *et al.*, 2020; Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

3.3. QUIMIOTERÁPICOS ASSOCIADOS À ELETROQUIMIOTERAPIA

Com o avançar da medicina, denotou-se que a quimioterapia tem apresentado limitações no controlo tumoral, dado o aparecimento constante de resistências medicamentosas por parte dos pacientes. Na tentativa de colmatar este grande problema de resistências, muitas vezes causadas pela incapacidade de transporte do fármaco, têm surgido novas técnicas como a EQT (Condello *et al.*, 2022).

Aquando da escolha do quimioterápico que irá ser utilizado, deve definir-se, simultaneamente, o protocolo anestésico. O tratamento deve ser realizado sob anestesia geral, principalmente para evitar reações adversas a estímulos dolorosos decorrentes da contração muscular induzida pela estimulação elétrica. Em casos de múltiplos nódulos ou lesões de grandes dimensões, pode-se optar por sedação intravenosa contínua como alternativa. Para nódulos únicos e pequenos, a anestesia local pode ser suficiente (Benedik *et al.*, 2020; Tellado, Mir & Maglietti, 2022). A anestesia representa um dos pilares fundamentais da medicina veterinária atual, sendo indispensável para a realização de procedimentos diagnósticos, terapêuticos e cirúrgicos de forma segura tanto para o animal como para o profissional que os está a executar. Utilizam-se protocolos anestésicos eficazes no controlo de dor, individualizados a cada caso clínico e com o mínimo de efeitos adversos promovidos pela aplicação de protocolos anestésicos multimodais (Grimm *et al.*, 2015). No que toca à anestesia geral para a realização da técnica de EQT, existem vários protocolos descritos que devem ser cuidadosamente analisados pelo anestesista (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

A escolha do quimioterápico mais adequado e a forma de administração para cada situação não são fáceis e devem ser ponderadas. A bleomicina e a cisplatina são os quimioterápicos que apresentam maior resposta quando sujeitas a um PE, sendo por isso, utilizados com concentrações reduzidas durante o protocolo de EQT, quando comparadas a outras técnicas. Outros fármacos como o Cloreto de cálcio, a Mitoxantrona e a Doxorrubicina também se apresentam descritos como possíveis opções terapêuticas na EQT. Relativamente à via de administração, alguns autores defendem que no caso da presença de mais 5-7 nódulos e estes apresentarem mais de 2 cm de diâmetro, é desaconselhada a administração de fármacos por via intratumoral, tendo que se optar pela via intravenosa (Miklavčič *et*

al., 2014; Spugnini *et al.*, 2016; Nemec *et al.*, 2020; Rols, Golzio & Teissié, 2021; Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

3.3.1. Bleomicina

A bleomicina, produzida pela bactéria “*Streptomyces verticillus*”, pertence à classe dos antibióticos antineoplásicos e está descrita, não só por ter sido o primeiro e o mais estudado agente quimioterápico nos estudos de eletroporação, mas também por ser o quimioterápico que apresenta maior nível de citotoxicidade após exposição a um PE (Moeller *et al.*, 2008; Spugnini *et al.*, 2016; Tozon, Milevoj & Impellizeri, 2019).

A bleomicina é um quimioterápico de natureza lipofóbica e hidrofílica, que pode ser administrado por via intravenosa ou intratumoral. Este composto é deveras interessante, pois em condições normais, tem a capacidade de penetrar na membrana só e apenas por meio de recetores proteicos resultando isto numa entrada lenta e pouco significativa quantitativamente, pelo que a sua citotoxicidade não é muito relevante. A forma de combater esta resistência à entrada através da membrana celular da bleomicina foi através da aplicação de PEs, o que aumenta a sua capacidade de entrada em 700 vezes (Spugnini *et al.*, 2016; Tellado *et al.*, 2020).

A partir do momento que a bleomicina é administrada ao animal e esta entra para o citosol da célula, ocorre a indução da clivagem de cadeias simples ou duplas de ADN, interrompendo o ciclo celular e promovendo a fragmentação do ADN, originando assim a morte celular. Todo este mecanismo de ação decorre em cerca de 30 segundos, desde a entrada da bleomicina no citosol (Moeller *et al.*, 2008; Spugnini *et al.*, 2016).

A dose escolhida para ser administrada a cada paciente depende do tamanho do nódulo. A bleomicina pode ser administrada por via intravenosa, cuja dose inicial descrita é 15000 UI/m² de superfície corporal (com dose máxima de 30000 UI/m²), administrada em bólus lentos, podendo ser necessário realizar uma administração fracionada de bleomicina (metade da dose inicial), quando os tumores apresentam um diâmetro superior a 8 cm. Após a administração da bleomicina, é necessário esperar cerca de 8 minutos antes da aplicação do PE, de modo que haja uma boa distribuição do quimioterápico a nível sistémico e assim se possa atingir o pico de concentração plasmática do fármaco. Contudo, e tal como já referido, esta também pode ser administrada de forma intratumoral, com uma dose recomendada de 250 UI/cm³ da superfície corporal, devendo o PE ser administrado logo em seguida, sem ser necessário aguardar. Administrar bleomicina por esta via é viável para

tumores que apresentem um volume máximo de 2 cm³, pois em tumores de maiores dimensões, conseguir uma boa distribuição do fármaco por toda a superfície torna-se um desafio (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

Por fim, a bleomicina apresenta, essencialmente, toxicidade cutânea e pulmonar, mas como é excretada por via urinária, também pode causar nefrotoxicidade, devendo-se, por isso, manter o animal sujeito a fluidoterapia após o término da técnica, de modo, a excretar este quimioterápico da circulação sanguínea (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

3.3.2. Cisplatina

A cisplatina é atualmente o segundo fármaco mais utilizado na EQT, normalmente quando os pacientes apresentam resistência à bleomicina (Spugnini *et al.*, 2016; Tozon, Milevoj & Impellizeri, 2019). Este quimioterápico, pertencente ao grupo dos agentes alquilantes, em condições normais, é capaz de entrar na célula através de transportadores de cobre, sendo essa entrada em quantidades limitadas. Contudo, a eletroporação aumenta significativamente a entrada desta, com o consequente aumento da sua citotoxicidade e morte celular por apoptose (Spugnini *et al.*, 2016; Cemazar & Sersa, 2019).

Quando este fármaco consegue entrar para o interior da célula, é ativado por meio da substituição de um dos seus cloretos por uma molécula de água, o que permite que este forme ligações com as bases de ADN. Após se estabelecer esta ligação cruzada do ADN, a replicação celular e a síntese proteica são bloqueadas, promovendo assim a morte celular. A sua captação é aumentada em cerca de 4 a 8 vezes mais, após a exposição a PEs (Spugnini *et al.*, 2016).

Contrariamente à bleomicina, está aconselhado a que a cisplatina seja apenas administrada de forma intratumoral com uma concentração de 1 mg/ml, sendo a dose recomendada a necessária para preencher todo o volume tumoral, devendo-se fornecer o PE de imediato. No caso da cisplatina, a disponibilidade desta concentração ou de uma concentração superior é essencial; caso contrário, é preferível optar por outro quimioterápico, porque utilizar concentrações mais baixas implica que haja um acompanhamento muito minucioso, pois, a qualquer momento, o paciente pode necessitar de um novo tratamento (Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

Por último, a cisplatina apresenta excreção predominantemente urinária e pode causar nefrotoxicidade, sendo isto um problema clínico significativo, pois surge em cerca de 30% dos pacientes tratados com cisplatina (Kopacz-Bednarska & Król, 2022).

3.3.3. Cloreto de Cálcio

A técnica de EQT já demonstrou elevada aplicação clínica no que concerne ao tratamento tumoral com a utilização de fármacos não permanentes no corpo do animal (bleomicina e cisplatina). Mais recentemente, tem-se demonstrado a aplicabilidade da utilização de iões de cálcio como nova abordagem à EQT. Por norma, o cálcio apresenta-se em baixa concentração no interior da célula, mas quando a membrana é exposta a um PE, e sofre permeabilização, essa concentração aumenta, levando à depleção de adenosina trifosfato (ATP), disfunção mitocondrial e consequente morte celular por necrose (Maglietti *et al.*, 2020; Radzevičiūtė-Valčiukė *et al.*, 2023).

O cálcio em baixas concentrações não tem capacidade de causar citotoxicidade celular, contudo, o cloreto de cálcio pode ser usado como uma terceira opção quando a bleomicina e a cisplatina não se encontram disponíveis, visto que, mesmo mantendo a seletividade de entrada na célula proporcionada pelas anteriores, é menos eficaz. Posto isto, é recomendado o uso de uma concentração de 9 mg/ml, devendo-se injetar o volume de cloreto de cálcio, por via intratumoral, correspondente a metade do volume tumoral (Maglietti *et al.*, 2020; Tellado, Mir & Maglietti, 2022; Radzevičiūtė-Valčiukė *et al.*, 2023).

3.4. TIPOS DE ELÉTRODOS E O SEU PULSO ELÉTRICO

A escolha do tipo de eletrodo e do PE a usar é um desafio para os médicos veterinários que se dedicam a esta área. Para que haja uma correta seleção do tipo de pulso a ser escolhido, deve-se ser consciente das variáveis que a este estão inerentes, como é o caso da amplitude, da duração e do número de aplicações do PE (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021; Scuderi *et al.*, 2024). Encontra-se bem descrito que o aumento quantitativo de PEs não é diretamente proporcional ao efeito por eles produzido, uma vez que, a certa altura, a formação de poros que acontece no fenómeno de eletroporação começa a decair em termos de número, pois as células atingem um ponto em que esse estímulo já não lhes está a causar efeito, designando-se isto por fenómeno de saturação (García-Sánchez *et al.*, 2019).

Aquando do início do estudo da aplicação de pulsos elétricos para provocar eletroporação, foi definido um protocolo de aplicação de 8 PEs com a duração de 100 microssegundos cada um, que é o que ainda se aplica nos dias de hoje. Após a aplicação deste pulso, ele é superior nas regiões à volta do eletrodo e dentro dele, decaindo rapidamente nas regiões fora dele, podendo-se afirmar que a sua distribuição depende não só dos fatores a ele intrínsecos, tal como já referido, mas também do tipo

de tecido onde se está a aplicar este PE e da geometria que os eléktodos que o emitem apresentam (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021; Condello *et al.*, 2022).

A região onde é aplicado o PE, na maioria das vezes, apresenta variados tipos de tecido, tais como: pele, tecido adiposo ou até mesmo músculo, tornando a sua composição heterogénea. Cada um destes tecidos apresenta condutividades elétricas díspares, não conseguindo com isto, na maioria dos casos, obter uma boa distribuição do PE por todos os constituintes da estrutura (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021).

A geometria do eléktrodo é outro parâmetro que influencia a distribuição de PE e deve ser escolhida de acordo com o tamanho e profundidade do nódulo. Existem várias configurações de eléktodos desenvolvidas ao longo dos anos: eléktodos em placa, eléktodos com agulhas de arranjo fixo, eléktodos com agulhas individuais para tumores com localizações mais profundas e de difícil acesso, e eléktodos desenhados para tratamentos específicos, como é o caso dos eléktodos de dedo (Miklavčič *et al.*, 2014; Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021).

3.4.1. Eléktodos não invasivos

Eléktodos não invasivos, tais como os eléktodos em placa, têm utilidade para tumores superficiais, de pequenas dimensões, localizados em zonas de fácil acesso, pois estes eléktodos não podem ser inseridos no tecido. Quando utilizados, deve-se ter em consideração o diâmetro do nódulo, pois este tem de estar contido na distância entre as duas placas paralelas do eléktrodo. Após a aplicação do PE e com o auxílio de gel de modo a aumentar a condutividade, o PE dissipa-se pelo tecido, apresentando a parte mais externa do nódulo um campo elétrico mais forte quando comparado com a parte interna, que se apresenta mais afastada dos eléktodos (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021).

Esta classe de eléktodos apresenta a grande vantagem de se conseguir visualizar com clareza a zona que está a ser tratada, contudo apresenta a desvantagem de ser limitado a zonas específicas, como as orelhas, nariz ou nódulos cujo diâmetro seja inferior ao espaçamento das placas, tal como anteriormente referido (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021).

3.4.2. Eléktodos invasivos

Estes eléktodos invasivos, tal como o nome indica, têm a capacidade de penetrar nos tecidos, de modo a conseguir atingir região onde houve uma infiltração maior no interior destes. Eléktodos

invasivos apresentam variadas geometrias de distribuição das agulhas pertencentes aos elétrodos, como é o caso da disposição hexagonal ou a disposição linear, de modo que se consiga ajustar melhor a seleção de cada elétronodo às proporções do nóculo apresentado (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021).

Esta classe de elétrodos é a mais usada na aplicação de EQT, pois consegue penetrar em tumores de grandes dimensões, ou que se apresentam em regiões de difícil acesso, como é o caso da cavidade nasal, fazendo com que haja uma dissipação do PE, homogeneamente, por todas as partes constituintes do nóculo (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021).

3.5. ELETROQUIMIOTERAPIA NO MELANOMA ORAL MALIGNO EM CÃES

A região anatômica do MOM, por vezes, dificulta as possibilidades de tratamento. Quando o MOM apenas se apresenta na parte de tecidos moles como os lábios ou palato, sem que haja envolvimento ósseo, a distribuição do quimioterápico é ótima. Por outro lado, quando ocorre envolvimento ósseo, dificilmente a EQT servirá de tratamento curativo, promovendo apenas a diminuição do número de células tumorais que se apresentam nas mucosas, e posteriormente será necessário associar outro tratamento (Spugnini *et al.*, 2016; Tellado *et al.*, 2020).

Em vários estudos, que abordam o tratamento do MOM com EQT, foi utilizada a bleomicina sistêmica, contudo o protocolo ainda não esteja completamente padronizado. Embora alguns autores defendam a bleomicina (sistêmica ou intratumoral) como abordagem principal, outros recomendam o uso de cloreto de cálcio para o tratamento de metástases em gânglios linfáticos regionais. Relativamente aos elétrodos, são escolhidos de acordo com o tumor apresentado, variando assim a sua seleção consoante os estudos (Kulbacka *et al.*, 2017; Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022).

Embora a EQT, possa trazer efeitos secundários mínimos como hemorragia, inflamação, necrose, dificuldade de alimentação, edema da língua e descoloração da mucosa na zona intervencionada, a taxa de remissão completa é estimada que seja de 90%, em animais de estadio I e II da doença, devendo por isso ser um dos tratamentos de eleição para o controlo local desta patologia neste estadios. Em animais de estadios III e IV, a sua taxa de remissão total é conjecturada em cerca de 50%, devendo estes animais, também eles ser tratados com EQT mesmo que não se consiga atingir a remissão total, consegue-se que haja uma redução do volume tumoral (Nemec *et al.*, 2020; Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022). Dois exemplos da utilização da técnica de EQT no MOM em cães estão apresentados nas Figuras 6 e 7.

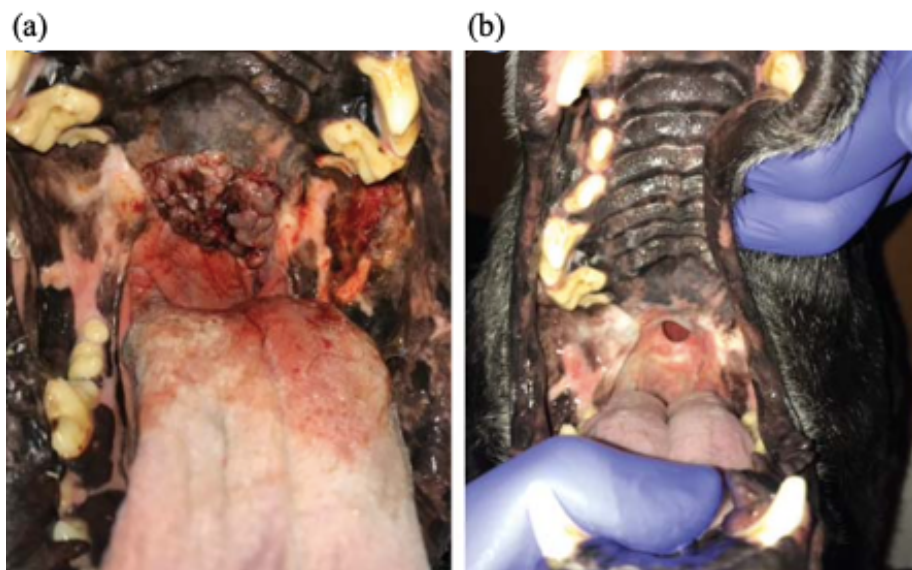


Figura 6 Aspeto macroscópico de um melanoma de estadio II em cão, onde foi aplicada a técnica de EQT. (a) Melanoma de estadio II no palato mole antes do tratamento. (b) Resposta final obtida após 30 dias da realização de EQT, onde apenas se observa a presença de uma fístula, que é descrita como assintomática, sem evidência de tecido tumoral. Adaptado de Tellado *et al.*, 2020.

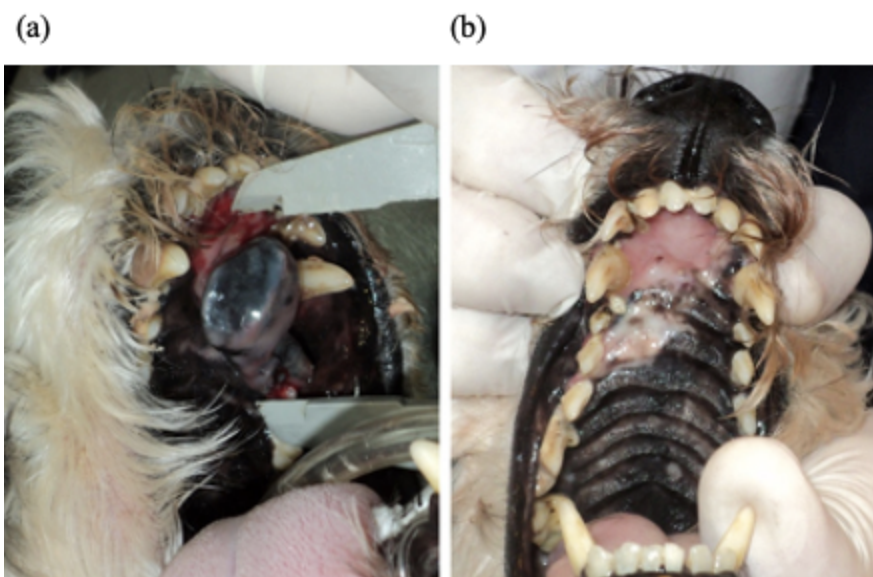


Figura 7 Palato duro de cão com presença de melanoma pigmentado, tratado com EQT. (a) Melanoma no palato mole antes do tratamento. (b) Resposta final obtida após 4 meses da realização de EQT, onde se observa uma resposta completa ao tratamento e a presença de uma hipopigmentação no local onde o tumor estava presente, que poderá vir a ser revertida com o tempo, tal como na maioria dos casos. Adaptado de Tellado, Mir & Maglietti, 2022.

3.6. VANTAGENS E DESVANTAGENS

A EQT representa uma modalidade terapêutica em crescimento, que associa, como já referido, uma componente física de administração de PEs como a administração de quimioterápicos. Como tal, a implementação clínica desta acarreta alguns constrangimentos relacionados com a execução da técnica. Neste contexto, a Tabela 3 visa a sistematização das principais vantagens e desvantagens inerentes à utilização de EQT na prática veterinária.

Tabela 3 Esquematização das vantagens e desvantagens da EQT.

Vantagens	Desvantagens
- Capacidade de obter concentrações elevadas de quimioterápico no tumor, mesmo com baixas doses de administração deste no animal (Campana <i>et al.</i>, 2016; Rols, Golzio & Teissié, 2021); - Pouco dispendiosa em termos monetários e fácil de realizar em comparação a outras	- Requer a utilização de anestesia geral e/ou sedação para execução da técnica (Tellado, Mir & Maglietti, 2022); - A seleção de elétrodos pode nem sempre ser a mais fácil dada a localização tumoral, sendo isto um ponto-chave para os bons resultados da técnica (Reberšek & Miklavčič, 2011);

técnicas (Tellado <i>et al.</i>, 2020; Condello <i>et al.</i>, 2022); • Controlo tumoral total localmente, na maioria dos pacientes (Campana <i>et al.</i>, 2016); • Técnica pouco invasiva e com resposta rápida ao tratamento por parte dos pacientes (Fusco <i>et al.</i>, 2021); • É um tratamento relativamente rápido, efetuado em um dia, com possibilidade de repetição, se necessário (Campana <i>et al.</i>, 2016); • Poucos efeitos secundários, permitindo a utilização em pacientes debilitados (Maglietti <i>et al.</i>, 2020; Fusco <i>et al.</i>, 2021; Condello <i>et al.</i>, 2022); • Pode ser utilizada em sinergismo com outros tratamentos (Condello <i>et al.</i>, 2022); • Associada a um efeito imunológico, que promove o desaparecimento das células tumorais em apoptose (Miklavčič <i>et al.</i>, 2014; Tellado, Mir & Maglietti, 2022); • Apresenta seletividade para células tumorais, preservando os tecidos adjacentes (Maglietti <i>et al.</i>, 2020); • Pode ser efetuada sem recurso a quimioterápicos, como é exemplo o cloreto de cálcio (Miklavčič <i>et al.</i>, 2014); • Útil em tumores que apresentem sangramento ou ulceração (Tellado, Mir & Maglietti, 2022);	• Impedimento de realização de forma ambulatoria, visto que é necessário o controlo da anestesia (Tellado, Mir & Maglietti, 2022); • Limitação da utilização apenas em tumores superficiais sem grande ação em metástases mais internas (Campana <i>et al.</i>, 2019; Cemazar & Sersa, 2019); • Possível desconforto ou necrose no local (Pazzi, Steenkamp & Rixon, 2022).
--	--

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Aplicável a tumores com localizações de difícil recessão como orelhas e nariz (Cindrič, Kos & Miklavčič, 2021). | |
|---|--|

3.7. POSSÍVEIS EVOLUÇÕES TUMORAIS

Aquando do término da sessão de EQT, o animal não precisa de ficar internado, podendo regressar a casa no próprio dia. O acompanhamento destes animais é essencial e é aconselhado fazer-se numa fase inicial 15 dias após a sessão e depois passados 1,2,4 e 6 meses após a EQT, de modo a controlar o possível reaparecimento tumoral. O acompanhamento deve ser feito por meio de registo fotográfico, de preferência com a realização de medições para fornecer uma ideia se existe ou não remissão tumoral (Campana *et al.*, 2016; Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

Apresentam-se descritas 4 possíveis evoluções tumorais após uma sessão de EQT. A evolução comum é a que acontece na maioria dos casos, em que o tumor fica ligeiramente edemaciado, mas depois diminui de tamanho, ao longo dos dias, de modo a atingir a completa remissão tumoral. Na evolução em dois tempos, a fase inicial acontece de forma semelhante à anterior, mas a certo ponto, a lesão deixa de diminuir de tamanho por tempo indeterminado, voltando após isso a diminuir até atingir a remissão completa. Na evolução sem alteração, a lesão aumenta de tamanho após a EQT, mas depois regressa ao seu tamanho original. Por fim, existe a evolução de escape, onde começa a remissão tumoral, mas a certo ponto o tumor começa a aumentar de tamanho novamente. (Tellado, Mir & Maglietti, 2022) (Figura 8).

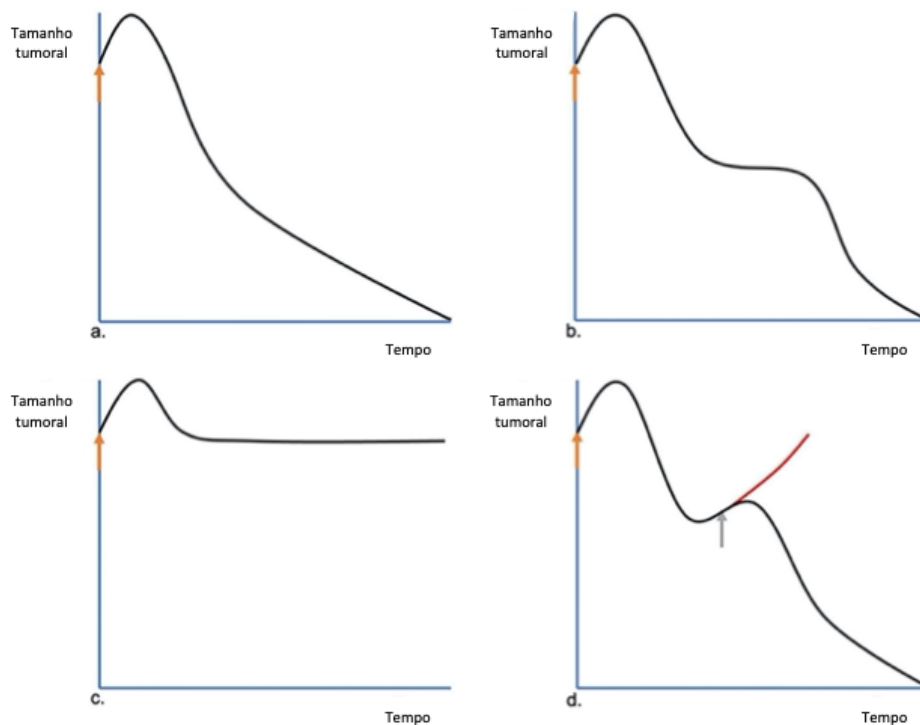


Figura 8 Eventuais progressões tumorais (a) Evolução comum. (b) Evolução em dois tempos. (c) Evolução sem alteração. (d) Evolução de escape. Adaptado de Tellado, Mir & Maglietti, 2022.

Embora esta técnica seja muito eficaz e com baixos efeitos secundários, o acompanhamento da sua progressão deve ser rigoroso, pois caso aconteça, por exemplo, uma evolução de escape, provavelmente será necessário agendar uma nova sessão de EQT (Maglietti *et al.*, 2020; Tellado, Mir & Maglietti, 2022).

3.8. PERSPETIVAS FUTURAS

A EQT tem vindo a afirmar-se como uma abordagem terapêutica promissora na oncologia veterinária, sobretudo no tratamento de neoplasias superficiais e de difícil abordagem cirúrgica (Cemazar *et al.*, 2008; Campana *et al.*, 2016). Apesar dos avanços já registados, as perspetivas futuras apontam para um alargamento do campo de aplicação, ou seja, aplicação não só a tumores superficiais como a metástases mais internas, nomeadamente do trato gastrointestinal, por via endoscópica (Campana *et al.*, 2019; Čemažar & Sersa, 2019). A investigação atual centra-se no desenvolvimento de protocolos mais otimizados, que permitam uma maior uniformização dos parâmetros elétricos e das dosagens farmacológicas, com o objetivo de melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos (Čemažar & Sersa, 2019).

Adicionalmente, prevê-se o começo de utilização da EQT em combinação com outras modalidades terapêuticas mais atuais, como a imunoterapia (estimulação do sistema imunitário com o auxílio da vacinação) e a terapia genética, (transferência de IL-12 que promove efeito terapêutico em patologias como o MOM) e não só com terapias convencionais, potenciando sinergias que ampliem o controlo tumoral, inclusive em neoplasias de comportamento mais agressivo (Condello *et al.*, 2022).

Por fim, a realização de estudos e a consolidação de evidência científica permitiriam validar a EQT como uma ferramenta terapêutica de referência, não apenas em cães, mas também noutras espécies. Para além da oncologia, a eletroporação demonstra ainda uma ampla aplicabilidade na indústria alimentar, sendo utilizada, por exemplo, na extração de sumos e outros componentes dos tecidos, na promoção da desidratação de materiais vegetais e na preservação alimentar, através da inativação de microrganismos sem recurso a temperaturas elevadas (Campana *et al.*, 2019; Mahnič-Kalamiza & Miklavčič, 2021).

4. CONCLUSÃO

A medicina veterinária tem apresentado um progresso significativo, de modo a dar resposta aos desafios diários desta profissão. Este avanço tem permitido o desenvolvimento de abordagens mais inovadoras e mais promissoras na prestação de cuidados de saúde personalizados aos animais de companhia, de forma a prolongar a esperança média de vida e a qualidade de vida dos mesmos.

Técnicas inovadoras, como é o caso da EQT, são um dos motivos pelo quais a esperança média dos animais de companhia ter vindo a aumentar nos últimos anos. A EQT consegue dar resposta a problemas que até há uns anos não a tinham, minimizando os efeitos secundários que seriam provocados por técnicas consideradas como “convencionais”. A EQT tem vindo a afirmar-se como uma alternativa esperançosa no tratamento de neoplasias, nomeadamente do MOM, uma das formas mais agressivas de neoplasia oral em cães. No MOM a EQT revela-se, particularmente relevante, ao oferecer uma alternativa viável em casos onde as opções tradicionais são limitadas ou pouco eficazes.

Como acontece em variadas técnicas, esta apresenta numerosas vantagens, mas também algumas limitações. Contudo, com o apoio dos processos tecnológicos e com a crescente disseminação de conhecimento técnico entre profissionais da área, esta abordagem tende a consolidar-se como uma alternativa terapêutica eficaz, segura e menos invasiva, contribuindo de forma significativa para o alargamento das opções de tratamento oncológico e para a melhoria da qualidade de vida e do prognóstico dos animais de companhia.

5. BIBLIOGRAFIA

Bellows, J., 2004. *Oral surgical equipment, materials, and techniques*. In: J. Bellows, ed. *Small animal dental equipment, materials, and techniques*. 1st edn. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 297–362.

Benedik, J., Ogorevc, B., Kranjc Brezar, S., Cemazar, M., Sersa, G. & Groselj, A., 2020. Comparison of general anesthesia and continuous intravenous sedation for electrochemotherapy of head and neck skin lesions. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(4), pp. 514–521. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9717680/>.

Campana, L.G., Clover, A.J.P., Valpione, S., Quaglino, P., Gehl, J., Kunte, C., *et al.*, 2016. Treatment efficacy with electrochemotherapy: a multi-institutional prospective observational study on 376 patients with superficial tumors. *European Journal of Surgical Oncology*, 42(12), pp. 1914–1923. Disponível em: [https://www.ejso.com/article/S0748-7983\(16\)30606-0/fulltext](https://www.ejso.com/article/S0748-7983(16)30606-0/fulltext).

Campana, L.G., Miklavčič, D., Bertino, G., Marconato, R., Valpione, S., Imarisio, I., Brizio, M., Teissie, J., Gehl, J., Sersa, G. & Curatolo, P., 2019. Electrochemotherapy of superficial tumors—current status: basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging applications. *Seminars in Oncology*, 46(2), pp. 173–191. Disponível em: https://lbk.fe.uni-lj.si/pdfs/sem_oncol_2019.pdf.

Cemazar, M., Tamzali, Y., Sersa, G., Tozon, N., Mir, L.M., Miklavčič, D., Lowe, R. & Teissié, J., 2008. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), pp. 826–831. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0117.x>.

Čemažar, M. & Sersa, G., 2019. Recent advances in electrochemotherapy. *Bioelectricity*, 1(3), pp. 204–213. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8370294/pdf/bioe.2019.0028.pdf>.

Cindrič, H., Kos, B. & Miklavčič, D., 2021. Electrodes and electric field distribution in clinical practice. In: Springer eBooks, pp. 21–59. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-80668-2_2.

Condello, M., D’Avack, G., Spugnini, E.P. & Meschini, S., 2022. Electrochemotherapy: an alternative strategy for improving therapy in drug-resistant solid tumors. *Cancers*, 14(17), p. 4341. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers14174341>.

Cunha, S.C.D.S., Corgozinho, K.B., Silva, F.B.F., da Silva, K.V.G.C. & Ferreira, A.M.R., 2018. Radiation therapy for oral melanoma in dogs: a retrospective study. *Ciência Rural*, 48(4). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160396>.

Dyce, K.M., Sack, W.O. and Wensing, C.J.G., 2010. *Textbook of veterinary anatomy*. 4th ed. St. Louis: Saunders/Elsevier.

Eubanks, D.L., 2007. Oral soft tissue anatomy in the dog and cat. *Journal of Veterinary Dentistry*, 24(2), pp. 126–129. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/089875640702400212>.

Fusco, R., *et al.*, 2021. New electrodes and treatment planning for deep-seated and intraluminal localized tumors. In: Springer eBooks, pp. 321–338. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-80668-2_14.

García-Sánchez, T., *et al.*, 2019. Impact of the number of electric pulses on cell electrochemotherapy in vitro: limits of linearity and saturation. *Bioelectrochemistry*, 129, pp. 218–227. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.05.021>.

Goldschmidt, M.H. & Goldschmidt, K.H., 2017. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In: D.J. Meuten, ed. *Tumors in domestic animals*. 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, pp. 88–141. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119181200.ch4>.

Grimm, K.A., Lamont, L.A., Tranquilli, W.J., Greene, S.A. and Robertson, S.A., 2015. *Veterinary Anesthesia and Analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones*. 5th ed. Ames: Wiley-Blackwell.

He, X., Gao, Y., Deng, Y., He, J., Nolte, I., Murua Escobar, H. & Yu, F., 2024. *The comparative oncology of canine malignant melanoma in targeted therapy: a systematic review of in vitro experiments and animal model reports*. International Journal of Molecular Sciences, 25(19), p.10387. doi:10.3390/ijms251910387. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms251910387>.

Impellizeri, J.A. (ed.), 2021. *Electroporation in Veterinary Oncology Practice: Electrochemotherapy and Gene Electrotransfer for Immunotherapy*. 1st ed. Cham: Springer International Publishing. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-80668-2>.

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J., 2017. *Histologia básica: texto & atlas*. 13th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kopacz-Bednarska, A. and Król, T., 2022. Cisplatin — properties and clinical application. *Oncology in Clinical Practice*. 18 (3) pp166 – 176. Disponível em: https://journals.viamedica.pl/oncology_in_clinical_practice/article/view/OCP.2022.0020.

Kulbacka, J. *et al.*, 2017. Electrochemotherapy combined with standard and CO2 laser surgeries in canine oral melanoma. *Slovenian Veterinary Research*, 54(4). Disponível em: <https://doi.org/10.26873/svr-322-2017>.

Maglietti, F., Tellado, M., De Robertis, M., Michinski, S., Fernández, J., Signori, E. and Marshall, G., 2020. Electroporation as the Immunotherapy Strategy for Cancer in Veterinary Medicine: State of the Art in Latin America. *Vaccines*, 8(3), p.537 Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/3/537>.

Mahnič-Kalamiza, S. and Miklavčič, D., 2021. O fenômeno da eletroporação. In: *Série de engenharia de alimentos*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-70586-2_3.

Manley, C., Leibman, N., Wolchok, J., Rivière, I., Bartido, S., Craft, D. & Bergman, P., 2010. Xenogeneic murine tyrosinase DNA vaccine for malignant melanoma of the digit of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), pp. 94–99. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0627.x>.

Mikiewicz, M., Paździor-Czapula, K., Gesek, M., Lemishevskyi, V. & Otrocka-Domagała, I., 2019. Canine and feline oral cavity tumours and tumour-like lesions: a retrospective study of 486 cases (2015–2017). *Journal of Comparative Pathology*, 172, pp. 80–87. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.09.007>.

Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., Heller, R. & Serša, G., 2014. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering OnLine*, 13(1), p. 29. Disponível em: <https://biomedical-engineering-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-925X-13-29>.

Modiano, J.F., Ritt, M.G. & Wojcieszyn, J., 1999. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(3), pp. 163–174. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1999.tb02173.x>.

Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J. & Kolb, M., 2008. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *International Journal of*

Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 3(3), pp. 255–264. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17936056/>.

Nemec, A., Milevoj, N., Lampreht Tratar, U., Serša, G., Čemažar, M. & Tozon, N., 2020. Electroporation-based treatments in small animal veterinary oral and maxillofacial oncology. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 575911. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575911>.

North, S.M. & Banks, T.A., 2009. The human–animal bond and why veterinary oncology is important. In: *Elsevier eBooks*, pp. 1–3. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-2800-7.00005-4>.

Owen, L.N., ed., 1980. *TNM classification of tumours in domestic animals (VPH/CMO/80.20)*. Geneva: World Health Organization.

Pazzi, P., Steenkamp, G. & Rixon, A.J., 2022. Treatment of canine oral melanomas: a critical review of the literature. *Veterinary Sciences*, 9(5), p. 196. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci9050196>.

Pinello, K., Amorim, I., Pires, I., Canadas-Sousa, A., Catarino, J., Faísca, P., Branco, S., Peleteiro, M.C., Silva, D., Severo, M. & Niza-Ribeiro, J., 2022. *Vet-OncoNet: Malignancy analysis of neoplasms in dogs and cats*. *Veterinary Sciences*, 9(10), p.535. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci9100535>.

Polton, G., Borrego, J.F., Clemente-Vicario, F., Clifford, C.A., Jagielski, D., Kessler, M., Kobayashi, T., Lanore, D., Queiroga, F.L., Rowe, A.T., Vajdovich, P. & Bergman, P.J., 2024. Melanoma of the dog and cat: consensus and guidelines. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, p. 1359426. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2024.1359426/full>.

Radzevičiūtė-Valčiukė, E. *et al.*, 2023. Calcium Electrochemotherapy for Tumor Eradication and the Potential of High-Frequency Nanosecond Protocols. *Pharmaceuticals*, 16(8), p. 1083. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph16081083>.

Reberšek, M. and Miklavčič, D., 2011. Advantages and Disadvantages of different concepts of electroporation pulse Generation. *Automatika*, 52(1), pp. 12–19. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00051144.2011.11828399>.

Requicha, J.F., Pires, M.D.A., Albuquerque, C.M. & Viegas, C.A., 2015. Neoplasias da cavidade oral do cão – breve revisão. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 37(1), pp. 41–46. Disponível em: <https://rbmv.org/BJVM/article/download/359/825>.

Rolim, V.M., Casagrande, R.A., Watanabe, T.T., Wouters, A.T.B., Wouters, F., Sonne, L. & Driemeier, D., 2012. *Amelanotic melanoma in dogs: retrospective study of 35 cases (2004–2010) and immunohistochemical characterization*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(5), pp.409–415. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/GHL7qjdNdXznWTBTFKsN9fk>.

Rols, M., Golzio, M. & Teissié, J., 2021. Electroporation: technology and science. In: *Springer eBooks*, pp. 3–19. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-80668-2_1.

Rubinsky, L., Guenther, E., Mikus, P., Stehling, M. and Rubinsky, B., 2015. Electrolytic effects during tissue ablation by electroporation. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 14(6), pp.581–588. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533034615601549>.

Satthathum, C., Srisampane, S., Jariyarangsirattana, P., Anusorn, P., Sattasathuchana, P. & Thengchaisri, N., 2023. Characteristics of canine oral tumors: Insights into prevalence, types, and lesion distribution. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 0, p.1. Disponível em: <https://doi.org/10.5455/javar.2023.i709>.

Scuderi, M., Dermol-Cerne, J., Scancar, J., Markovic, S., Rems, L. e Miklavcic, D. (2024) 'The equivalence of different types of electric pulses for electrochemotherapy with cisplatin – an in vitro study', *Radiology and Oncology*, 58(1), pp. 51–66. Disponível em: <https://www.radioloncol.com/index.php/ro/article/view/4263/5214>.

Sersa, G., Cemazar, M. & Miklavčič, D., 2016. Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumors in dogs and cats. *JoVE*, (116), e54760. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/54760>.

Simons, K., 2015. Oral tumours in dogs: a retrospective study of 110 cases (2002–2014). [online] Disponível em: <https://studenttheses.uu.nl/handle/20.500.12932/20071>.

Smedley, R.C., Sebastian, K. & Kiupel, M., 2022. Diagnosis and prognosis of canine melanocytic neoplasms. *Veterinary Sciences*, 9(4), p. 175. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci9040175>.

Spugnini, E.P., Azzarito, T., Fais, S., Fanciulli, M. & Baldi, A., 2016. Electrochemotherapy as first line cancer treatment: experiences from veterinary medicine in developing novel protocols. *Current Cancer Drug Targets*, 16(1). Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156800961601151218155340>.

Stevenson, V.B., Klahn, S., LeRoith, T. & Huckle, W.R., 2023. Canine melanoma: a review of diagnostics and comparative mechanisms of disease and immunotolerance in the era of the immunotherapies. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, p. 1046636. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1046636>.

Tellado, M., Mir, L.M. and Maglietti, F., 2022. Veterinary guidelines for electrochemotherapy of superficial tumors. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, Article 868989. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.868989/full>.

Tellado, M.N., Maglietti, F.H., Michinski, S.D., Marshall, G.R. & Signori, E., 2020. Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors influencing treatment outcome. *Radiology and Oncology*, 54(1), pp. 68–78. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/raon-2020-0014>.

Todoroff, R.J. & Brodey, R.S., 1979. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175(6), pp. 567–571. Disponível em: <https://doi.org/10.2460/javma.1979.175.06.567>.

Tozon, N., Tamzali, Y. & Cemazar, M., 2016. Electrochemotherapy in veterinary oncology. In: D. Miklavčič, ed. *Handbook of Electroporation*. Cham: Springer. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_107-1.

Vail, D.M., Thamm, D.H. & Liptak, J.M., 2019. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 6th ed. St. Louis: Elsevier.

Villalobos, A. & Kaplan, L., 2007. *Canine and feline geriatric oncology: honoring the human-animal bond*. Ames, IA: Blackwell Publishing. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470344446>.

Withrow, S.J., Vail, D.M. & Page, R.L., 2019. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB12359810>.

Zachary, J.F., 2017. *Pathologic basis of veterinary disease*. 6th ed. St. Louis: Elsevier.

