



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**A ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS EM GATOS**

**Bruna Rafaela Saldanha Marelo**

**Coimbra, junho 2018**



## **ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

### **A ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS EM GATOS**

**Coimbra, junho 2018**

**Bruna Rafaela Saldanha Marelo**

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

#### **Constituição do Júri**

*Presidente do Júri*

Prof. Dra. Anabela Almeida:

*Arguente:*

Prof. Dr. Hugo Gregório

*Orientador:*

Prof. Dra. Ana Catarina Figueira

#### **Orientador Interno**

Prof. Dra. Ana Catarina Figueira

#### **Orientadores Externos**

Dr. Gonçalo Petrucci

Hospital Veterinário do Porto

Dra. Inma Beas López

Hospital Veterinário ARS

“Dissertação do Estágio curricular do ciclo  
de estudos conducentes ao Grau de Mestre  
em Medicina Veterinária da EUVG.”

Aos meus pais... o meu grande apoio e força em todas as horas! A vocês devo tudo até aqui e estou certa que foram e continuarão a ser a inspiração e os pilares da minha vida.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais por me ensinarem que para alcançar é necessário trabalho, humildade, honestidade e sacrifício. Por sempre me terem dado a oportunidade de fazer as minhas escolhas. Porque sei que querem o melhor para mim e fazem tudo o que está ao vosso alcance para me verem bem... Serei vos sempre e eternamente grata.

À minha irmã, por teres confiado sempre em mim, por nunca teres deixado passar uma avaliação sem um “boa sorte”. Pela paciência para ouvir as conversas e opiniões de veterinária e, sobretudo, porque se alguma vez eu caí tu estiveste ao meu lado para me dar a mão e mostrar o lado positivo que há em tudo.

Ao meu irmão por todo o carinho. Por estares comigo para celebrares os bons momentos e por me arrancares um sorriso nos menos bons.

À minha família sempre presente e com uma palavra de alento em todas as situações. Queridos bisavós, avós, tios, madrinha e padrinho sem dúvida que estou muito agradecida por vos ter na minha vida e pelas palavras encorajadoras a que me habituaram ao longo deste percurso. Primos Bruno e Filipe porque sei que estão sempre disponíveis.

A ti Fábio por acreditares sempre em mim e que sou capaz! De forma incondicional.

Às minhas amigas especialmente a vocês: Filó, Mariana, Daniela e Filipa pelo carinho apoio e amizade ao longo do curso. À melhor companheira de Barcelona, Bea obrigada!

A ti Sofia porque ao longo de 6 anos pude sempre contar contigo... Com os nervos em franja ou com os nervos mais ao menos em franja estiveste nos melhores e piores momentos, assim como continuas a estar sempre à distância de uma chamada a qualquer hora.

À minha orientadora interna, Prof. Dra. Ana Catarina por ouvir sempre os meus desabafos, pelo incentivo, disponibilidade e ajuda fundamental na realização desta dissertação. Ao Prof. Eng. Ricardo Cabeças pela disponibilidade e esclarecimento de dúvidas.

Ao meu orientador externo Dr. Gonçalo Petrucci pela ajuda e conhecimento transmitido. A todos os elementos da equipa do Hospital Veterinário do Porto por todos os momentos e por terem contribuído da melhor forma para a minha formação profissional.

E como não poderia deixar de ser... Aos meus animais por estarem por trás deste sonho!

Obrigada!

## **Índice Geral**

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas, símbolos e siglas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>4</b>
A oncologia veterinária .....	4
<b>A eletroquimioterapia</b> .....	<b>6</b>
O que é a eletroquimioterapia - princípios em que se baseia e como atua .....	6
Os agentes quimioterápicos potenciados pela eletroquimioterapia .....	9
A bleomicina .....	9
A cisplatina .....	10
A doxorubicina e a mitoxantrona.....	11
O pulso elétrico, os elétrodos e o processo de eletroporação .....	11
Tamanho dos nódulos .....	13
Efeitos vasculares e imunológicos da eletroquimioterapia.....	14
As vantagens e desvantagens da eletroquimioterapia.....	15
Metástases não cutâneas/subcutâneas .....	17
Seleção de pacientes a serem tratados com eletroquimioterapia.....	18
Procedimentos gerais que envolvem o tratamento com eletroquimioterapia.....	18
Acompanhamento do paciente.....	19
Eletroquimioterapia no tratamento oncológico em gatos .....	20
Perspetivas futuras.....	25
<b>Conclusão</b> .....	<b>27</b>

<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>29</b>
<b>Anexos</b> .....	Erro! Indicador não definido.

## **Índice de figuras**

<b>Figura 1</b> - Ilustração do conceito básico da eletroquimioterapia .....	6
<b>Figura 2</b> - Rearranjo da bicamada lipídica da membrana celular após aplicação dos pulsos elétricos .....	7
<b>Figura 3</b> - Passagem do fármaco quimioterápico através dos pseudo-túneis formados pela agregação das proteínas transmembranares .....	8

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Doses de bleomicina que devem ser administradas segundo o tamanho do tumor e a via de aplicação.....	10
<b>Tabela 2</b> - Doses de cisplatina que devem ser administradas segundo o tamanho do tumor e a via de aplicação.....	11
<b>Tabela 3</b> - Tipos de elétrodos, configuração e indicações de uso.....	13
<b>Tabela 4</b> - Compilação de estudos em gatos com tumores mais comuns, tratados com eletroquimioterapia. Identificação do tipo de tumor, resultados e efeitos secundários .....	24
<b>Tabela 5</b> - Compilação de estudos em gatos tratados com eletroquimioterapia. Apresentação dos tumores menos frequentes, tipo de tumor apresentado, resultados e efeitos secundários.	25

## **Lista de abreviaturas, símbolos e siglas**

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CCE - Carcinoma das células escamosas

cm - Centímetro

cm<sup>2</sup> - Centímetro quadrado

cm<sup>3</sup> - Centímetro cúbico

DE - Doença estável

DP - Doença progressiva

EQT - Eletroquimioterapia

EP - Eletroporação

ESOPE - *European Standard Operating Procedures*

h - Hora

IT - Intratumoral

IV- Intravenoso

Kg - Quilograma

ml - Mililitro(s)

mg - Miligrama(s)

p. ex - Por exemplo

RC - Remissão completa

RP - Remissão parcial

SOP - *Standard Operating Procedures*

TLD - Tempo livre de doença

UV - Ultravioleta

UI - Unidade(s) internacional(ais)

V - Volume

V/cm - Volt por centímetro

% - Percentagem

> - Maior que

< - Menor que

= - Igual

$\pi$  - Pi = 3,14

$\mu$ s - microsegundo(s)

# 1 A ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS EM GATOS

2

Bruna Marelo<sup>a</sup>, Gonçalo Petrucci<sup>b</sup>, Ana Catarina Figueira<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([bmarelo\\_fec@hotmail.com](mailto:bmarelo_fec@hotmail.com))

<sup>b</sup> Hospital Veterinário do Porto, Travessa Silva Porto 174, 4250-475 Porto, Portugal ([goncalo.petrucci@onevetgroup.pt](mailto:goncalo.petrucci@onevetgroup.pt))

<sup>c</sup> Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, Avenida José R. Sousa Fernandes 197, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([acfigueira@gmail.com](mailto:acfigueira@gmail.com))

## **Resumo**

A eletroquimioterapia (EQT) é um tratamento que combina a administração sistêmica ou local de fármacos pouco permeáveis, como a bleomicina ou a cisplatina e a aplicação de pulsos elétricos locais. Os pulsos aplicados provocam a eletroporação (EP) da membrana das células tumorais, o que a torna permeável ao agente quimioterápico administrado, maximizando a sua concentração intracelular e a sua ação citotóxica. Tem-se destacado na medicina veterinária pela sua facilidade de aplicação, baixo custo e baixa toxicidade, o que faz com que esteja a ser incluída como uma das primeiras opções de tratamento, por exemplo no caso de tumores em locais anatómicos complicados com uma difícil excisão cirúrgica. Tem sido demonstrada a eficácia da EQT em vários estudos na medicina veterinária, podendo ser utilizada no tratamento de tumores únicos ou múltiplos, cutâneos, subcutâneos, primários ou recorrentes, de diferentes tipos histológicos de forma paliativa ou como tratamento adjuvante à cirurgia. O objetivo deste artigo de revisão é compilar o conhecimento atual sobre o uso de EQT mais especificamente em gatos, apresentando conclusões gerais sobre os estudos já realizados e identificando os prós e contras da EQT.

### **Palavras-chave:**

Gato; Tumor; Eletroquimioterapia; Eletroporação

## **Abstract**

Electrochemotherapy (ECT) is a treatment that combines the systemic or local administration of drugs with low permeability, such as bleomycin or cisplatin and the application of local electrical pulses. The pulses applied provoke the electroporation (EP) of the membrane of the tumor cells, which makes it permeable to the chemotherapeutic agent administered maximizing its intracellular concentration and its cytotoxic action. It has been highlighted in veterinary medicine for its ease of application, low cost and low toxicity, which makes it to be included as a first line of treatment, for example in tumors in anatomical sites complicated with difficult surgical excision. The efficacy of electrochemotherapy in several studies in veterinary medicine has been demonstrated and can be used in the treatment of single or multiple, cutaneous, subcutaneous, primary or recurrent tumors of different histological types in palliative form or as an adjuvant treatment to surgery. The objective of this review article is to compile current knowledge about the use of electrochemotherapy more specifically in cats, presenting general conclusions about the studies already performed and identifying the pros and cons of the ECT.

## **Keywords:**

Cat; Tumor; Electrochemotherapy; Eletroporation

## Introdução

### A oncologia veterinária

Os processos oncológicos afetam toda as espécies sem fronteiras. Na medicina veterinária a prevalência desta doença tem aumentado ao longo dos anos, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em animais de companhia (Morris, 2001; Withrow, 2013). O aumento da prevalência desta doença leva à crescente preocupação em encontrar tratamentos efetivos, não só para o controlo tumoral local, mas também para o controlo à distância, ou seja, do processo metastático. O aparecimento súbito de neoplasias com rápido crescimento e a manifestação dos sinais clínicos numa fase avançada da doença, fazem com que a erradicação, ou mesmo o controlo tumoral, seja um desafio constante para os oncologistas veterinários. No momento em que os tumores são clinicamente detetáveis, muitas vezes, já contêm um número significativo de mutações, o que torna as células tumorais resistentes a múltiplos agentes quimioterápicos (Rodriguez, 2010; Dobson, 2010; Morris, 2001; Spugnini, Azzarito, Fais, Fanciulli, & Baldi, 2016). Assim, os processos oncológicos são, cada vez mais, tratados com terapias multimodais que envolvem a associação de cirurgia, quimioterapia e por vezes radioterapia, na tentativa do seu controlo (Dobson, 2010; Morris, 2001; Spugnini et al., 2016).

A excisão cirúrgica radical pode levar a excelentes resultados no controlo tumoral, no entanto, é crucial obter margens cirúrgicas limpas. Assim, a cirurgia quando usada como única forma de tratamento apresenta algumas limitações, nomeadamente em tumores com elevada capacidade de metastização e em locais anatómicos de difícil excisão como em lesões no plano nasal, oculares ou orais (Tozon, Pavlin, Sersa, Dolinsek, & Cemazar, 2014; Withrow, 2013). Desta forma, animais com este tipo de neoplasias poderão ficar sujeitos a cirurgias desfigurantes ou mutilantes com uma recuperação difícil e por isso muitas vezes não são aceites pelos tutores (Spugnini, Citro, & Baldi, 2009).

A radioterapia tem por base a utilização de uma radiação ionizante que origina danos no ADN, com o objetivo de levar à morte celular. No entanto, isto nem sempre acontece, e as lesões provocadas no ADN impedem a replicação normal, mas não conduzem à morte celular imediata. Estes danos provocados pela radiação manifestam-se à *posteriori* aquando da divisão celular (Dobson, 2010; Gordon, 2013). Os efeitos secundários associados são vários, tais como “tumores induzidos por radiação”, fibrose local, necrose e lesões nervosas (Gordon, 2013; Spugnini, Fanciulli, Citro, & Baldi, 2012). É também uma técnica ainda não amplamente disponível na medicina veterinária e associada a custos elevados (Tozon et al., 2014).

A quimioterapia sistémica é uma das abordagens terapêuticas mais utilizadas para o controlo tumoral. É frequentemente usada como tratamento adjuvante da cirurgia e/ou

radioterapia, em tumores com elevada capacidade de metastização (Biller et al., 2016; Page, 2013; Spugnini et al., 2016). Baseia-se na administração pulsátil de fármacos citotóxicos, usando doses máximas toleradas pelo animal. A dose máxima tolerada é a quantidade máxima de fármaco que pode ser administrada, antes que a toxicidade exceda os benefícios do fármaco (Page, 2013; Spugnini et al., 2016). Alguns quimioterápicos têm um índice terapêutico tão reduzido que estão associados a efeitos sistêmicos significativos, incluindo toxicidade gastrointestinal, cardíaca e medular. Além disso, a quimioterapia sistêmica muitas vezes não é eficaz, porque o quimioterápico administrado não alcança concentrações terapêuticas no local alvo. A administração destes fármacos via intravenosa (IV) envolve vários fatores limitantes, em particular a toxicidade sistêmica e a eficácia local limitada (Biller et al., 2016; Page, 2013; Spugnini et al., 2016; Spugnini et al., 2011).

Todas as limitações e efeitos secundários destes tratamentos estão associados a uma diminuição da qualidade de vida do animal, o que leva a que cada vez mais se recorra a tratamentos inovadores e combinações terapêuticas sinérgicas que visam manter baixos níveis sistêmicos e níveis terapêuticos nos locais alvo, minimizando a toxicidade e maximizando a eficácia (Page, 2013; Spugnini et al., 2009).

No sentido de colmatar as limitações dos tratamentos anteriormente referidos, controlar neoplasias recorrentes, inoperáveis e/ou refratárias à maioria dos tratamentos convencionais, são efetuados continuamente múltiplos estudos e investigações dos quais resultam novas abordagens terapêuticas. Assim surge a eletroquimioterapia (EQT) uma técnica que combina a eletroporação (EP) e a quimioterapia (Escoffre & Rols, 2012; Impellizeri, Aurisicchio, Forde, & Soden, 2016; Plaschke et al., 2016), com potencial para alcançar altas taxas de remissão sem os efeitos secundários associados aos procedimentos referidos (Spugnini et al., 2016).

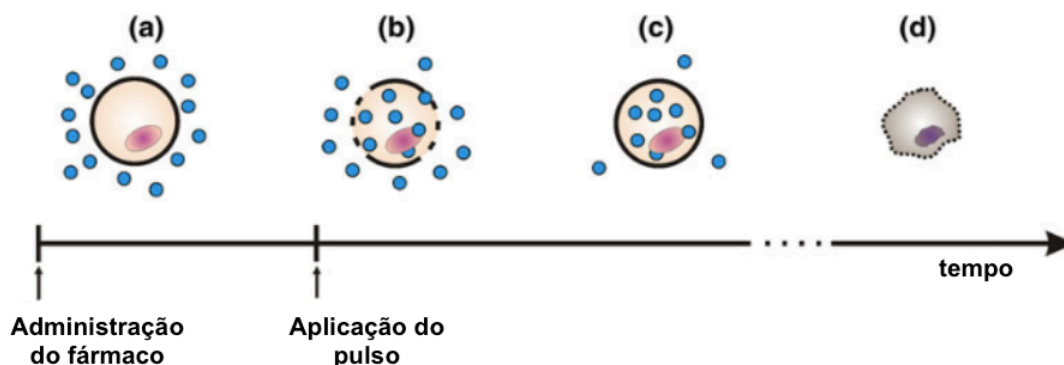
O objetivo do presente trabalho é fazer uma compilação sobre o conhecimento atual da EQT como abordagem terapêutica na medicina veterinária, referindo as indicações e limitações inerentes à técnica. Pretende-se ainda apresentar as particularidades e principais conclusões sobre os estudos já realizados nomeadamente em gatos, bem como perspetivas futuras da sua aplicação terapêutica em gatos com neoplasias.

## A eletroquimioterapia

### O que é a eletroquimioterapia - princípios em que se baseia e como atua

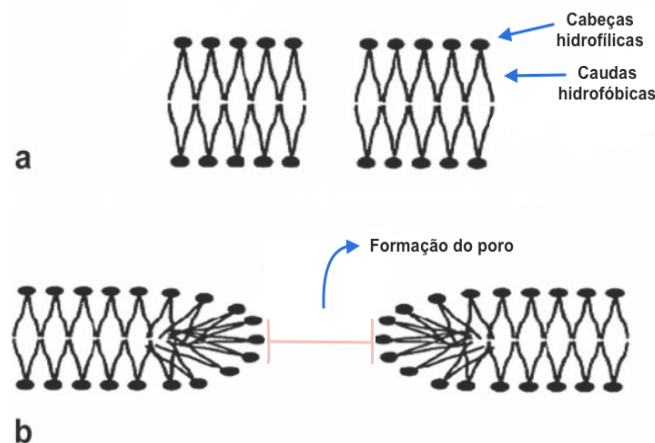
A EQT é uma técnica que associa um método físico, através da aplicação de pulsos elétricos, e um método químico através da administração de um agente quimioterápico (Impellizeri et al., 2016; Plaschke et al., 2016).

Na década de 70 descobriu-se que a exposição das células a pulsos elétricos curtos e intensos induz a uma alteração na membrana celular. A bicamada lipídica da membrana sofre uma reorganização, ocorrendo um aumento seletivo na permeabilidade da membrana das células tumorais, através da formação de poros temporários. Este fenômeno foi denominado de eletropermeabilização/eletroporação (Cemazar et al., 2008; Giardino et al., 2006; Impellizeri et al., 2016). Quando uma célula é exposta a um campo elétrico gera-se uma tensão transmembranar, devido às diferenças entre as propriedades elétricas da membrana celular, do citoplasma e do meio externo. A membrana plasmática, quando é atingida por uma diferença de potencial limite, torna-se permeável ocorrendo a formação de poros temporários. Através deste defeito de permeabilização transitório, como também é designado, ocorre a transferência por difusão simples de pequenas moléculas polares, impulsionadas pela diferença de concentração dentro e fora da célula (Cemazar et al., 2008; Spugnini, Fais, Azzarito, & Baldi, 2016). Este mecanismo que ocorre na superfície da membrana celular das células submetidas ao campo elétrico, leva a um aumento rápido e significativo do fármaco no seu interior e, conseqüentemente, ao aumento da sua citotoxicidade (Cemazar et al., 2008; Plaschke et al., 2016). A figura 1 ilustra o mecanismo de permeabilização da membrana celular antes e após a aplicação do pulso elétrico (Miklavčič et al., 2012).



**Figura 1** - Conceito básico da eletroquimioterapia. (a) - Administração do fármaco quimioterápico; (b) - Formação de poros na membrana celular após a aplicação do pulso elétrico; (c) - Passagem do fármaco pela membrana celular e entrada no citoplasma; (d) - Morte celular. Adaptado de Miklavčič et al., 2012.

O rearranjo da bicamada lipídica, provocado pelos pulsos elétricos que destabilizam a membrana celular, leva à formação de poros ocorrendo a reorientação das caudas hidrofóbicas e posicionamento das cabeças hidrofílicas, de modo a ficarem de frente para os poros recentemente formados (figura 2). Este rearranjo ocorre apenas nas células neoplásicas, porque a membrana destas é menos estável do que a das células normais (Giardino et al., 2006; Spugnini et al., 2016).

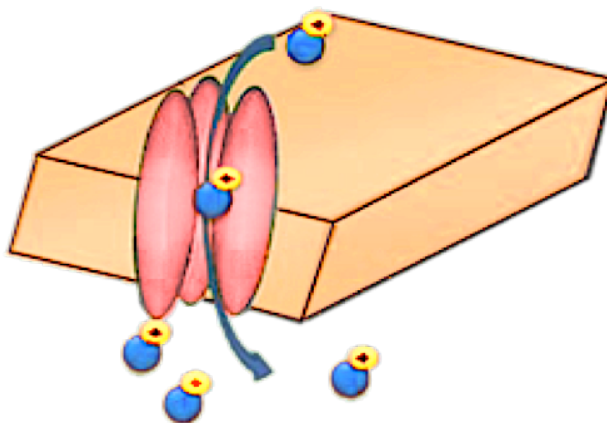


**Figura 2** - Rearranjo da bicamada lipídica da membrana celular após aplicação dos pulsos elétricos. (a) - Estrutura normal da membrana celular; (b) - Rearranjo da membrana celular com a formação de poros após a exposição ao campo elétrico. Adaptado de Giardino et al., 2006.

A tensão transmembranar induzida não é uniforme em toda a superfície da célula e é máxima na superfície celular próxima dos eletrodos. A área da membrana onde a tensão limiar transmembranar é alcançada é o local onde ocorre a formação do poro. O campo elétrico local é o parâmetro crítico para que ocorra a permeabilização, pois define a área da membrana que é permeabilizada e através da qual ocorre o transporte (Cemazar et al., 2008; Escoffre & Rols, 2012; Sersa et al., 2015).

Os estudos que propõem a formação de poros defendem que os mesmos são instáveis e são criados de uma forma rápida, em 10 a 6 segundos, e desaparecem também em alguns segundos a minutos após a exposição ao campo elétrico (Cadossi, Ronchetti, & Cadossi, 2014; Spugnini et al., 2016). A EP pode ser reversível se o tamanho dos poros for suficientemente pequeno para que a célula induza a reparação e rearranjo da sua membrana celular. No entanto, a eletroporação pode ser irreversível, não ocorrendo o encerramento dos poros e levando à morte celular. O tamanho do poro depende da amplitude do campo elétrico aplicado, mas também do tamanho e densidade das células (Giardino et al., 2006; Impellizeri et al., 2016; Spugnini et al., 2016).

Outro mecanismo proposto em alguns estudos, sobre o efeito da aplicação dos pulsos elétricos, envolve o rearranjo e agrupamento das proteínas transmembranares com a formação de pseudo-túneis (figura 3). Isto pode ocorrer em simultâneo com o fenómeno da formação de poros (Spugnini et al., 2016; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, De Luca, et al., 2008).



**Figura 3** - Passagem do fármaco quimioterápico através dos pseudo-túneis formados pela agregação das proteínas transmembranares. Adaptado de Spugnini et al., 2016.

Os resultados publicados por vários estudos são consistentes e reconhecem a eficácia da EQT no controlo tumoral. No entanto, houve a necessidade de reunir e unificar os protocolos de tratamento no que diz respeito ao número de pulsos elétricos, características, modo de aplicação, escolha de fármacos, dosagem e via de administração. Nesse sentido foi lançado um projeto: *European Standard Operating Procedures* (ESOPE), financiado pela Comissão Europeia na área da medicina humana, que permitiu definir procedimentos operacionais padrão fundamentais para a disseminação da tecnologia e integração da EQT na prática clínica diária (Giardino et al., 2006; Mir et al., 2006). Em 2006 foram estabelecidas as bases e o protocolo de uso da EQT na prática clínica, estando desde aí disponíveis os SOP – *Standard Operating Procedures* para a EQT (Cadossi et al., 2014). Em contraste com outras áreas da medicina, a aplicação clínica da EP tem-se desenvolvido paralelamente em humanos e em animais de estimação (Spugnini et al., 2016). À semelhança do estabelecido em medicina humana, também em medicina veterinária se encontram descritos os procedimentos SOP para o tratamento com EQT em cães e gatos (Tozon et al., 2016).

A EQT está indicada principalmente para tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos de qualquer tipo histológico (Maglietti, Tellado, Olaiç, Michinski, & Marshall, 2017; Spugnini, Baldi, et al., 2007). No entanto, têm sido feitos esforços para que seja viável a sua aplicação em outros tipos de tumores com localização interna, nomeadamente em tumores de fígado (Edhemovic et al., 2014), intestino (Soden et al., 2006) e osso (Fini et al., 2013) em humanos, mas também em animais.

## **Os agentes quimioterápicos potenciados pela eletroquimioterapia**

Os fármacos utilizados na EQT são de natureza lipofóbica e hidrofílica, não permeáveis ou com baixa permeabilidade e com alta citotoxicidade (Mir et al., 2006; Spugnini et al., 2016). A sua via de administração pode ser feita de forma sistêmica ou intratumoral (IT) (Sersa et al., 2015) podendo ser aplicada em animais com apenas um nódulo isolado ou em animais com múltiplos nódulos (Mir, 2006).

A EQT foi introduzida pela primeira vez na medicina humana por Mir em 1991, demonstrando uma boa eficácia antitumoral em metástases cutâneas de pacientes com carcinoma localizado na cabeça ou no pescoço, usando a bleomicina (Mir et al., 1997). Após esse estudo inicial, vários estudos clínicos, utilizando não só a bleomicina como também a cisplatina, foram realizados (Mir et al., 2006). A EQT foi utilizada pela primeira vez na medicina veterinária em 1997, num grupo de 12 gatos com recidivas de sarcomas em diferentes localizações anatómicas, após tratamento com radioterapia e ressecção cirúrgica, tendo sido usada a bleomicina (Mir et al., 1997).

### **A bleomicina**

A bleomicina foi o primeiro e mais estudado agente de EP e continua até hoje a ser um agente de primeira escolha para o tratamento com EQT (Spugnini et al., 2016). É um fármaco da classe dos antibióticos antineoplásicos, e cujos efeitos secundários mais frequentes são toxicidade cutânea e pulmonar (Dobson, 2008; Plumb, 2011). Após a sua administração a bleomicina consegue penetrar a membrana celular através dos recetores de proteínas transmembranares, devido à sua natureza lipofóbica e hidrofílica. O complexo formado pela bleomicina e pelo seu transportador proteico é conduzido através do citosol por meio de vesículas endocíticas. O mecanismo que envolve a sua libertação no interior celular ainda é desconhecido. A depleção dos recetores proteicos pelas células tumorais é o primeiro mecanismo de tentativa de evasão pelo tumor. O principal mecanismo da bleomicina para que ocorra a remissão do tumor, consiste na indução da clivagem de ADN, levando à morte celular (Spugnini et al., 2016; Spugnini et al., 2012).

Em condições normais, sem a aplicação dos pulsos elétricos, a entrada da bleomicina para o interior celular é lenta e quantitativamente limitada, porque depende diretamente das proteínas da membrana plasmática. Uma vez administrada via IT ou IV e associada à EP, a bleomicina exhibe uma citotoxicidade potencializada até 700 vezes (Spugnini et al., 2016; Spugnini et al., 2009; Spugnini et al., 2012).

Um estudo que compara a ação da bleomicina de uma forma isolada ou combinada com a EP evidenciou dois mecanismos diferentes de morte celular. Estes mecanismos são

dependentes do número de moléculas de bleomicina que entram para o interior da célula, Assim, na ausência de EP, entram alguns milhares de moléculas na célula, e esta por interferência da bleomicina fica bloqueada na fase G2-M do ciclo celular e aumenta de tamanho, tornando-se polinucleada antes de morrer, imitando assim o comportamento de células irradiadas. Por outro lado, a administração do quimioterápico em combinação com a eletroporação leva a que o número de moléculas que entra na célula se torne muito superior, o que faz com que ocorra morte celular por apoptose (Mir, 1993).

A tabela 1 apresenta as doses recomendadas para o uso da bleomicina em cães e gatos segundo os procedimentos operativos padrão publicados por Tozon em 2016 (Tozon et al., 2016).

**Tabela 1** - Doses de bleomicina que devem ser administradas segundo o tamanho do tumor e a via de aplicação. Adaptado de Tozon et al., 2016.

<b>BLEOMICINA</b>		
Tamanho do tumor	Administração IV	Administração IT
<1cm <sup>3</sup>	300 UI/kg	0.5ml (1.500 UI)/cm <sup>3</sup>
>1cm <sup>3</sup>	300 UI/kg	0.5 - 1ml (1.500 - 3.000 UI)/cm <sup>3</sup>

### **A cisplatina**

A cisplatina é um fármaco que pertence ao grupo dos agentes alquilantes, e é atualmente o segundo fármaco mais utilizado na EQT em medicina veterinária (Spugnini et al., 2016). É ativada pela substituição de um de seus cloretos por uma molécula de água, que permite que o fármaco forme ligações com as bases do ADN. O seu mecanismo de ação envolve a ligação cruzada do ADN o que induz a morte celular. A sua eliminação é feita predominantemente pela urina e pode provocar nefrotoxicidade (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; Impellizeri et al., 2016; Dobson, 2008; Page, 2013). Após a exposição aos pulsos elétricos a entrada da cisplatina para o interior das células tumorais é amplificada em cerca de 4 a 8 vezes, aumentando assim o número de ligações cruzadas e a sua citotoxicidade (Impellizeri et al., 2016; Spugnini et al., 2016; Spugnini et al., 2012).

Os dados clínicos obtidos até à data provaram a eficácia antitumoral da bleomicina e da cisplatina quando administrados via IT, no entanto, a administração IV é recomendada apenas no caso da bleomicina, sendo que a cisplatina não deve ser administrada via sistêmica (Cemazar et al., 2008; LMir, 2006; Tozon et al., 2016).

A tabela 2 apresenta as doses recomendadas para o uso da cisplatina em cães segundo os procedimentos operativos padrão publicados por Tozon em 2016 (Tozon et al., 2016).

**Tabela 2** - Doses de cisplatina que devem ser administradas segundo o tamanho do tumor e a via de aplicação. Adaptado de Tozon et al., 2016.

<b>CISPLATINA</b>		
Tamanho do tumor	Administração IV	Administração IT
<1cm <sup>3</sup>	Não recomendada	1ml (1mg)/cm <sup>3</sup>
>1cm <sup>3</sup>	Não recomendada	0.5 - 1ml (0.5 - 1mg)/cm <sup>3</sup>

### **A doxorubicina e a mitoxantrona**

A doxorubicina e a mitoxantrona são dois fármacos pertencentes à classe das antraciclinas envolvidos recentemente em vários estudos pré-clínicos utilizando a EQT, nos quais demonstraram ser potencializados por esta metodologia de tratamento (Spugnini et al., 2016). Em particular, a mitoxantrona tem sido investigada e utilizada em vários estudos associada à EQT (Spugnini et al., 2012), como p. ex. no tratamento de um cão com carcinoma da glândula apócrina metastático. O tratamento teve bons resultados, tendo o animal atingido a RC na 4º sessão de tratamento, sem efeitos secundários sistêmicos ou locais associados (Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, De Luca, et al., 2008). Ainda assim, são necessários estudos futuros que comprovem a eficácia destes dois fármacos em aplicações clínicas (Spugnini et al., 2016).

### **O pulso elétrico, os elétrodos e o processo de eletroporação**

A aplicação de pulsos elétricos deve ser feita em função do volume total do tumor para garantir que todas as células são efetivamente eletroporadas, e que a dose do fármaco administrada é a indicada. Para o efeito é usada a fórmula  $V = a b^2 \pi/6$ , em que (a) é a medida do maior diâmetro do tumor e (b) é a medida do diâmetro perpendicular a (a). Esta fórmula permite calcular a dose a ser injetada num ou mais nódulos de acordo com o volume de cada um. Se for tratado mais de um nódulo, é necessário considerar a dose total do fármaco a ser administrada para que esta não ultrapasse a dose máxima para o peso do animal (Mir et al., 2006; Tozon et al., 2016).

O processo de EP não tem nenhum efeito sobre o fármaco, apenas facilita a sua entrada na célula. O campo elétrico também atua seletiva e exclusivamente nas células, não alterando o tecido conjuntivo envolvente (Giardino et al., 2006). Assim, se não houver uma resposta adequada ou ocorrer o desenvolvimento de novas lesões, a EQT pode ser repetida sem inconvenientes (Cadossi et al., 2014).

Ocorrem várias fases distintas aquando do processo de EP: a indução, a expansão, a estabilização, a resselagem e o efeito de memória. Estas 5 fases acontecem em microssegundos, milissegundos, milissegundos, segundos e horas, respetivamente (Spugnini, 2001; Spugnini et al., 2016).

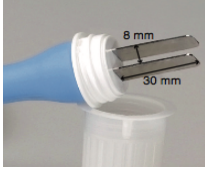
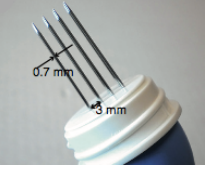

Para que ocorra a EP da membrana celular são necessários geradores de pulso adequados. Os geradores de onda quadrada são o tipo de geradores mais usados, porque proporcionam uma boa reprodutibilidade dos pulsos e um bom controlo da EP por serem mais estáveis, o que diminui a possibilidade de induzirem dano celular (Miklavčič, Mali, Kos, Heller, & Serša, 2014; Spugnini, 2001; Spugnini et al., 2016). É aplicado geralmente um conjunto de oito pulsos curtos com 100 $\mu$ s, bifásicos de 50 + 50 $\mu$ s cada, com intervalos interpulso de 1 $\mu$ s, e 1300V/cm (800V/cm no caso de EQT intraoperatória), com a frequência de 1 Hz (Spugnini et al., 2015; Spugnini, 2001; Spugnini, Baldi, et al., 2006; Spugnini, Citro, et al., 2008).

A eletroporação da membrana celular depende de vários fatores para que ocorra de forma viável e segura. Estes fatores são físicos: como o tamanho e forma da célula; biológicos: como a estrutura do citoesqueleto e composição da membrana celular; elétricos: como a amplitude, duração, número e frequência de repetição dos pulsos (Miklavčič et al., 2012).

A EP pode ser realizada *in vitro* e *in vivo* independentemente do tipo de célula ou tecido (Miklavčič et al., 2012; Sersa et al., 2015), sendo que a EQT é eficaz em todos os tipos de tumores, mas o seu nível de eficácia varia de acordo com o tipo de tumor. Embora os mecanismos subjacentes a esta variação não estejam totalmente determinados, vários mecanismos têm sido propostos, nomeadamente: existência de variabilidade intrínseca na sensibilidade das células tumorais aos fármacos, diferente permeabilidade da membrana dependente do tipo de tumor, a distribuição e disponibilidade do fármaco em diferentes tumores varia de acordo com vascularização dos tumores, e a influência da imunidade do hospedeiro (Miklavčič et al., 2014).

Os pulsos elétricos podem ser aplicados por diferentes tipos de elétrodos com configurações distintas (tabela 3). Foram desenvolvidos três tipos de elétrodos no âmbito do ESOPE (Mir, 2006), de forma a abranger os diferentes nódulos tumorais, cutâneos e subcutâneos que possam ser tratados por EQT (Marty et al., 2006; Mir et al., 2006).

**Tabela 3** - Tipos de elétrodos, configuração e indicações de uso.

Elétrodo	Tipo	Configuração	Indicações	Imagem
Placa	Tipo I	Formados por duas placas que podem ter diferentes espaços entre elas (Impellizeri et al., 2016; Mir et al., 2006)	Nódulos tumorais pequenos e superficiais (Impellizeri et al., 2016; Mir et al., 2006)	 <p>Adaptado de (Miklavčič et al., 2014)</p>
Agulha	Tipo II	Com dois conjuntos paralelos de agulhas - configuração linear (Mir et al., 2006)	Nódulos tumorais de pequeno tamanho, densos e profundos (Mir et al., 2006)	 <p>Adaptado de (Miklavčič et al., 2014)</p>
	Tipo III	Configuração hexagonal (Mir et al., 2006)	Nódulos tumorais densos, profundos e > 1cm de diâmetro (Mir et al., 2006)	 <p>Adaptado de (Miklavčič et al., 2014)</p>

Os elétrodos de placa são colocados nos limites do tumor, para que este fique contido entre as placas, o que faz com que sejam pouco invasivos. Os elétrodos em agulha são introduzidos diretamente no próprio tumor, diminuindo a impedância causada pela pele. Todas as agulhas devem ser inseridas no tumor para que seja obtida uma distribuição adequada e uniforme do campo elétrico (Impellizeri et al., 2016; Miklavčič et al., 2014; Tozon et al., 2016). Se o tamanho do tumor for maior do que a distância entre as várias partes dos elétrodos, a aplicação destes deve começar a partir das margens e progredir em direção ao centro do tumor (Tozon et al., 2016).

### Tamanho dos nódulos

Um estudo em medicina humana sobre o tamanho dos tumores tratados com EQT mostrou que a eficácia da EQT em tumores de diferentes tipos histológicos foi

significativamente menor em tumores com diâmetro maior ou igual a 3cm (Mali et al., 2013). A análise de resultados sobre o tamanho e resposta dos tumores mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no efeito da EQT com o aumento do diâmetro do tumor. Isto ocorreu tanto em estudos em medicina humana (Mali et al., 2013) como em medicina veterinária, nomeadamente num estudo em gatos (Spugnini, Baldi, et al., 2006).

### **Efeitos vasculares e imunológicos da eletroquimioterapia**

A EQT atua a nível vascular de duas formas distintas, através de lesões nas células endoteliais e por vasoconstrição. A exposição do(s) nódulo(s) tumoral(ais) a um campo elétrico facilita a captação do fármaco pelas células do estroma do tumor, no entanto, a EQT também tem efeito sobre as células endoteliais dos vasos tumorais. Isto leva à morte celular endotelial (apoptose) e, conseqüentemente, à revogação do fluxo sanguíneo tumoral. Este efeito é designado de efeito de disrupção vascular da EQT, mas não é observado em vasos sanguíneos maiores, como artérias e veias hepáticas de maior tamanho, permitindo o tratamento de tumores na proximidade dos mesmos (Cadossi et al., 2014; Impellizeri et al., 2016).

O segundo efeito é o efeito vasoconstritor, denominado de bloqueio vascular, que faz com que ocorra um aprisionamento prolongado do fármaco no local alvo, proporcionando uma ação mais prolongada e efetiva do mesmo (Cadossi et al., 2014; Impellizeri et al., 2016; Markelc, Sersa, & Cemazar, 2013). A teoria mais aceita que explica essas alterações vasculares é a vasoconstrição reflexa das arteríolas aferentes, mediada pelo sistema nervoso simpático. Este estado de vasoconstrição pode ser transitório em tecido normal, mas dura de 12 horas até 5 dias em tecido tumoral (Impellizeri et al., 2016). Este efeito vasoconstritor também é vantajoso no caso de tumores especialmente hemorrágicos por diminuir a hemorragia dos mesmos (Cemazar et al., 2008).

Para além da resposta vascular, existe também uma resposta imune do organismo após a EQT. Devido à heterogeneidade das células tumorais em relação à sua orientação e tamanho, e distribuição distinta dos fármacos, nem todas as células tumorais podem ser efetivamente erradicadas pela EQT. Isso deve-se ao fato de que nem todas as células são eletroporadas e/ou nem o quimioterápico abrange igualmente todas as células do tumor (Miklavčič et al., 2014). Após a EQT, as células morrem devido a danos irreparáveis no ADN causados pelo agente quimioterápico, no entanto, como a EQT não induz a degradação de proteínas de membrana, os antígenos específicos do tumor, se presentes, podem ser reconhecidos por células inflamatórias que migram para o tumor, o que provoca esta atividade imunológica da EQT (Cadossi et al., 2014). Desta forma, a competência imunológica do organismo é imprescindível para a completa erradicação dos tumores após a EQT (Miklavčič et al., 2014). Sabe-se que em organismos imunodeprimidos a percentagem de remissões tumorais após

tratamento com a EQT é significativamente menor do que em organismos imunocompetentes (Impellizeri et al., 2016; Miklavčič et al., 2014).

### **As vantagens e desvantagens da eletroquimioterapia**

Como qualquer outro método de tratamento a EQT tem várias vantagens e desvantagens associadas. As vantagens da EQT estão relacionadas sobretudo com a sua prática aplicação, bons resultados com taxas de resposta elevadas em diferentes tipos histológicos de tumores em localizações distintas e efeitos secundários reduzidos.

Vantagens da Eletroquimioterapia:

- Taxa de resposta elevada no controlo tumoral local - em 59,4% é alcançada uma resposta completa (RC) independentemente da origem histológica e em 24,7% é obtida uma resposta parcial (RP), em nódulos submetidos apenas a uma sessão de tratamento (Miklavčič et al., 2012);
- Quando não é alcançada uma RC numa única sessão, o tratamento pode ser repetido (Miklavčič et al., 2012; Tozon et al., 2016);
- Não afeta as células saudáveis próximas do tumor, mas apenas as células tumorais (Giardino et al., 2006; Impellizeri et al., 2016; Miklavčič et al., 2012);
- O tratamento chega às margens do tumor onde poderão existir células tumorais infiltrativas (Miklavčič et al., 2012);
- Associada a um efeito imunológico (Miklavčič et al., 2012);
- Eficaz em áreas previamente tratadas, quer por cirurgia ou por radioterapia (Marty et al., 2006; Miklavčič et al., 2012);
- Perfil de toxicidade favorável, sem efeitos secundários significativos (Miklavčič et al., 2012; Tozon et al., 2016);
- Relação custo-benefício vantajosa, tanto relativamente à tecnologia envolvida como em relação aos fármacos quimioterápicos (Impellizeri et al., 2016; Miklavčič et al., 2012);
- Pode eventualmente ser realizada em regime ambulatorio (Miklavčič et al., 2012; Tozon et al., 2016);
- Tratamento com curta duração (Miklavčič et al., 2012; Tozon et al., 2016);
- Pode ser usada no tratamento de nódulos hemorrágicos (Cemazar et al., 2008; Giardino et al., 2006);
- Permite tratar nódulos tumorais em localizações anatómicas onde a excisão cirúrgica não é possível e na proximidade de estruturas como vasos e nervos (Cadossi et al., 2014; Miklavčič et al., 2012);

- Pode ser utilizada em pacientes geriátricos com segurança e sem os inconvenientes de outras técnicas (Murphy et al., 2008).

A EQT como uma técnica utilizada sobretudo para o controlo tumoral local a nível cutâneo e subcutâneo, tem algumas limitações adjacentes. Estas estão associadas sobretudo com o controlo tumoral à distância e com a falta de estudos mais específicos e aplicados à prática clínica que respondam a algumas questões ainda pouco esclarecidas.

Desvantagens da Eletroquimioterapia:

- É um tratamento com uma taxa de resposta até 80% no controlo local do tumor, mas sem efeito perceptível em metástase à distância (Tozon et al., 2016);
- Obrigatoriedade de uso de elétrodos com configurações distintas dependendo da localização e forma do tumor, o que pode limitar o uso da técnica em alguns tumores por falta de elétrodos compatíveis (Impellizeri, 2015; Tozon et al., 2016);
- Na medicina veterinária ao contrário da medicina humana, a EQT requer sedação e/ou anestesia geral o que torna a técnica mais demorada e pode invalidar a sua aplicação em regime ambulatorio (Impellizeri et al., 2016);
- Nem todos os agentes quimioterápicos são eficazes quando associados à EQT, sendo que apenas os agentes lipofóbicos mostraram ser compatíveis com a EQT (Spugnini et al., 2016).

Estão descritos alguns efeitos secundários resultantes do tratamento com EQT, que são considerados também desvantagens da técnica. Estes efeitos secundários podem ser imediatos ou tardios. Entre os efeitos imediatos menos graves encontra-se descrita uma inflamação local (Spugnini et al., 2011), sensação de desconforto ou dor associada à contração dos músculos na proximidade dos elétrodos, que desaparece imediatamente após a descarga de cada pulso elétrico (Miklavčič et al., 2014) e queimaduras induzidas pelos elétrodos (Spugnini et al., 2011; Spugnini, Baldi, et al., 2006). Além disso, também podem ocorrer efeitos tardios, como eritema, edema, alopecia, descoloração local da área tratada (semelhante ao vitiligo), necrose local (Miklavčič et al., 2014) e deiscência de sutura quando a EQT é feita como tratamento adjuvante á cirurgia (Spugnini et al., 2011; Spugnini, Baldi, et al., 2006). Todos esses efeitos são locais, transitórios, mínimos e bem tolerados pelos doentes (Miklavčič et al., 2014). Os efeitos secundários mais graves descritos são a ocorrência de nefrotoxicidade, tromboembolismo pulmonar, causado pela libertação de fatores pró-trombóticos, e a síndrome de lise tumoral causada pela destruição rápida e significativa do tumor após EQT. Também pode ocorrer edema pulmonar, sendo mais frequente em gatos tratados com cisplatina (Spugnini et al., 2016).

No sentido de atingir uma boa eficácia antitumoral associada a efeitos secundários mínimos é importante a administração de doses terapêuticas baixas dos quimioterápicos (Tozon et al., 2016).

### **Metástases não cutâneas/subcutâneas**

O uso de EQT como forma de tratamento de metástases de tumores de osso (Fini et al., 2013) e fígado (Cannon, Ellis, Hayes, Narayanan, & Martin, 2013; Edhemovic et al., 2014) assim como de outros órgãos internos, tem sido muito investigada ao longo dos últimos anos (Campana et al., 2016; Miklavčič et al., 2012). Nestes casos, os procedimentos para realização de EQT são mais complexos pois é necessário um correto posicionamento espacial dos elétrodos, geralmente com longas agulhas individuais. Muitas vezes também é necessário um suporte de imagens radiográficas, ecográficas ou de tomografia computadorizada. O posicionamento incorreto dos elétrodos pode levar a que ocorra uma EP insuficiente do tecido alvo, levando a que haja áreas com células não eletroporadas, o que aumenta o risco de respostas parciais. Assim, são necessários *softwares* que indiquem o posicionamento dos elétrodos e a EP requerida para os diferentes casos, pois uma monitorização real da EP e da distribuição de campo elétrico permitirá um melhor controlo do posicionamento dos elétrodos e um tratamento mais bem-sucedido em órgãos internos (Cadossi et al., 2014; D. Miklavčič et al., 2012).

Outra dificuldade é a monitorização do efeito provocado pela EQT em nódulos internos. Enquanto em nódulos cutâneos ou subcutâneos a inspeção visual é suficiente para perceber a resposta ao tratamento, em nódulos internos torna-se obrigatório o uso da imagiologia, como a ecografia, a ressonância magnética e a tomografia computadorizada para permitir uma avaliação da resposta tumoral (Cadossi et al., 2014; Miklavčič et al., 2012).

O tratamento de metástases localizadas no abdómen e, mais especificamente, no fígado requer ainda a sincronização da aplicação do pulso elétrico ao período refratário absoluto do coração, para evitar interferência com a atividade elétrica do mesmo (Mali et al., 2008; Miklavčič et al., 2012).

Os resultados de dois ensaios clínicos em metástases ósseas em ratos (Fini et al., 2013) e metástases hepáticas em humanos (Edhemovic et al., 2014) concluíram que o tratamento das mesmas localizadas em órgãos internos é viável e seguro. A EQT levou à remissão de nódulos tumorais com diminuição da dor e melhoria na qualidade de vida (Edhemovic et al., 2014; Fini et al., 2013). Para o efeito foram desenvolvidos instrumentos específicos para guiar a inserção e o posicionamento das agulhas e garantir a cobertura completa e homogénea do volume do tumor pelo campo elétrico aplicado (Cadossi et al., 2014; Campana et al., 2016; Edhemovic et al., 2014; Fini et al., 2013).

## **Seleção de pacientes a serem tratados com eletroquimioterapia**

A EQT não é apenas utilizada em animais de companhia, sendo que, existem múltiplos estudos em cães (Nataša, Veronika, Polona, Sersa, & Maja, 2010; Spugnini et al., 2013; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, D'Avino, et al., 2008), em gatos (Murphy et al., 2008), mas também em outros animais como equídeos (Souza, Villarino, Farnsworth, & Black, 2017; Tamzali et al., 2012; Th, 2014), animais exóticos (Racnik et al., 2018) e quelônios (Brunner, Dutra, Silva, Silveira, & Monteiro Martins, 2014).

Antes de selecionar um paciente para ser tratado com EQT, o médico veterinário deve ter em conta alguns critérios que lhe permitirão determinar se o paciente beneficiará ou não deste tratamento ou de outros de forma adjuvante. No sentido de determinar a aplicabilidade desta opção terapêutica é importante saber a história do animal, doenças concomitantes, risco anestésico, fazer o estadiamento do tumor, determinar a área corporal que ocupa, tamanho e volume do mesmo (para cada nódulo caso seja mais do que um). Usualmente é aconselhado fazer alguns exames complementares como eletrocardiograma, análises hematológicas e bioquímicas (Mir et al., 2006; Tozon et al., 2016).

O tratamento não está indicado em animais que já tenham tido reação alérgica à bleomicina ou à cisplatina. A bleomicina também está contraindicada em pacientes em que a dose cumulativa máxima de 400.000 UI de bleomicina/m<sup>2</sup> tenha sido previamente excedida em tratamentos anteriores, por risco de fibrose pulmonar (Mir et al., 2006; Tozon et al., 2016).

## **Procedimentos gerais que envolvem o tratamento com eletroquimioterapia**

A técnica de EQT consiste na administração do fármaco quimioterápico, na colocação dos elétrodos em pontos específicos no tumor e na administração de pulsos elétricos curtos (Plaschke et al., 2016). Assim, e de forma a minimizar o desconforto subjacente à aplicação de pulsos elétricos e a possível movimentação do animal, que pode interferir com o procedimento, está indicado o uso de sedação profunda e/ou anestesia geral (Cadossi et al., 2014; Mir et al., 2006; Tozon et al., 2016). Podem ser usados vários fármacos para este efeito, sendo alguns dos recomendados:

- Sedação profunda - medetomidina (0.08mg/kg) ou medetomidina (0.025mg/kg) e butorfanol (0.1 mg/kg) (Tozon et al., 2016);
- Anestesia geral - pré-medicação com acepromazina (0.02 mg/kg) e metadona (2 mg/kg) e posterior administração de propofol (1mg/kg) ou tiopental (5mg/kg); Manutenção da anestesia com isoflurano; Está indicado durante o procedimento a administração de fluidoterapia e analgesia (Tozon et al., 2016). A anestesia geral deve

ser administrada no tratamento de vários nódulos ou em lesões de maior tamanho (Cadossi et al., 2014; Mir et al., 2006; Spugnini et al., 2015);

Antes da administração do agente quimioterápico é recomendada a administração de hialuronidase via IT. Esta funciona como um antídoto para o extravasamento do agente quimioterápico, quando este é administrado localmente, e facilita a sua entrada e distribuição uniforme no tecido (Spugnini, 2001; Spugnini, Baldi, et al., 2006). Em relação à administração do agente quimioterápico, que acontece antes da aplicação dos pulsos elétricos, esta pode ser feita via IV ou via IT (Cemazar et al., 2008; Spugnini et al., 2016; Tozon et al., 2016). Na administração via IT, o fármaco deve ser administrado lentamente e após a administração deste, os pulsos elétricos podem ser aplicados imediatamente (Tozon et al., 2016). Em caso de escolha pela administração IV, o agente deve ser administrado em *bolus* com a duração estimada de 30 seg e deve aguardar-se 8 a 10 min até a aplicação dos pulsos elétricos. Assim, 28 a 30 minutos após a administração do agente quimioterápico o procedimento deve estar concluído (Cadossi et al., 2014; Mir et al., 2006; Tozon et al., 2016).

Muitas vezes a decisão entre a administração IT ou IV do fármaco baseia-se na toxicidade sistêmica do mesmo e no grau de infiltração do tumor nas camadas mais profundas do tecido (Spugnini, 2001). A administração sistêmica pode ser vantajosa ao alcançar gânglios linfáticos e outros tecidos/órgãos onde tenha ocorrido metastização (Spugnini et al., 2016).

Antes da administração dos pulsos elétricos deve ainda ser feita a tricotomia da área e aplicação de um gel à base de água que tem o efeito eletrocondutor (Spugnini, 2001; Spugnini, Vincenzi, Baldi, Citro, & Baldi, 2006; Tozon et al., 2016).

É aconselhada a permanência do animal na clínica/hospital sob supervisão durante 2 a 4 horas até que recupere a consciência e os parâmetros clínicos básicos normais (Tozon et al., 2016). Adicionalmente pode ser efetuada a administração de um analgésico, anti-inflamatório não esteróide oral como o meloxicam 0.1mg/kg/dia durante três dias consecutivos e o tratamento sintomático de possíveis efeitos secundários ao tratamento (Tozon et al., 2014).

### **Acompanhamento do paciente**

Após o tratamento com EQT o animal deve ser acompanhado pelo médico veterinário em consultas de avaliação regulares. É recomendada uma consulta 8 dias após o tratamento, seguida de uma consulta de avaliação de 4 em 4 semanas. Em cada consulta o nódulo tumoral ou os nódulos no caso de ser mais que um, devem ser fotografados e medido o seu tamanho com um paquímetro. Este procedimento permite uma comparação da evolução do tumor de uma consulta para outra. Devem ser também identificados os possíveis efeitos secundários tardios, locais ou sistêmicos (Tozon et al., 2016). A resposta ao tratamento deve ainda ser classificada com base em critérios globais como os critérios de avaliação de resposta em

tumores sólidos (Eisenhauer et al., 2009; Tozon et al., 2016). Estes *guidelines* classificam a resposta do tumor após tratamento como: RC quando ocorre o desaparecimento de todas as lesões e uma redução do tamanho de possíveis gânglios linfáticos afetados para um tamanho < 10mm. RP quando há uma redução de pelo menos 30% do diâmetro do tumor. Doença progressiva (DP) quando ocorre um aumento de pelo menos 20% no diâmetro do tumor ou o aparecimento de uma ou mais lesões. Doença estável (DE) quando o nódulo não aumenta nem diminui de tamanho o suficiente para ser classificado como RP ou DP. É necessária uma duração mínima de 4 semanas para qualificar cada tipo de resposta (Eisenhauer et al., 2009).

O tratamento com EQT pode ser repetido com o intervalo de uma a duas semanas até ser atingida a RC (Spugnini, 2001).

### **Eletroquimioterapia no tratamento oncológico em gatos**

Os gatos são animais com capacidade de mascarar alguns sinais clínicos iniciais de doença, o que contribui para que estes sejam perceptíveis apenas quando já exuberantes (Fowler, 2012). Por este motivo muitas vezes o diagnóstico tumoral em gatos acontece numa fase avançada da doença. Por outro lado, um estudo retrospectivo realizado no Reino Unido em 2017 com uma base de dados de cerca de nove mil amostras de nódulos, revelou que a pele e o tecido subcutâneo são os locais anatómicos mais comuns de tumores em gatos. Sendo o órgão maior e mais exposto do corpo, a pele é particularmente suscetível a agressões externas, mas é também mais facilmente visível e palpável o que facilita a identificação da doença. Esse mesmo estudo concluiu que os quatro tipos mais comuns de tumores de pele em gatos são o fibrossarcoma, o carcinoma das células escamosas (CCE), o mastocitoma e os tumores das células basais (Ho, Smith, & Dobromylskyj, 2017).

A EQT tem potencialidades para se tornar uma das terapias de eleição no tratamento deste tipo de tumores tão frequentes em gatos. Tem sido considerada nas primeiras opções de tratamento nesta espécie em vários tipos histológicos de tumores, mas sobretudo em carcinomas (Murphy et al., 2008; Spugnini et al., 2015) e sarcomas (Spugnini et al., 2011; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, Caruso, et al., 2008) com localizações cutâneas ou subcutâneas (Spugnini, 2001).

O CCE é responsável por 15% dos tumores cutâneos e por pelo menos 70% dos tumores malignos orais em gatos (Murphy, 2001). Geralmente é considerado secundário à exposição à luz ultravioleta (UV), comumente localizado em áreas de maior exposição solar como nariz, pálpebras e orelhas de animais com pele não pigmentada ou levemente pigmentada, locais estes de difícil excisão cirúrgica com margens adequadas (Murphy & Murphy, 2013; Withrow, 2013). Normalmente, o CCE tem um longo período entre a indução tumoral (após a dermatite solar) e a progressão do tumor, no entanto, o controlo local desta neoplasia representa um

desafio na medicina veterinária como consequência da fase muitas vezes avançada da doença no momento do diagnóstico (Murphy, 2001). O CCE raramente metastatiza, mas tendencialmente progride para úlceras levando a lesões dolorosas e de difícil cicatrização. Ainda assim os gatos com CCE avançado podem viver por períodos prolongados de tempo. Nestes casos, muitas vezes os tratamentos antineoplásicos visam o alívio dos sintomas para manter ou aumentar a qualidade de vida do animal e o controlo do tumor com resultados estéticos razoáveis. Por esta razão, e devidos às suas características, a EQT representa uma ótima ferramenta para o tratamento deste tipo de neoplasia (Murphy et al., 2008; Murphy & Murphy, 2013; Spugnini, Vincenzi, Citro, Tonini, et al., 2007).

Em 2015 foi realizado um estudo prospetivo com 21 gatos com carcinoma periocular (dezassete com carcinomas espinocelulares e quatro com carcinomas anaplásicos) e 26 gatos com CCE na cabeça. Doze dos gatos com carcinoma periocular foram tratados com EQT utilizando a bleomicina e nove foram tratados apenas com bleomicina. Do coorte de gatos diagnosticados com CCE, catorze foram tratados com EQT utilizando a bleomicina e doze foram tratados apenas com bleomicina. Verificaram-se alguns efeitos secundários locais em alguns dos animais tratados com EQT tais como: epífora, pequenas queimaduras induzidas pelos elétrodos (desapareceram em duas a três semanas), prurido e contrações musculares transitórias no momento da aplicação dos pulsos elétricos. Não foram descritos efeitos secundários no coorte de animais tratados apenas com bleomicina. A taxa de resposta dos animais tratados com EQT foi de 89%, enquanto em animais tratados apenas com a bleomicina foi de 33%. O (tempo livre de doença) TLD no grupo de animais com carcinoma periocular tratados com EQT foi de 24,2 meses e no caso dos animais com CCE foi de 20,6 meses. No caso dos animais com carcinoma periocular tratados apenas com bleomicina o TLD foi de 4,7 meses e no caso dos animais com CCE foi de 3,2 meses (tabela 4) (Spugnini et al., 2015).

Encontram-se ainda publicados mais dois artigos com recurso a EQT no tratamento de carcinomas em gatos. Num dos estudos, que incluía nove gatos, foi obtida resposta ao tratamento em todos os nódulos, mas apenas sete dos gatos atingiram a RC com duração de um a três anos (tabela 4) (Spugnini, Vincenzi, Citro, Tonini, et al., 2007). No outro estudo estiveram envolvidos onze gatos com dezasseis nódulos com o diagnóstico de carcinoma espinocelular. A RC foi atingida em 87.5% dos nódulos com duração de 3 meses a mais de 3 anos, e apenas dois dos gatos que atingiram a RC tiveram recorrência 2 a 8 meses após o procedimento (tabela 4) (Tozon et al., 2014). Em ambos os estudos foi utilizada a EQT com bleomicina como agente quimioterápico e os efeitos adversos foram mínimos e transitórios, como eritema local e contrações musculares (Spugnini, Vincenzi, Citro, Tonini, et al., 2007; Tozon et al., 2014).

A EQT pode ser aplicada como uma forma de tratamento paliativo no tratamento de lesões neoplásicas já avançadas, nas quais o tratamento cirúrgico não é possível (p. ex. devido à localização e/ou tamanho do tumor). O objetivo da EQT nestes casos é não só o controlo tumoral local, mas sobretudo melhorar/manter a qualidade de vida do animal (Cadossi et al.,

2014; Spugnini, 2001; Spugnini, Baldi, et al., 2007; Spugnini, Vincenzi, Citro, Santini, et al., 2007). É o caso de um gato com 18 anos de idade diagnosticado com um adenocarcinoma palpebral que foi tratado com EQT usando a cisplatina IT. Foi atingida a remissão completa após 3 sessões de tratamento e os efeitos secundários foram mínimos e bem tolerados pelo animal (tabela 4) (Lanore, 2014).

Os primeiros estudos em gatos utilizando a EQT em sarcomas, apesar de terem tido 80% de resposta global, apontam a necessidade do uso de elétrodos mais específicos para tumores sólidos de origem mesenquimatosa, sendo o tecido conjuntivo, o obstáculo para que ocorra uma permeabilização suave do tumor. Sugerem também que o uso da EQT em caso de recorrência tumoral após recessão cirúrgica, não é tão eficaz como quando esta é a primeira escolha de tratamento (Spugnini, 2001; Spugnini, Baldi, et al., 2006; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, Caruso, et al., 2008; Spugnini et al., 2009). Em relação ao tamanho do tumor, gatos tratados com EQT com sarcomas de tamanho menor a 10cm<sup>2</sup> tiveram um TLD de 46 meses, enquanto que animais com tumores de tamanho superior tiveram um TLD de 10 meses. Estes resultados demonstram que a resposta dos tumores à EQT diminui com o aumento do diâmetro do tumor (tabela 4) ( Spugnini, Baldi, et al., 2006). Num outro estudo foram incluídos 64 gatos com sarcomas incompletamente excisados cirurgicamente tratados com EQT adjuvante usando a cisplatina IT. O tratamento resultou num aumento do controlo tumoral local, com um TLD de 666 dias *versus* 180 para um coorte de 14 gatos tratados apenas com recessão cirúrgica. Dos 64 gatos envolvidos no estudo oito morreram de patologias não relacionadas com o tratamento e os efeitos secundários responderam ao tratamento sintomático e estão descritos na tabela 4 (Spugnini et al., 2011).

A bleomicina é o fármaco convencionalmente administrado no tratamento com EQT em gatos. Existem alguns estudos onde é usada a cisplatina administrada via IT, já que a mesma está contraindicada nesta espécie quando administrada de forma sistémica, pelos efeitos de toxicidade pulmonar fatal aguda que pode provocar, nomeadamente dispneia, edema pulmonar, hidrotórax e mesmo morte do animal (Burton, 2012; Spugnini, 2001; Spugnini et al., 2011; Tozon et al., 2016).

A EQT pode não ser adequada para o tratamento de animais que receberam radioterapia prévia no local do tratamento. Uma complicação do tratamento com radioterapia com posterior administração local de agente(s) quimioterápico(s) é uma lesão semelhante a queimadura solar grave. Esta situação está descrita num artigo em que um gato com fibrossarcoma foi tratado inicialmente com radioterapia, e após recidiva foi feita recessão cirúrgica e posterior EQT com cisplatina. Três dias após o tratamento apresentava um eritema local marcado, com prurido. O animal fez tratamento sintomático, mas a lesão evoluiu, tendo resultado em complicações graves tais como descamação e úlcera húmida submetida a desbridamento (tabela 4) (Spugnini, 2001; Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, Caruso, et al., 2008).

Os tratamento de primeira escolha para linfoma localizado inclui normalmente a quimioterapia sistêmica e/ou radioterapia. No entanto, quatro gatos (dois com linfoma nasal, um com linfoma cervical e um com linfoma retro-ocular) foram envolvidos num estudo de tratamento com EQT cujo agente quimioterápico usado foi a bleomicina via IT. Todos os gatos obtiveram RC com TLD de 180 a 730 dias. Os animais acabaram por morrer de recorrência local ou disseminação sistêmica. Este estudo, apesar do número reduzido de animais que inclui, revelou resultados favoráveis com TLD elevados e sem efeitos adversos consideráveis (tabela 4) (Spugnini et al., 2007).

Em 2017 foi publicado um *case report* de um gato diagnosticado com um timoma e tratado com quimioterapia sistêmica sem melhoria significativa. Foram então realizadas duas sessões de EQT ecoguiada (utilizando elétrodos de agulha) com um intervalo de duas semanas. O tratamento foi bem tolerado e resultou numa RP. Foram efetuadas sessões adicionais e o gato continuou em remissão após 14 meses. Apesar de ser apenas um caso, é um resultado interessante em termos de possível tratamento adjuvante em animais com tumores viscerais (tabela 4) (Spugnini, Menicagli, Pettorali, & Baldi, 2017).

Os protocolos de EQT não são rígidos, e como tal, variam muitas vezes consoante o oncologista e o caso clínico. A maioria dos procedimentos gerais envolvidos no tratamento de EQT em animais de companhia, podem ser aplicados em gatos. Seguem-se algumas particularidades que se verificam nos procedimentos para o tratamento com EQT em gatos, referidos em vários artigos publicados. É usual a pré-medicação com butorfanol, medetomidina e/ou cetamina (Spugnini, 2001; Tozon et al., 2014), e a aplicação dos pulsos de permeabilização pode ser feita 5 minutos após o agente quimioterápico ser administrado, o que difere da maioria dos estudos que descrevem geralmente a aplicação dos pulsos elétricos 8 a 10 minutos após a administração do agente quimioterápico via IV (Spugnini, 2001; Spugnini, Baldi, et al., 2006; Spugnini, Citro, et al., 2008).

Atualmente já existem vários estudos publicados na medicina veterinária usando a EQT como monoterapia ou associada a outro tipo de tratamentos em diferentes espécies (Maglietti et al., 2017; Spugnini, Baldi, et al., 2006). Com o objetivo de resumir e sistematizar a informação existente em artigos sobre o uso da EQT no tratamento oncológico em gatos, foram elaboradas duas tabelas (tabela 4 e tabela 5) em que a tabela 4 aborda os tumores mais comuns, enquanto a tabela 5 remete para os tumores menos frequentes em gatos.

**Tabela 4** - Sistematização de alguns estudos sobre o uso de EQT no tratamento de tumores comuns em gatos. Identificação do tipo de tumor, resultados e efeitos secundários.

Referência	Tipo de tumor	Resultados relevantes	Efeitos secundários
(Spugnini, Baldi, et al., 2006)	Sarcoma dos tecidos moles	TLD de 4 meses (cirurgia), 19 meses (EQT pós-operatória) e 12 meses (EQT intraoperatória)	Contrações musculares transitórias; inflamação local; necrose focal; deiscência de sutura; descoloração da área local; alopecia local
(Spugnini, Vincenzi, Citro, Tonini, et al., 2007)	Carcinoma das células escamosas	Obtida resposta em 100% dos gatos; Em 77,7% foi obtida RC com duração até 3 anos. Em 55.6% foi obtida uma remissão >1 ano	Eritema do nariz
(Spugnini et al., 2007)	Linfoma	Três gatos obtiveram TLD por 635, 180 e 730 dias. Um teve recidiva no mesmo local que não respondeu a novo tratamento com EQT e os outros desenvolveram linfoma em locais diferentes	Desconforto transitório, alopecia e eritema local
(Spugnini, Dotsinsky, Mudrov, Citro, Caruso, et al., 2008)	Fibrossarcoma	Tratamento anterior com radioterapia e recessão cirúrgica. Tratamento com EQT: TLD: 5 meses	Eritema, descamação e úlcera húmida
(Spugnini et al., 2011)	Fibrossarcoma	TLD: 666 dias com EQT e recessão cirúrgica <i>versus</i> 180 dias apenas com recessão cirúrgica	Anorexia; contrações musculares transitórias; queimaduras induzidas pelos elétrodos; descoloração cutânea local; inflamação local e deiscência de sutura
(Lanore, 2014)	Adenocarcinoma	RC após 3 sessões de EQT	Sem efeitos adversos significativos
(Tozon et al., 2014)	Carcinoma espinocelular	A RC foi alcançada em 87,5% de 17 nódulos, com TLD de 2 meses a mais de 3 anos	Sem efeitos secundários locais ou sistêmicos aparentes
(Spugnini et al., 2015)	Carcinoma das células escamosas e carcinoma anaplásico	Tratamento com EQT resposta em 89% dos casos e o TLD foi de 30,5 meses, enquanto para o grupo tratado apenas com bleomicina foi de 3,9 meses	Mínimos e responderam ao tratamento sintomático
(Spugnini et al., 2017)	Timoma	Tratamento resultou em RP. Efetuadas sessões adicionais, continua em remissão	Sem efeitos adversos consideráveis

Além dos estudos referidos na tabela 4, encontram-se também publicados 3 estudos de tratamento com recurso à EQT em gatos com tumores menos comuns, tais como hemangiopericitoma, ganglioneuroblastoma e rabdomyosarcoma (tabela 5) (Spugnini, 2001).

**Tabela 5** - Compilação de estudos em gatos tratados com eletroquimioterapia. Apresentação dos tumores menos frequentes, tipo de tumor apresentado, resultados e efeitos secundários.

Referência	Tipo de tumor	Resultados relevantes	Efeitos secundários
(Baldi & Spugnini, 2006)	Hemangiopericitoma torácico	TLD 2 anos	Sem efeitos adversos descritos
(Enrico P. Spugnini, Citro, et al., 2008)	Ganglioneuroblastoma	Remissão tumoral após a 3ª aplicação da EQT, TLD: 402 dias. Nova sessão de EQT, novo TLD: 450 dias	Sem efeitos adversos descritos
(E. P. Spugnini et al., 2010)	Rabdomyosarcoma pleomórfico	TLD de 12 meses após recessão cirúrgica e EQT	Sem efeitos adversos descritos

Encontra-se descrito o tratamento com recurso à EQT em três casos de tumores pouco comuns em gatos, nomeadamente hemangiopericitoma torácico, ganglioneuroblastoma e rabdomyosarcoma pleomórfico. Apesar da limitação de apenas retratarem um animal, os resultados obtidos foram satisfatórios e promissores com TLD longos e sem efeitos adversos (Baldi & Spugnini, 2006; Spugnini et al., 2010; Spugnini, Citro, et al., 2008).

### Perspetivas futuras

De entre as perspetivas e desenvolvimentos futuros na área da EQT encontra-se a abordagem terapêutica de tumores em órgãos internos, que atualmente se encontra em crescente investigação. Na medicina veterinária o tratamento de tumores com localização interna através da EQT já foi feito cirurgicamente e recorrendo a elétrodos de agulhas longas (Miklavčič et al., 2012; Spugnini, Baldi, et al., 2006) ou de forma eco-guiada (Spugnini et al., 2017). Têm sido estudadas novas formas de realização da EQT em tumores internos tais como a endoscopia, colonoscopia ou laparoscopia (Impellizeri, 2015; Miklavčič et al., 2012). No entanto para que este tipo de abordagem seja possível são necessários mais estudos clínicos, adaptação dos elétrodos existentes e/ou criação de novos tipos de elétrodos e utilização de sistemas de navegação com orientação por imagem (Miklavčič et al., 2012).

A eletrotransferência de genes é também uma vertente do uso da EP que tem mostrado resultados promissores em vários estudos no controlo tumoral de neoplasias refratárias aos tratamentos convencionais (Escoffre & Rols, 2012). Esta técnica consiste na aplicação de pulsos elétricos combinada com a administração de plasmídeos que codificam moléculas antineoplásicas. A eletrotransferência de genes tem um efeito imunomodelador o que contribui para a estimulação da imunidade do recetor (Gothelf & Gehl, 2012; Sersa et al., 2015). Um estudo em 13 cães demonstrou a eficácia e segurança da eletrotransferência genética combinada com a EQT. Foram usados como agentes quimioterápicos na EQT a gentamicina ou a bleomicina, e para a eletrotransferência o ADN plasmídico de IL-12 canino. Esta abordagem foi eficaz em diferentes tipos histológicos de tumores, não só no tumor diretamente tratado como também nas metástases. Não ocorreram efeitos adversos graves e esta modalidade de tratamento provou ser uma abordagem efetiva (Finocchiaro & Glikin, 2017).

O desenvolvimento de vacinas de ADN, ou seja, a combinação terapêutica da EQT e da eletrotransferência de genes imunoestimulantes é outra forma de tratamento inovador que pode levar ao controlo ou erradicação tumoral associada à indução de uma resposta imune significativa (Escoffre & Rols, 2012). Neste caso, a EP atua como uma ferramenta eficaz para transferir plasmídeos que codificam antigénios contra epítomos específicos e assim, aumenta a resposta imunológica contra um antigénio tumoral (Gothelf & Gehl, 2012).

Por último, a eletroporação irreversível é uma técnica relativamente recente que usa apenas pulsos elétricos para o tratamento tumoral. A lesão celular causada é irreversível o que leva a uma apoptose em massa, que normalmente evolui para tecido cicatricial fibrótico (Obermann, Larose, Rossetto, & Margerin, 2013; Ruarus et al., 2018). Como o efeito da eletroporação irreversível está confinado à membrana celular, as estruturas da matriz extracelular circundante não são afetadas. De facto, os constituintes celulares das estruturas circundantes, como as células endoteliais vasculares, são também irreversivelmente danificados, de forma semelhante ao tecido-alvo. No entanto, a preservação da matriz extracelular, que constitui a integridade estrutural e funcional dessas estruturas vasculares, permite uma rápida regeneração das mesmas (Ruarus et al., 2018). Esta técnica tem sido recentemente utilizada na medicina humana, podendo vir a ser uma possível abordagem de tratamento em medicina veterinária, no entanto, e até ao momento, existem ainda poucos estudos realizados (Obermann et al., 2013).

O potencial para combinar a EQT com terapias convencionais ou com outras terapias inovadoras, assim como o seu desenvolvimento no tratamento de tumores internos, oferece muitas possibilidades interessantes para a futura expansão e desenvolvimento do uso clínico da EQT (Escoffre & Rols, 2012).

## Conclusão

A EQT é um procedimento simples, rápido, com poucos efeitos adversos e eficiente no controlo local de tumores, com aproximadamente 80% de respostas objetivas em tumores cutâneos e subcutâneos em animais de companhia (Tozon et al., 2016). Em comparação com a quimioterapia isolada, a aplicação de pulsos elétricos combinados com quimioterapia, melhora significativamente os resultados do tratamento de tumores. O uso de EQT como terapia adjuvante após a cirurgia tem sido frequentemente capaz de prevenir a recorrência de tumores em animais de companhia. A rápida destruição de células tumorais através da via apoptótica e a estimulação do sistema imunológico aumenta as possibilidades de erradicação tumoral (Spugnini et al., 2016).

O facto de ter efeitos secundários reduzidos, faz com que a EQT seja muitas vezes escolhida como tratamento paliativo para proporcionar uma melhoria significativa na qualidade de vida do animal, podendo ainda fazer a diferença entre a opção pela eutanásia ou pelo tratamento (Impellizeri et al., 2016; Spugnini, 2001).

Nem todos os agentes quimioterápicos aumentam a sua concentração intracelular quando submetidos a pulsos elétricos. Os fármacos que mais beneficiam desta associação são de natureza lipofóbica como a bleomicina e a cisplatina (Spugnini et al., 2016).

Devido à alta eficácia da EQT no tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos, independentemente da origem histológica, há tentativas de alargar a sua aplicabilidade ao tratamento de tumores a nível mais profundo ou mesmo interno. Para que isto ocorra são necessários novos desenvolvimentos tecnológicos que permitam o tratamento desses tumores na prática clínica diária (Impellizeri, 2015; Miklavčič et al., 2012).

Desde que a EQT se expandiu por toda a Europa, têm sido feitos vários estudos e adquiridas novas aplicações clínicas para a EQT. Desta forma a EQT tem sido aplicada em diferentes situações clínicas, o que não foi previsto no SOP originalmente publicado. Assim, novos SOP para tumores cutâneos, subcutâneos e eventualmente tumores internos são necessários, mais especificamente na área da medicina veterinária, para garantir a eficácia do tratamento e a segurança dos pacientes (Miklavčič et al., 2014).

A investigação clínica contínua e o desenvolvimento tecnológico, baseado na EP, aumenta e continuará a aumentar a relevância clínica da EQT, já que esta técnica fornece também a base para várias aplicações, novas perspetivas e opções de tratamento. A EQT é uma técnica sobretudo local e por esse motivo beneficia quando associada a um tratamento sistémico que potencialize a sua própria resposta imune. A eletrotransferência de genes é uma das últimas aplicações que está a ser estudada e envolvida em várias investigações (Cadossi et al., 2014) na tentativa de aumentar a efetividade antitumoral sistémica da EQT. Esta, aplicada de uma

forma adjuvante à EQT, leva a um aumento do efeito loco-regional, bem como a um efeito a nível sistémico em metástases (Sersa et al., 2015).

A EQT tem um futuro promissor na medicina veterinária visto que tem demonstrado ser eficaz em vários estudos, pode ser utilizada para o tratamento de tumores cutâneos únicos ou múltiplos, subcutâneos, primários ou recorrentes, de diferentes tipos histológicos, como tratamento adjuvante à cirurgia ou como tratamento paliativo, no sentido de preservar a qualidade de vida dos pacientes oncológicos veterinários (Cemazar et al., 2008).

## Referências Bibliográficas

- Baldi, A., & Spugnini, E. P. (2006). Thoracic haemangiopericytoma in a cat. *Veterinary Record*, 159, 596–599. <https://doi.org/10.1136/vr.159.18.598>
- Biller, B., Berg, J., Garrett, L., Ruslander, D., Wearing, R., Abbott, B., ... Bryan, C. (2016). 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 52(4), 181–204. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6570>
- Brunner, C. H. M., Dutra, G., Silva, C. B., Silveira, L. M. G., & Monteiro Martins, M. de F. (2014). Electrochemotherapy for the treatment of fibropapillomas in *Chelonia mydas*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(2), 213–218. <https://doi.org/10.1638/2010-0125.1>
- Burton, J. H. (2012). Oncology. In *The Cat Clinical and Management* (pp. 779–781). Elsevier Ltd.
- Cadossi, R., Ronchetti, M., & Cadossi, M. (2014). Locally enhanced chemotherapy by electroporation: clinical experiences and perspective of use of electrochemotherapy. *Future Oncology (London, England)*, 10(5), 877–890. <https://doi.org/10.2217/fon.13.235>
- Campana, L. G., Clover, A. J. P., Valpione, S., Quaglino, P., Gehl, J., Kunte, C., ... Sersa, G. (2016). Recommendations for improving the quality of reporting clinical electrochemotherapy studies based on qualitative systematic review. *Radiology and Oncology*, 50(1), 1–13. <https://doi.org/10.1515/raon-2016-0006>
- Cannon, R., Ellis, S., Hayes, D., Narayanan, G., & Martin, R. C. G. (2013). Safety and early efficacy of irreversible electroporation for hepatic tumors in proximity to vital structures. *Journal of Surgical Oncology*, 107(5), 544–549. <https://doi.org/10.1002/jso.23280>
- Cemazar, M., Tamzali, Y., Sersa, G., Tozon, N., Mir, L. M., Miklavcic, D., ... Teissie, J. (2008). Electrochemotherapy in veterinary oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 826–831. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.01117.x>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dobson, J. M. (2010). Introduction: cancer in cats and dogs. In J. M. D. and B. D. X. Lascelles (Ed.), *BSAVA Manual of Small Animal Oncology* (Third edit, pp. 1–5). BSAVA.
- Dobson, S. E. L. and J. M. (2010). Principles of radiation therapy. In Jane M. Dobson & B.Duncan X. Lascelles (Ed.), *BSAVA Manual of Small Animal Oncology* (Third edit, pp. 60–79). BSAVA.
- Edhemovic, I., Brecelj, E., Gasljevic, G., Marolt Music, M., Gorjup, V., Mali, B., ... Sersa, G. (2014). Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *Journal of Surgical Oncology*, 110(3), 320–327. <https://doi.org/10.1002/jso.23625>
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., ... Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>
- Escoffre, J.-M., & Rols, M.-P. (2012). Electrochemotherapy: Progress and Prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 18(23), 3406–3415. <https://doi.org/10.2174/138161212801227087>
- Fini, M., Salamanna, F., Parrilli, A., Martini, L., Cadossi, M., Maglio, M., & Borsari, V. (2013). Electrochemotherapy is effective in the treatment of rat bone metastases. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30(8), 1033–1045. <https://doi.org/10.1007/s10585-013-9601-x>

- Finocchiaro, L. M., & Glikin, G. C. (2017). Recent clinical trials of cancer immunogene therapy in companion animals. *World Journal of Experimental Medicine*, 7(2), 42. <https://doi.org/10.5493/wjem.v7.i2.42>
- Fowler, B. (2012). Oncology. In Elsevier Ltd (Ed.), *The Cat Clinical and Management* (pp. 768–770).
- Giardino, R., Fini, M., Bonazzi, V., Cadossi, R., Nicolini, A., & Carpi, A. (2006). Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(8), 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.016>
- Gordon, S. M. L (2013). Radiation Therapy. In W. & MacEwen's (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th edition, pp. 180–208). Elsevier Saunders.
- Gothelf, A., & Gehl, J. (2012). What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 8(11), 1694–1702. <https://doi.org/10.4161/hv.22062>
- Ho, N. T., Smith, K. C., & Dobromylskyj, M. J. (2017). Retrospective study of more than 9000 feline cutaneous tumours in the United Kingdom: 2006–2013. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1098612X1769947. <https://doi.org/10.1177/1098612X17699477>
- Impellizeri, J. (2015). How Electrochemotherapy Opens Doors to Additional Treatment. *Veterinary Practice News*, 1–4. Retrieved from <http://www.veterinarypracticenews.com/How-Electrochemotherapy-Opens-Doors-to-Additional-Treatment/>
- Impellizeri, J., Aurisicchio, L., Forde, P., & Soden, D. M. (2016). Electroporation in veterinary oncology. *Veterinary Journal*, 217, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.015>
- Jane M Dobson, A. E. H. (2008). Cancer chemotherapy. In *Small Animal Clinical Pharmacology* (Second edi, pp. 354–357). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2858-8.50029-4>
- Lanore, D. (2014). Tumeur palpébrale récidivante Traitement par électrochimiothérapie. *L'essentiel*, 351/352, 10–13.
- Maglietti, F., Tellado, M., Olaiz, N., Michinski, S., & Marshall, G. (2017). Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode. *Radiology and Oncology*, 51(4), 1–9. <https://doi.org/10.1515/raon-2017-0043>
- Mali, B., Jarm, T., Corovic, S., Paulin-Kosir, M. S., Cemazar, M., Sersa, G., & Miklavcic, D. (2008). The effect of electroporation pulses on functioning of the heart. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 46(8), 745–757. <https://doi.org/10.1007/s11517-008-0346-7>
- Mali, B., Miklavcic, D., Campana, L. G., Cemazar, M., Sersa, G., Snoj, M., & Jarm, T. (2013). Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. *Radiology and Oncology*, 47(1), 32–41. <https://doi.org/10.2478/raon-2013-0002>
- Markelc, B., Sersa, G., & Cemazar, M. (2013). Differential Mechanisms Associated with Vascular Disrupting Action of Electrochemotherapy: Intravital Microscopy on the Level of Single Normal and Tumor Blood Vessels. *PLoS ONE*, 8(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059557>
- Marty, M., Sersa, G., Garbay, J. R., Gehl, J., Collins, C. G., Snoj, M., ... Mir, L. M. (2006). Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer, Supplement*, 4(11), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.002>

- Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., Heller, R., & Serša, G. (2014). Electrochemotherapy: From the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering Online*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-13-29>
- Miklavčič, D., Serša, G., Breclj, E., Gehl, J., Soden, D., Bianchi, G., ... Jarm, T. (2012). Electrochemotherapy: Technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 50(12), 1213–1225. <https://doi.org/10.1007/s11517-012-0991-8>
- Mir, L. M. (2006). Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer, Supplement*, 4(11), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.005>
- Mir, L. M., Devauchelle, P., Quintin-Colonna, F., Delisle, F., Doliger, S., Fradelizi, D., ... Orłowski, S. (1997). First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, 76(12), 1617–1622. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2228194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mir, L. M., Gehl, J., Sersa, G., Collins, C. G., Garbay, J. R., Billard, V., ... Marty, M. (2006). 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 Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer, Supplement*, 4(11), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.003>
- Morris, J. J. D. (2001). Introduction. In J. M. and J. Dobson (Ed.), *Small Animal Oncology* (First edit, pp. 1–3). Blackwell Science.
- Murphy, S. (2001). Squamous Cell Carcinoma in Cats. In *Feline Internal Medicine August Consultation* (7th ed.).
- Murphy, S., & Murphy, S. (2013). Cell carcinoma in the cat - Current understanding and treatment approaches. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 401–407. <https://doi.org/10.1177/1098612X13483238>
- Murphy, S., Murphy, S., Spugnini, E. P., Pizzuto, M., Filipponi, M., Romani, L., ... Cemazar, M. (2008). Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report. *In Vivo*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0117.x>
- Nataša, T., Veronika, K., Polona, J., Sersa, G., & Maja, C. (2010). Electrochemotherapy is highly effective for the treatment of canine perianal hepatoid adenoma. [file:///Users/brunamarelo/Desktop/Tese/ARTIGOS/Cemazar\\_et\\_al-2008-Journal\\_of\\_Veterinary\\_Internal\\_Medicine.pdf](file:///Users/brunamarelo/Desktop/Tese/ARTIGOS/Cemazar_et_al-2008-Journal_of_Veterinary_Internal_Medicine.pdf)  
[file:///Users/brunamarelo/Desktop/Tese/ARTIGOS/cvj\\_06](file:///Users/brunamarelo/Desktop/Tese/ARTIGOS/cvj_06). *Acta Veterinaria*, 60(2–3), 285–302. <https://doi.org/10.2298/AVB1003285T>
- Obermann, A., Larose, É., Rossetto, V., & Margerin, L. (2013). Pathology of non-thermal irreversible electroporation (N-TIRE)- induced ablation of canine brain. *Veterinary Science*, 14(November), 433–440. <https://doi.org/10.1051/iesc/2010mpcm03002>
- Page, D. L. G. and R. L. (2013). Cancer Chemotherapy. In W. & MacEwen's (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th editio, pp. 157–173). Elsevier Saunders.
- Plaschke, C. C., Gothelf, A., Gehl, J., Wessel, I., Caroline, C., Gothelf, A., ... Wessel, I. (2016). Electrochemotherapy of mucosal head and neck tumors: a systematic review. *Acta Oncologica*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2016.1207803>
- Plumb, D. C. (2011). Veterinary drug handbook. In *Journal of Equine Veterinary Science* (7th ed., Vol. 19, p. 100). [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(99\)80080-X](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(99)80080-X)
- Racnik, J., Svara, T., Zadavec, M., Gombac, M., Cemazar, M., Sersa, G., & Tozon, N. (2018). Electrochemotherapy with bleomycin of different types of cutaneous tumours in a ferret (*Mustela putorius furo*). *Radiology and Oncology*, 52(1), 98–104.

<https://doi.org/10.1515/raon-2017-0057>

- Rodriguez, J. (2010). Chemotherapy. In *Cancer Management in Small Animal Practice* (pp. 101–104). Saunders.
- Ruarus, A. H., Vroomen, L. G. P. H., Puijk, R. S., Scheffer, H. J., Zonderhuis, B. M., Kazemier, G., ... Meijerink, M. R. (2018). Irreversible Electroporation in Hepatopancreaticobiliary Tumours. *Canadian Association of Radiologists Journal*, *69*(1), 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.carj.2017.10.005>
- 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*(10), 1315–1327. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1724-2>
- Soden, D. M., Larkin, J. O., Collins, C. G., Tangney, M., Aarons, S., Piggott, J., ... O'Sullivan, G. C. (2006). Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours. *Cancer Letters*, *232*(2), 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.057>
- Souza, C., Villarino, N. F., Farnsworth, K., & Black, M. E. (2017). Enhanced cytotoxicity of bleomycin, cisplatin, and carboplatin on equine sarcoid cells following electroporation-mediated delivery in vitro. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *40*(1), 97–100. <https://doi.org/10.1111/jvp.12331>
- Spugnini, E. P. (2001). Electrochemotherapy in feline oncology. In *Feline Internal Medicine August Consultation* (Vol. 7, pp. 572–576). <https://doi.org/10.1016/B978-1-56053-461-7.50051-6>
- 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), 43–52. <https://doi.org/10.2174/156800961601151218155340>
- Spugnini, E. P., Baldi, A., Vincenzi, B., Bongiorno, F., Bellelli, C., Citro, G., & Porrello, A. (2006). Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: A preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *59*(3), 375–381. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0281-y>
- Spugnini, E. P., Baldi, F., Mellone, P., Feroce, F., D'Avino, A., Bonetto, F., ... Baldi, A. (2007). Patterns of tumor response in canine and feline cancer patients treated with electrochemotherapy: Preclinical data for the standardization of this treatment in pets and humans. *Journal of Translational Medicine*, *5*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-48>
- Spugnini, E. P., Citro, G., & Baldi, A. (2009). Adjuvant electrochemotherapy in veterinary patients: A model for the planning of future therapies in humans. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *28*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-114>
- Spugnini, E. P., Citro, G., Dotsinsky, I., Mudrov, N., Mellone, P., & Baldi, A. (2008). Ganglioneuroblastoma in a cat: A rare neoplasm treated with electrochemotherapy. *Veterinary Journal*, *178*(2), 291–293. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.014>
- Spugnini, E. P., Citro, G., Mellone, P., Dotsinsky, I., Mudrov, N., & Baldi, A. (2007). Electrochemotherapy for localized lymphoma: a preliminary study in companion animals. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *26*(3), 343–346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Electrochemotherapy+for+localized+lymphoma:+a+preliminary+study+in+companion+animals>.
- Spugnini, E. P., Di Tosto, G., Salemme, S., Pecchia, L., Fanciulli, M., & Baldi, A. (2013). Electrochemotherapy for the treatment of recurring aponeurotic fibromatosis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, *54*(6), 606–609.

- Spugnini, E. P., Dotsinsky, I., Mudrov, N., Citro, G., Caruso, G., Cardelli, P., & Baldi, A. (2008). Electrochemotherapy-induced radiation recall in a cat. *In Vivo*, 22(6), 751–754.
- Spugnini, E. P., Dotsinsky, I., Mudrov, N., Citro, G., D'Avino, A., & Baldi, A. (2008). Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 27(1), 7–10. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-58>
- Spugnini, E. P., Dotsinsky, I., Mudrov, N., De Luca, A., Codini, C., Citro, G., ... Baldi, A. (2008). Successful rescue of an apocrine gland carcinoma metastatic to the cervical lymph nodes by mitoxantrone coupled with trains of permeabilizing electrical pulses (Electrochemotherapy). *In Vivo*, 22(1), 51–54.
- Spugnini, E. P., Fais, S., Azzarito, T., & Baldi, A. (2016). Novel Instruments for the Implementation of Electrochemotherapy Protocols: From Bench Side to Veterinary Clinic. *Journal of Cellular Physiology*, 232(3), 490–495. <https://doi.org/10.1002/jcp.25505>
- Spugnini, E. P., Fanciulli, M., Citro, G., & Baldi, A. (2012). Preclinical models in electrochemotherapy: the role of veterinary patients. *Future Oncology*, 8, 829–837. <https://doi.org/10.2217/fon.12.64>
- Spugnini, E. P., Filipponi, M., Romani, L., Dotsinsky, I., Mudrov, N., Citro, G., & Baldi, A. (2010). Electrochemotherapy treatment for bilateral pleomorphic rhabdomyosarcoma in a cat. *Journal of Small Animal Practice*, 51(6), 330–332. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00913.x>
- Spugnini, E. P., Menicagli, F., Pettorali, M., & Baldi, A. (2017). Ultrasound guided electrochemotherapy for the treatment of a clear cell thymoma in a cat. *Open Veterinary Journal*, 7(1), 57–60. <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i1.8>
- Spugnini, E. P., Pizzuto, M., Filipponi, M., Romani, L., Vincenzi, B., Menicagli, F., ... Baldi, A. (2015). Electroporation Enhances Bleomycin Efficacy in Cats with Periocular Carcinoma and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1368–1375. <https://doi.org/10.1111/jvim.13586>
- Spugnini, E. P., Renaud, S. M., Buglioni, S., Carocci, F., Dragonetti, E., Murace, R., ... Citro, G. (2011). Electrochemotherapy with cisplatin enhances local control after surgical ablation of fibrosarcoma in cats: An approach to improve the therapeutic index of highly toxic chemotherapy drugs. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-152>
- Spugnini, E. P., Vincenzi, B., Baldi, F., Citro, G., & Baldi, A. (2006). Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer Research*, 26(6 B), 4585–4589.
- Spugnini, E. P., Vincenzi, B., Citro, G., Santini, D., Dotsinsky, I., Mudrov, N., ... Baldi, A. (2007). Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely excised spontaneous canine sarcomas. *In Vivo*, 21(5), 819–822.
- Spugnini, E. P., Vincenzi, B., Citro, G., Tonini, G., Dotsinsky, I., Mudrov, N., & Baldi, A. (2007). Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report. *Veterinary Journal*, 179(1), 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.011>
- Tamzali, Y., Borde, L., Rols, M. P., Golzio, M., Lyazrhi, F., & Teissie, J. (2012). Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases. *Equine Veterinary Journal*, 44(2), 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00425.x>
- Th, N. (2014). Un traitement innovant pour les sarcoïdes. *Cheval Santé*, 94, 24–26.
- Tounekti, O., Pron, G., Belehradek, J., & Mir, L. M. (1993). Bleomycin, an Apoptosis-mimetic Drug That Induces Two Types of Cell Death Depending on the Number of Molecules

Internalized. *Cancer Research*, 53(22), 5462–5469.

- Tozon, N., Lamprecht Tratar, U., 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*, (116), 1–7. <https://doi.org/10.3791/54760>
- 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(4), 291–299. <https://doi.org/10.1177/1098612X13507071>
- Withrow, J. P. F. and S. J. (2013). Surgical Oncology. In W. & MacEwen's (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th editio, pp. 149–154). Elsevier Saunders.
- Withrow, S. (2013). Tumors of the Respiratory System. In Withrow & MacEwen's (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th editio, p. 768). Elsevier Saunders.
- Withrow, S. J. (2013). Why worry about cancer in companion animals. In W. & MacEwen's (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th editio, p. XV). Elsevier Saunders.