



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANDRÉ GUSTAVO ALVES HOLANDA

**USO DO PLASMA NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS: ESTUDO *IN VITRO* E APLICAÇÃO CLÍNICA EM TUMORES
FELINOS**

MOSSORÓ

2022

ANDRÉ GUSTAVO ALVES HOLANDA

**USO DO PLASMA NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS: ESTUDO *IN VITRO* E APLICAÇÃO CLÍNICA EM TUMORES
FELINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes

Coorientador: Prof. Dr. Genilson Fernandes de Queiroz

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A722u Alves Holanda, André Gustavo.
 Uso do Plasma no Tratamento do Carcinoma de
 Células Escamosas: Estudo in Vitro e Aplicação
 Clínica em Tumores Felinos / André Gustavo Alves
 Holanda. - 2022.
 63 f. : il.

 Orientador: João Marcelo Azevedo de Paula
 Antunes.
 Coorientador: Genilson Fernandes de Queiroz.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
 Ciência Animal, 2022.

 1. Oncologia. 2. Câncer. 3. Gato. 4. Plasma não
 térmico. I. Azevedo de Paula Antunes, João
 Marcelo, orient. II. Fernandes de Queiroz,
 Genilson, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ANDRÉ GUSTAVO ALVES HOLANDA

**USO DO PLASMA NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS: ESTUDO *IN VITRO* E APLICAÇÃO CLÍNICA EM TUMORES
FELINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

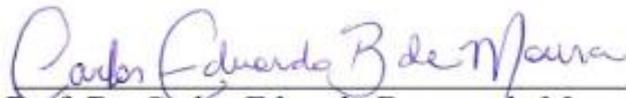
Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Defendida em: 24/05/2022.

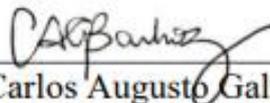
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes



Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura



Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, proteção diária e por ter colocado pessoas maravilhosas em minha vida que contribuíram para realização desse sonho.

À minha companheira de vida, Mariângela Silva de Oliveira, que permaneceu ao meu lado durante todos os momentos, sejam eles de bonança ou adversidade.

Aos meus pais, Maria do Socorro Alves da Costa e Fábio Jean Nascimento Holanda, por terem investido tempo, dedicação e recursos financeiros em minha educação.

Ao meu orientador, Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, por me permitir prestar essa singela contribuição para ciência. Obrigado pela oportunidade, comprometimento e confiança.

Ao meu coorientador, Dr. Genilson Fernandes de Queiroz, que tem grande importância no meu desenvolvimento como pesquisador e médico veterinário. Obrigado pela oportunidade, ensinamentos, amizade e confiança.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura, que prestou imensa contribuição intelectual em todas as etapas da pesquisa. Obrigado pela paciência, confiança, oportunidade e ensinamentos.

Ao professor Dr. Clodomiro Alves Junior por compartilhar sua experiência e possibilitar a aplicação do plasma nesse estudo.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza pela contribuição no trabalho, especialmente por tornar possível a execução dos ensaios *in vitro*.

Aos professores, Dra Naisandra Bezerra da Silva Farias, Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Junior e a discente Uta Ishikawa pela colaboração com a imunohistoquímica.

À professora Dra. Juliana Fortes Vilarinho Braga por ter sido tão presente em minha formação, sempre disposta a ajudar.

À médica veterinária residente em anestesiologia, Kássia Fernanda Araújo Damasceno, por ter planejado e executado as sedações do paciente.

Aos médicos veterinários Daniel de Araújo Viana e Ismael Lira Borges pela contribuição no diagnóstico morfológico.

Aos discentes de graduação, Bruna Cesário, Bruno Henrique, Luiz Emanuel e Victória Morais pela dedicação e contribuição.

Ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS/UFERSA) por disponibilizar a câmera termográfica.

Ao Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA/UFERSA, responsável: Professor Dr. Moacir Franco de Oliveira) pela disponibilidade da infraestrutura física.

Aos médicos veterinários, residentes, técnicos e terceirizados do HOVET-UFERSA pela convivência diária e contribuição ao atendimento de rotina dos pacientes oncológicos.

A UFERSA e ao PPGCA por ter me acolhido e possibilitado cursar uma pós-graduação. Gratidão por cada docente e funcionário que contribuiu para o meu desenvolvimento profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para concretização desse projeto.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna que afeta frequentemente a pele e cavidade oral dos gatos. Ambas as formas exigem a adoção de um tratamento local adequado, sendo realizada comumente a cirurgia. Entretanto, o efeito desfigurante e o estágio avançado ao diagnóstico podem ser fatores limitantes. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas. Em oncologia, o plasma frio atmosférico (PFA) tem demonstrado resultados promissores, exercendo efeito anticancerígeno *in vitro* e *in vivo* contra uma ampla variedade de neoplasias. Assim, o objetivo foi avaliar a eficácia do PFA no tratamento do CCE felino cutâneo e oral. Linhagem SCC-25 de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) foi dividida em grupo controle e tratamento, ao qual foi submetido ao plasma por 60s, 90s ou 120s. O ensaio de óxido nítrico (NO) foi realizado através da determinação da concentração de nitrito, enquanto a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT decorridas 24h, 48h e 72h. Para termografia *in vitro*, imagens térmicas foram capturadas antes e após os diferentes tempos de terapia. O estudo clínico foi realizado em felino com dois carcinomas cutâneos e um oral. A terapia com PFA consistiu em dois ciclos, no qual cada ciclo foi composto por três sessões semanais de plasma, seguido por uma semana sem exposição. As lesões foram avaliadas por exame termográfico, histopatológico e imunohistoquímico. Verificou-se que a concentração de nitrito aumentou significativamente com os tratamentos de 90s e 120s quando comparado ao grupo controle. Foi observada redução de viabilidade celular para as células SCC-25 decorridas 24h e 48h, independente do tempo de exposição. Entretanto, em 72h houve efeito significativo apenas com o tratamento de 120s. A exposição ao PFA resultou em redução de temperatura do meio de cultura para todos os tempos avaliados. *In vivo*, a média de temperatura dos tumores pré-tratamento foi de 35 °C e no pós-tratamento foi de 35,7°C. Os dois tumores cutâneos responderam ao PFA, sendo uma resposta completa, com cura histológica, e outra parcial. O CCE oral permaneceu estável. A análise histopatológica demonstrou o surgimento de áreas em apoptose nos tumores remanescentes. Houve aumento da expressão de caspase-3 e TNF-alfa. Os efeitos adversos foram locais e incluíram eritema e formação de crostas. As reações foram em grau I, autolimitantes e não exigiram intervenção médica. O PFA apresentou efeito anticancerígeno *in vitro* sobre linhagem de células CCECP, evidenciado pela redução da viabilidade celular dose-dependente. *In vivo*, a terapia parece segura e eficaz contra o CCE cutâneo felino. Para o tumor oral proliferativo, o tratamento não resultou em resposta clínica. Entretanto, houve efeito biológico, demonstrado pela maior expressão de indicadores de apoptose.

Palavras-chave: Oncologia. Câncer. Gato. Plasma não térmico.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant neoplasm that frequently affects the skin and oral cavity of cats. Both forms require the adoption of an adequate local treatment, and surgery is commonly performed. However, the disfiguring effect and advanced stage at diagnosis may be limiting factors. Thus, the development of alternative therapies becomes necessary. In oncology, atmospheric cold atmospheric plasma (CAP) has shown promising results, exerting an anticancer effect *in vitro* and *in vivo* against a wide variety of neoplasms. Thus, the objective was to evaluate the effectiveness of CAP in the treatment of feline cutaneous and oral SCC. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), lineage SCC-25, was divided into a control and treatment group, which was subjected to plasma for 60s, 90s or 120s. The nitric oxide (NO) assay was performed by determining the concentration of nitrite, while cytotoxicity was evaluated by the MTT assay after 24h, 48h and 72h. For *in vitro* thermography, thermal images were captured before and after different therapy times. The clinical study was carried out in a feline with two cutaneous and one oral carcinomas. CAP therapy consisted of two cycles, in which each cycle consisted of three weekly plasma sessions, followed by one week without exposure. Lesions were evaluated by thermographic, histopathological and immunohistochemical examination. It was verified that the concentration of nitrite increased significantly with the treatments of 90s and 120s when compared to the control group. Cell viability reduction was observed for SCC-25 cells after 24h and 48h, regardless of exposure time. However, at 72h there was a significant effect only with the treatment of 120s. Exposure to CAP resulted in a reduction in the temperature of the culture medium for all times evaluated. *In vivo*, the mean temperature of the tumors pre-treatment was 35°C and post-treatment was 35.7°C. Both skin tumors responded to CAP, with a complete response, with histological cure, and a partial response. Oral SCC remained stable. Histopathological analysis demonstrated the appearance of areas in apoptosis in the remaining tumors. The expression of caspase-3 and TNF-alpha increased. Adverse effects were local and included erythema and crusting. The reactions were grade I, self-limiting and did not require medical intervention. CAP showed an *in vitro* anticancer effect on HNSCC cell lines, as evidenced by the dose-dependent reduction in cell viability. *In vivo*, the therapy appears safe and effective against feline cutaneous SCC. For the proliferative oral tumor, treatment did not result in a clinical response. However, there was a biological effect, demonstrated by the higher expression of apoptosis indicators.

Keywords: Oncology. Cancer. Cat. Non thermal plasma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Concentração de nitrito no meio de cultura contendo células SCC-25 tratadas com PFA por diferentes tempos de exposição. Os dados são apresentados como média \pm SD. Diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle são demonstradas no gráfico da seguinte forma, **p < 0.01, ***p < 0.001..... 37
- Figura 2:** Viabilidade das células SCC-25 após diferentes tempos de exposição ao PFA. Os dados são apresentados como média \pm DP. UA = unidades arbitrárias. Diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle são demonstradas no gráfico da seguinte forma, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001..... 38
- Figura 3:** Termografia do meio de cultura contendo células SCC-25 tratadas com PFA por diferentes tempos de exposição. Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle são demonstradas no gráfico da seguinte forma, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001..... 38
- Figura 4:** Termografia pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) dos tumores com PFA, evidenciando leve aumento de temperatura..... 39
- Figura 5:** Aspecto do paciente felino imediatamente antes da primeira sessão com PFA (A) e 21 dias após o término do segundo ciclo de terapia (B)..... 40
- Figura 6:** Avaliação histopatológica de secções do CCE felino cutâneo (A-B) e oral (C-D) coradas por hematoxilina e eosina (H&E) 400x. O tratamento com PFA resultou no surgimento de áreas em apoptose (setas). As células indicadas apresentam núcleo picnótico, cariólise, citoplasma hipereosinofílico e contração celular..... 41
- Figura 7:** Expressão imunohistoquímica de caspase-3 (A-B) e TNF-alfa (C-D) no CCE cutâneo (100x). Pré-tratamento (*caspase-3*: 2+ moderado; *TNF-alfa*: 2+ acentuado). Pós-tratamento (*capase-3*: 2+ acentuado; *TNF-alfa*: 3+ acentuado)..... 42
- Figura 8:** Expressão imunohistoquímica de caspase-3 (A-B) e TNF-alfa (C-D) no CCE oral (100x). Pré-tratamento (*caspase-3*: 1+ leve; *TNF-alfa*: 2+ leve). Pós-tratamento (*capase-3*: 2+ leve; *TNF-alfa*: 3+ moderado)..... 43
- Figura 9:** Aspecto do paciente felino durante o segundo ciclo de terapia com PFA, evidenciando a presença de eritema e crostas em áreas tumorais..... 44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Carcinoma de células escamosas felino	12
2.1.1	<i>Carcinoma de células escamosas cutâneo</i>	12
2.1.2	<i>Carcinoma de células escamosas oral</i>	13
2.2	Plasma frio atmosférico	14
2.2.1	<i>Aplicação do plasma frio atmosférico em oncologia</i>	15
2.2.2	<i>Efeito do plasma frio atmosférico contra o carcinoma de células escamosas</i>	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	<i>Objetivo geral</i>	19
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	19
	REFERÊNCIAS	20
	CAPÍTULO I: Uso do Plasma no Tratamento do Carcinoma de Células Escamosas: Estudo <i>In Vitro</i> e Aplicação Clínica em Tumores Felinos	29
	APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	59
	ANEXO A: PARECER 13/2020 CEUA – UFERSA	63

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna, que se desenvolve a partir do epitélio escamoso (MURPHY et al., 2013). Assim como para os humanos (DOOLEY et al., 2003; TANDON et al., 2017), o CCE representa um dos principais tumores cutâneos (MILLER et al., 1971) e a grande maioria das neoplasias orais em gatos (BILGIC et al., 2015). A doença compartilha uma série de similaridades entre as duas espécies, incluindo fatores de risco, comportamento biológico, terapia e prognóstico. Em pele, eles são especialmente relacionados com a exposição solar crônica (radiação UV), mais precisamente a radiação ultravioleta B (DORN; TAYLOR; SCHNEIDER, 1971). Para o CCE oral, um dos principais fatores de risco é o contato com a fumaça do cigarro (BERTONE; SNYDER; MOORE, 2003). Ambas as formas apresentam comportamento local invasivo, com maiores taxas de metástases para os tumores orais (POIRIER et al., 2013; LINO et al., 2019), os quais estão associados a um pior prognóstico (WYPIJ, 2013).

A excisão cirúrgica é a modalidade terapêutica mais bem sucedida para o CCE cutâneo. No entanto, a depender da área acometida, a reconstrução pode ser desafiadora e limitada em função do resultado estético desfigurador (MURPHY, 2013). Para forma oral, abordagens multimodais associadas à cirurgia resultam em melhores taxas de sucesso (MARCONATO et al., 2013; SOLTERO-RIVERA et al., 2014). Porém, em muitos casos o tratamento cirúrgico é impossibilitado em virtude da natureza invasiva e estágio avançado no momento do diagnóstico (BILGIC et al., 2015). Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas ou complementares para o CCE felino.

Nas duas últimas décadas os plasmas de baixa temperatura têm ganhado espaço frente às aplicações biomédicas. Esses compostos são gerados à pressão atmosférica, em temperaturas abaixo de 40°C e produzem espécies reativas, partículas carregadas e fótons, que têm efeitos biológicos impactantes (LAROUSSE et al., 2020). Entre suas atividades, a capacidade de geração de apoptose em células cancerígenas assumiu papel de destaque (WEISS et al., 2015). Assim, o plasma frio atmosférico (PFA) vem emergindo como um tratamento promissor para o câncer que pode complementar o conjunto existente de modalidades de tratamento, aumentando a seletividade e eficácia contra cânceres resistentes (SEMMLER et al., 2020; DAI et al., 2018). O plasma possui as vantagens de ser barato,

rápido e de fácil aplicação. Além disto, é uma alternativa promissora quando comparado aos tratamentos convencionais, que apresentam altos custos e efeitos colaterais aos tecidos saudáveis (SAADATI; MAHDIKIA; ABBASZADEH, 2018).

Para oncologia, dispositivos de PFA vêm demonstrando efeito anticancerígeno *in vitro* contra uma ampla diversidade de neoplasias, incluindo o câncer de pulmão (KARKI et al., 2020), glioblastoma (CHEN et al., 2017), osteossarcoma (TORNIN et al., 2019), câncer de mama (WANG et al., 2013) câncer de pâncreas (VAN LOENHOUT et al., 2019) câncer de próstata (FOFANA et al., 2020), câncer colorretal (SCHNEIDER et al., 2018), linfoma (CHENG et al., 2019), CCE cutâneo (PASQUAL-MELO et al., 2020) e o carcinoma de cabeça e pescoço (GUERRERO-PRESTON et al., 2014).

Pesquisas clínicas com uso do plasma ainda são incipientes, mas apontam para resultados promissores. Pacientes humanos com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) avançado foram beneficiados pelo tratamento, apresentando redução de dor e carga microbiana em leito tumoral, bem como remissão parcial da neoplasia em alguns casos (METELMANN et al., 2015; METELMANN et al., 2018).

Para animais com câncer, não existem relatos da aplicação clínica do PFA. Baseado em estudos *in vitro*, cobaias e resultados preliminares em humanos, a hipótese é que ele possa ser uma opção eficaz e segura para o tratamento do carcinoma de células escamosas felino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas felino

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor maligno originado do epitélio escamoso. O epitélio escamoso forma a maior parte da pele, reveste a cavidade oral e o esôfago e forma o leito ungueal e os coxins (MURPHY, 2013). Ele representa um dos principais tumores de pele em gatos (MILLER et al., 1991) e a grande maioria das neoplasias orais da espécie (BILGIC et al., 2015).

Para ambas as formas, o padrão-ouro diagnóstico é baseado no exame histopatológico e o estadiamento é realizado como preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), utilizando o sistema TNM, que considera o tamanho do tumor (T), condição dos linfonodos regionais (N) e ocorrência de metástase distante (M) (OWEN, 1980). O comportamento local invasivo é observado independente da localização. Porém, os tumores em cavidade oral estão associados a maiores taxas de metástases. (POIRIER et al., 2013; LINO et al., 2019).

2.1.1 Carcinoma de células escamosas cutâneo

O CCE cutâneo acomete principalmente gatos brancos de nove a 14 anos de idade (DORN; TAYLOR; SCHNEIDER, 1971; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Macroscopicamente, ele pode se apresentar de forma proliferativa, demonstrando crescimento papilar friável, ou erosiva, formando lesão ulcerada. (MORRIS; DOBSON, 2001). Essa neoplasia tem como principal causa à exposição crônica a luz ultravioleta, assim ela ocorre predominantemente em áreas despigmentadas e glabras como orelhas, pálpebras, plano nasal e região temporal (MURPHY, 2013).

A classificação do CCE cutâneo é baseada no tamanho do tumor e profundidade de invasão, sendo Tis para o carcinoma in situ; T1 para tumores menores que 2 cm de diâmetro,

superficiais; T2 para tumores entre 2 – 5 cm de diâmetro ou com invasão mínima independente do tamanho; T3 para tumores maiores que 5 cm de diâmetro ou invadindo tecido subcutâneo, independente do tamanho; e T4 para tumores que estão invadindo outras estruturas como fáscias, músculos, ossos ou cartilagens (OWEN, 1980).

As modalidades de tratamento incluem: excisão cirúrgica (MASSARI et al., 2019), radioterapia (GASYMOVA et al., 2017), terapia fotodinâmica (FLICKINGER et al., 2018), eletroquimioterapia (TOZON et al., 2013) e criocirurgia (QUEIROZ et al., 2016). A escolha da técnica varia conforme a extensão, grau de invasão, quantidade e localização das lesões (MURPHY, 2013).

2.1.2 Carcinoma de células escamosas oral

O CCE oral acomete principalmente animais idosos com idade entre oito e 16 anos (HUTSON et al., 1992). Os fatores predisponentes incluem exposição à fumaça do cigarro, uso de coleiras antipulgas e consumo de comida enlatada, especialmente atum (BERTONE; SNYDER; MOORE, 2003). A fumaça do cigarro está associada à mutação da proteína p53, que é responsável pela supressão tumoral e desempenha papel crítico na parada celular e indução de apoptose. Para as coleiras antipulgas o hábito de higienização dos animais pode propiciar a ingestão dos princípios ativos, enquanto que o risco relacionado às comidas enlatadas é proveniente do próprio conteúdo da alimentação ou indução de doenças periodontais (BERTONE; SNYDER; MOORE, 2003).

O tumor comumente surge da gengiva e mucosa da maxila, mandíbula, língua, área sublingual ou região tonsilar. A apresentação clínica do CCE maxilar é geralmente como lesão ulcerada, enquanto para o CCE mandibular ela é frequentemente proliferativa e expansiva. A forma sublingual pode ser ulcerativa, necrótica, infiltrativa ou proliferativa (BILGIC et al., 2015).

A classificação das neoplasias orais em cães e gatos é Tis para tumor *in situ*, T1 para tumores menores que 2 cm de diâmetro, T2 para tumores entre 2 - 4 cm de diâmetro e T3 para

tumores maiores que 4 cm de diâmetro. As classificações T1, T2 e T3 são seguidas pelas letras “a” ou “b” para indicar ausência ou presença de invasão óssea, respectivamente (LIPTAK, 2020).

O tratamento do CCE oral felino é semelhante ao humano (WYPIJ, 2013). Os tumores em estádios iniciais e passíveis de ressecção cirúrgica são candidatos ao tratamento curativo (BILGIC et al., 2015). Entretanto, abordagens multimodais, associando a cirurgia com drogas antineoplásicas e a radioterapia oferecem maiores chances de sucesso (MARCONATO et al., 2013; SOLTERO-RIVERA et al., 2014). Além disso, em casos avançados a excisão cirúrgica comumente não é factível, tornando o tratamento paliativo uma opção válida (BILGIC et al., 2015).

A similaridade entre o CCE oral felino (CCEOF) e o CCECP humano tornam os gatos como excelentes modelos em oncologia comparada (WYPIJ, 2013). O CCECP é um câncer frequente na população, que apresenta um mau prognóstico e avanços clínicos limitados (TANDON et al., 2017). Dessa forma, estudos com a espécie felina podem permitir descobertas terapêuticas aplicáveis aos pacientes humanos (WYPIJ, 2013).

2.2 Plasma frio atmosférico

O plasma, conhecido como “quarto estado da matéria”, é composto por espécies reativas, ou seja, moléculas e átomos excitados, íons positivos, negativos e elétrons em um gás neutro de fundo (WELTMANN et al., 2018). Ele pode ser categorizado em plasma térmico (SAMAL, 2017) e frio (WANG et al., 2013). O plasma térmico é produzido em ambiente a vácuo e necessita de altas temperaturas, sendo utilizado comumente no tratamento de biomateriais (SEO et al., 2014). Por outro lado, o plasma frio atmosférico é produzido em temperaturas abaixo de 40°C sob pressão atmosférica, possibilitando aplicação terapêutica segura em animais e humanos (GAY-MIMBRERA et al., 2016).

Com o desenvolvimento do PFA, surgiu um novo campo, a “medicina de plasma”, que aliando conhecimentos da física e medicina vem desenvolvendo e testando diferentes fontes e dispositivos com aplicações biomédicas (LAROUSSE, 2020). Entre os campos explorados de forma promissora pela técnica, incluem-se: cicatrização (KRAMER et al., 2013) e

descontaminação de feridas (ULRICH et al., 2015), tratamento de infecções orais (PREISSNER et al., 2016) e do câncer (WEISS et al., 2015).

O plasma pode ser gerado por duas abordagens: direta e indireta. Para descarga indireta, as espécies ativas de plasma são transportadas por um fluxo de gás, enquanto para descarga direta, o tecido ou células vivas funcionam como um dos eletrodos, participando ativamente do processo. Com base nisso, temos dois dispositivos, o jato de plasma e a descarga de barreira dielétrica (DBD) (YAN; SHERMAN; KEIDAR, 2017).

O jato de plasma necessita de um gás carreador, seja hélio ou argônio. Enquanto o dispositivo DBD gera plasma diretamente do ar. Neste segundo caso, o PFA formado é curto, porém amplo. Assim, o jato é mais adequado para tratar gentilmente pequenas áreas, enquanto o DBD se adequa melhor para regiões maiores (YAN; SHERMAN; KEIDAR, 2017).

O PFA pode ser aplicado por diferentes formas, exposição direta ou indireta. Na primeira situação o plasma vai ao tecido biológico e todos os seus produtos agem diretamente sobre as células. Para forma indireta, o plasma é usado primeiramente para tratar um meio líquido, ao qual os tecidos serão expostos. Uma das vantagens dessa última abordagem é a possibilidade de armazenamento, flexibilidade não oferecida pela forma direta (LAROUSSE, 2020).

2.2.1 Aplicação do plasma frio atmosférico em oncologia

O PFA pode ser utilizado no combate ao câncer, através das seguintes metodologias: contato direto, injeção de soluções tratadas por plasma e associado à intervenção cirúrgica. A administração de soluções pode permitir maior penetrabilidade no tratamento de tumores subcutâneos e intraperitoneais, enquanto o uso do PFA combinado à cirurgia tem por objetivo agir sobre células tumorais remanescentes (YAN et al., 2021). Ambas as abordagens, seja direta ou indireta (uso de soluções tratadas por plasma) apresentam muitas semelhanças (YAN et al., 2021). Apesar disso, Saadati et al., (2018), identificaram morte celular e redução tumoral significativamente superior para o melanoma murino tratado pela forma direta.

O potencial anticancerígeno do plasma é atribuído principalmente à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) (GRAVES, 2012). As ERONs se difundem para o meio intracelular e desencadeiam senescência, apoptose ou necrose dose dependente (SEMMLER et al., 2020). Benefícios adicionais incluem dano ao DNA e mitocondrial, inibição do crescimento celular, migração e invasividade, bem como indução de morte celular imunogênica e aumento da atividade de macrófagos (RATOVITSKI et al., 2014; LIN et al., 2015; VAHORA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

As principais ERONs produzidas pelo plasma são as seguintes: radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ozônio (O₃), superóxido (O₂⁻), peroxinitrito (ONOO⁻) e óxido nítrico (NO) (YAN et al., 2012; PANNGOM et al., 2013; XU et al., 2015). O óxido nítrico apresenta interesse especial devido ao seu importante papel na proliferação e morte celular (KIM et al., 2001). Em doses elevadas, ele é reconhecido como molécula anticancerígena pela capacidade de promover estresse oxidativo, dano ao DNA citotoxicidade e apoptose (VAHORA et al., 2016; ZHOU et al., 2016). O acúmulo de NO após exposição de células cancerígenas ao plasma foi associado com a geração de estresse oxidativo e consequente apoptose para o melanoma (XIA et al., 2019), câncer de próstata (GIBSON et al., 2014) e câncer de pulmão (KIM; CHUNG, 2016).

No presente momento, não existem relatos de efeito térmico do plasma em tecidos saudáveis de camundongos (BINENBAUM et al., 2017; DUCHESNE et al., 2019) ou células cancerígenas (SAADATI; MAHDIKIA; ABBASZADEH, 2018; FOFANA et al., 2020). Sabe-se que a produção de calor pode ser utilizada como modalidade terapêutica para o câncer através da hipertermia local ou ablação térmica (ROSSMANNA; HAEMMERICH, 2014). No primeiro caso, a temperatura deve ser mantida entre 40 – 43 °C por aproximadamente uma hora (CREEZE et al., 2021), resultando em inibição de reparo do DNA, hipóxia, resposta imune antitumoral e apoptose (GAO et al., 2016). Para ablação térmica são necessárias temperaturas de 60 °C, que geram necrose quase que instantaneamente (NIKFARJAM et al., 2005). Trabalhos realizados com aplicação do plasma na pele de camundongos hípidos relataram que a temperatura de 50 °C foi incapaz de causar danos térmicos em análises histológicas (BINENBAUM et al., 2017). Entretanto, nenhum monitoramento termográfico foi realizado até o momento para animais domésticos com câncer.

Por se tratar de uma terapia relativamente nova, o único estudo utilizando o plasma aplicado à oncologia animal foi conduzido em linhagem celular de osteossarcoma canino e indicou aumento de apoptose, redução de migração e potencial invasivo das células cancerígenas, sugerindo uso potencial como modalidade terapêutica em medicina veterinária (LEE et al., 2020).

O tratamento com PFA tem a grande vantagem de ser seletivo para as células cancerígenas, pois essas são mais vulneráveis ao estresse oxidativo e exibem larga proporção de aquaporinas e menor quantidade de colesterol na membrana celular, que contribui para melhor difusão de certas ERONs geradas pelo plasma (RATOVITSKI et al., 2014; YUSUPOV et al., 2018; YAN et al., 2021). Além disso, o plasma é considerado uma terapia dose-dependente e maiores tempos de exposição podem resultar em ampla redução de viabilidade das células cancerígenas (ERMAKOV et al., 2021; TAVARES-DA-SILVA et al., 2021). Tal efeito pode ser evidenciado decorridas 24 - 72h da terapia (ADIL et al., 2020). Além do tempo de exposição, outro parâmetro que determina a dosagem do plasma é a voltagem. *In vitro*, o aumento de 3.16 kV para 3.71 kV, estimulou a diminuição da viabilidade celular para o câncer de mama e glioblastoma, bem como aumentou a produção das ERONs: peróxido e nitrito (GJIKA et al., 2018). Em pacientes humanos com CCECP, a voltagem utilizada variou entre 2 kV e 3 kV (METELMANN et al., 2015; METELMANN et al., 2018).

2.2.2 Efeito do plasma frio atmosférico contra o carcinoma de células escamosas

O plasma frio atmosférico apresenta efeito antineoplásico *in vitro* contra o carcinoma de células escamosas cutâneo (WANG et al., 2019) e oral (GUERRERO-PRESTON et al., 2014; WELTZ et al., 2015; LEE et al., 2016). O tratamento é considerado dose-dependente, sendo o período de exposição, uma importante variável. (GUERRERO-PRESTON et al., 2014; Weltz et al., 2015). Weltz et al., (2015), avaliaram a influência de diferentes tempos de terapia (0, 30, 60, 90, 120 e 180s) contra células de CCECP e observaram que a partir de 90s, a citotoxicidade foi significativamente superior aos grupos controle, 30 e 60s. Além disso, em 120s houve redução de 50% da viabilidade celular. Outro estudo relacionou a exposição ao PFA por 2 minutos com a produção de ERONs, diminuição da proliferação e indução de apoptose (RAMIREDDY et al., 2018).

Para pacientes com ceratose actínica, lesão pré-neoplásica antecedente ao CCE cutâneo, a terapia com plasma tem apresentado bons resultados (DAESCHLEIN et al., 2017; FRIEDMAN et al., 2017; WIRTZ et al., 2018; ARISI et al., 2021). Um estudo reportou resolução completa de 53% (9/17) das lesões após um ciclo único de terapia (FRIEDMAN et al., 2017). Em paralelo, outros autores obtiveram resposta clínica em 55% das lesões avaliadas e resolução completa de 23% com a administração do PFA por 2 vezes na semana dentro de um mês em um largo número de amostras. Análises *in vivo* para o CCE cutâneo foram reportadas até o momento apenas em cobaias, evidenciando limitação de progressão das lesões (PASQUAL-MELO et al., 2020) .

Estudos clínicos têm sido conduzidos para avaliação do tratamento por plasma em humanos com CCECP avançado. O protocolo consiste na realização de ciclos, os quais são compostos por três aplicações semanais de plasma, seguido por uma semana sem exposição. A área do tumor é varrida por 1 min/cm², a uma distância de aproximadamente 8 mm (METELMANN et al., 2015; METELMANN et al., 2018). Um estudo reportou resposta clínica em aproximadamente um terço (4/12) dos pacientes (METELMANN et al., 2018). De forma semelhante, outro relatou resposta parcial em 33% (2/6) das pessoas, havendo redução de 80% da área tumoral em um dos indivíduos (METELMANN et al., 2015). Além disso, outros benefícios observados incluem: redução da contaminação bacteriana, controle da dor e melhora da qualidade de vida dos pacientes (METELMANN et al., 2015; SCHUSTER et al., 2016; METELMANN et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- a) Avaliar a eficácia do PFA no tratamento do CCE felino cutâneo e oral.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a produção de óxido nítrico, efeito na viabilidade celular e impacto térmico do PFA sobre linhagem celular de carcinoma de cabeça e pescoço;
- b) Avaliar a ocorrência de apoptose, efeito térmico, resultado clínico e segurança do PFA na terapia do CCE felino cutâneo e oral.

REFERÊNCIAS

- ADIL, B. H. et al. Breast cancer treatment using cold atmospheric plasma generated by the FE-DBD scheme. **Clinical Plasma Medicine**, v. 19-20, p. 100103, 2020.
- ARISI, M. et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) for the Treatment of Actinic Keratosis and Skin Field Cancerization: Clinical and High-Frequency Ultrasound Evaluation”. **Dermatology and Therapy**, v. 11, n. 3, p. 855–866, 2021.
- BERTONE, E. R.; SNYDER, L. A.; MOORE, A. S. Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 557-562, 2003.
- BILGIC, O. et al. Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinical Manifestations and Literature Review. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 32, n. 1, p. 30–40, 2015.
- BINENBAUM, Y. et al. Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma. **PLoS One**, vol. 12, n. 1, p. e0169457, 2017.
- CHEN, Z. et al. A Novel Micro Cold Atmospheric Plasma Device for Glioblastoma Both In Vitro and In Vivo. **Cancers**, v. 9, n. 12, p. 61-76, 2017.
- CHENG, F. et al. Cold Plasma with Immunomodulatory Properties Has Significant Anti-Lymphoma Activities in Vitro and In Vivo. **Blood**, v. 134, n. 1, p. 5307, 2019.
- CREZEE, J. et al. Hyperthermia-Based Anti-Cancer Treatments. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1240, 2021.
- DAI, X. et al. The emerging role of gas plasma in oncotherapy. **Trends in Biotechnology**, v.36, n.11, p.1183-1198, 2018.
- DAESCHLEIN, G. et al. Treatment of Recalcitrant Actinic Keratosis (AK) of the Scalp by Cold Atmospheric Plasma. **Cogent Medicine**, v. 4, n. 1, p. 1412903, 2017.

DOOLEY, T. P. et al. Biomarkers of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma from Tissues and Cell Lines Identified by DNA Microarrays and QRT-PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, n. 4, p. 1026-1036, 2003.

DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N.; SCHNEIDER, R. Sunlight Exposure and Risk of Developing Cutaneous and Oral Squamous Cell Carcinomas in White Cats. **Journal of the National Cancer Institute**, p. 1073-1078, 1971.

DUCHESNE, C. et al. Cold Atmospheric Plasma Modulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Signalling and Enhances Burn Wound Neovascularisation. **The Journal of Pathology**, v. 249, n. 3, p. 368–380, 2019.

ERMAKOV, A. M. et al. Dose-Dependent Effects of Cold Atmospheric Argon Plasma on the Mesenchymal Stem and Osteosarcoma Cells In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6797, 2021.

FLICKINGER, I. et al.. Evaluation of long-term outcome and prognostic factors of feline squamous cell carcinomas treated with photodynamic therapy using liposomal phosphorylated meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine. **Journal Of Feline Medicine And Surgery**, v. 20, n. 12, p. 1100-1104, 2018.

FOFANA, M. et al. Selective Treatments of Prostate Tumor Cells with a Cold Atmospheric Plasma Jet. **Clinical Plasma Medicine**, v. 17–18, p. 100098, 2020.

FRIEDMAN, P. C. et al. Successful Treatment of Actinic Keratoses Using Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma: A Case Series. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 2, p. 349–350, 2017.

GAO, S. et al. Local Hyperthermia in Head and Neck Cancer: Mechanism, Application and Advance. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 57367–57378, 2016.

GASYMOVA, E. et al.. Retrospective clinical study on outcome in cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with an accelerated radiation protocol. **Bmc Veterinary Research**, v. 13, n. 1, 2017.

GAY-MIMBRERA, J. et al. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. **Advances In Therapy**, v. 33, n. 6, p. 894-909, 2016.

GIBSON, A. R. et al. Interactions of a Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Effluent with PC-3 Prostate Cancer Cells: Interactions of a Non-Thermal Atmospheric Pressure e Plasma Effluent with PC-3 Prostate Cancer Cells. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 12, p. 1142–1149, 2014.

GJIKA, E. et al. Adaptation of Operational Parameters of Cold Atmospheric Plasma for in Vitro Treatment of Cancer Cells. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 11, p. 9269-9279, 2018.

GOLDSCHMIDT, M. H.; GOLDSCHMIDT, K. H.. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: MEUTEN, Donald J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2017. Cap. 4, p. 88-141. Ebook

GRAVES, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 45, n. 26, p. 263001, 2012.

GUERRERO-PRESTON, R. et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Selectively Targets Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v.. 34, n. 4, p. 941–946, 2014.

HUTSON, C. A. et al. Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: seven cases (1987-1989). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 5, p. 777-781, 1992.

KARKI, S. B. et al. Miniature Non-Thermal Plasma Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Lung Carcinoma Cells. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, v. 40, n. 11, p. 99-117, 2020.

KIM, P. K. M., et al. The Regulatory Role of Nitric Oxide in Apoptosis. *International Immunopharmacology*, v. 1, n. 8, p. 1421–1441, 2001.

KIM, S. J.; CHUNG, T. H. Cold Atmospheric Plasma Jet-Generated RONS and Their Selective Effects on Normal and Carcinoma Cells. *Scientific Reports*, v.6, n.1, p. 20332, 2016.

KRAMER, A. et al. Suitability of Tissue Tolerable Plasmas (TTP) for the Management of Chronic Wounds. *Clinical Plasma Medicine*, v. 1, n. 1, p. 11–18, 2013.

LAROUSSE, M. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. *Frontiers in Physics*, v.8, n.74, 2020.

LEE, J. et al. Anticancer Effects of Cold Atmospheric Plasma in Canine Osteosarcoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 4556, 2020.

LEE, J. et al. Selective Killing Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma with NO Induced Dysfunction of Epidermal Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, v. 11, n. 2, p. e0150279, 2016.

LIN, A. et al. Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. *Plasma Processes And Polymers*, v. 12, n. 12, p. 1392-1399, 2015.

LINO, M. et al. Prognostic Factors for Cats with Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum Following High-Dose Rate Brachytherapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 21, n. 12, p. 1157–1164, 2019.

LIPTAK, J. M. Cancer of the Gastrointestinal Tract. In: VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. *Small Animal Clinical Oncology*. 8. ed. St. Louis: Elsevier., 2020. Cap. 23, p. 432-491. Ebook

MARCONATO, L. et al. Multimodal Therapeutic Approach and Interdisciplinary Challenge for the Treatment of Unresectable Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Six Cats: A Pilot Study: Multimodal Treatment for Feline Head and Neck Squamous Carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 2, p. 101- 112, 2013.

MASSARI, F. et al.. Lip-to-nose flap for reconstruction of the nasal planum after curative intent excision of squamous cell carcinoma in cats: description of technique and outcome in seven cases. : Description of technique and outcome in seven cases. **Veterinary Surgery**, v. 49, n. 2, p. 339-346, 2019.

METELMANN, H. et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. **Clinical Plasma Medicine**, v. 9, p.6-13, 2018.

METELMANN, H. et al. Head and neck cancer treatment and physical plasma. **Clinical Plasma Medicine**, v. 3, n. 1, p. 17-23, 2015.

MILLER, M. A. et al. Cutaneous Neoplasia in 340 Cats. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 5, p. 389–395, 1991.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Skin. In: MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small Animal Oncology**. Iowa: Blackwell Science, 2001. Cap. 4, p. 50-68.

MURPHY, S. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 5, p.401-407, 2013.

NIKFARJAM, M. et al. Mechanisms of Focal Heat Destruction of Liver Tumors. **Journal of Surgical Research**, vol. 127, n. 2, p. 208–223, 2005.

OWEN, L. N. The TNM classification of tumors in domestic animal. Geneva: World Health Organization, 1980, 53 p.

PANNINGOM, K. et al. Preferential Killing of Human Lung Cancer Cell Lines with Mitochondrial Dysfunction by Nonthermal Dielectric Barrier Discharge Plasma. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 5, p. e642, 2013.

PASQUAL-MELO, G. et al. Plasma Treatment Limits Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Development *In Vitro* and *In Vivo*. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1993, 2020.

POIRIER, V. J. et al. Efficacy and Toxicity of an Accelerated Hypofractionated Radiation Therapy Protocol in Cats With Oral Squamous Cell Carcinoma: Radiation Therapy and Feline Oral Squamous Cell Carcinoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 54, n. 1, p. 81–88, 2013.

PREISSNER, S. et al. Adjuvant antifungal therapy using tissue tolerable plasma on oral mucosa and removable dentures in oral candidiasis patients: a randomised double-blinded split-mouth pilot study. **Mycoses**, v. 59, n. 7, p. 467–475, 2016.

QUEIROZ, G. F. et al. Comparison of cryosurgery and photodynamic therapy for squamous cell carcinoma in two different populations of cats. In: 3rd World veterinary cancer congress, Foz do Iguaçu. **Proceeding of the veterinary cancer society**, 2016.

RAMIREDDY, L. et al. Induction of Apoptosis by Cold Atmospheric Pressure Plasma for Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. **Plasma Medicine**, v. 8, n. 4, p. 411-418, 2018.

RATOVITSKI, E. A. et al. Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 12, p. 1128–1137, 2014.

ROSSMANNA, C. HAEMMERICH, D. Review of Temperature Dependence of Thermal Properties, Dielectric Properties, and Perfusion of Biological Tissues at Hyperthermic and Ablation Temperatures. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 42, n. 6, p. 467–92, 2014.

SAADATI, F., MAHDIKIA, H., ABBASZADEH, H. et al. Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. **Scientific Reports**, v. 8, p. 7689, 2018.

SAMAL, S. Thermal plasma technology: the prospective future in material processing: The prospective future in material processing. **Journal Of Cleaner Production**, v. 142, p. 3131-3150, 2017.

SCHNEIDER, C. et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Inhibits Growth in Colorectal Cancer Cells. **Biological Chemistry**, v. 400, n. 1, p. 111-122, 2018.

SCHUSTER, M. et al. Visible Tumor Surface Response to Physical Plasma and Apoptotic Cell Kill in Head and Neck Cancer. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 9, p. 1445–1452, 2016.

SEMMLER, M. L. et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 269-287, 2020.

SEO, H. Y. et al. Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air- or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma. **PLoS One**, v.9, n.11, p. e113477, 2014.

SOLTERO-RIVERA, M. M., et al. Prevalence of Regional and Distant Metastasis in Cats with Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma: 49 Cases (2005–2011). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 2, p. 164-169, 2014.

TANDON, P. et al. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural Health Care Centre in Loni, Maharashtra – a retrospective 10-year study. **Współczesna Onkologia**, v. 2, p. 178-183, 2017.

TAVARES-DA-SILVA, E. et al. Cold Atmospheric Plasma, a Novel Approach against Bladder Cancer, with Higher Sensitivity for the High-Grade Cell Line. **Biology**, v. 10, n. 1, p. 41, 2021.

TORNIN, J. et al. Pyruvate Plays a Main Role in the Antitumoral Selectivity of Cold Atmospheric Plasma in Osteosarcoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1068, 2019.

TOZON, N. et al.. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. : an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. **Journal Of Feline Medicine And Surgery**, v. 16, n. 4, p. 291-299, 2013.

ULRICH, C. et al. Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study. **Journal of Wound Care**, v. 24, n. 5, p. 198-200, 2015.

VAHORA, H. et al. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n.1, p. 1–12, 2016.

VAN LOENHOUT, J. et al. Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1597, 2019.

WANG, L. et al. The Inhibition Effect of Cold Atmospheric Plasma-Activated Media in Cutaneous Squamous Carcinoma Cells. **Future Oncology**, v. 15, n. 5, p. 495–505, 2019.

WANG, M. et al. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. e73741, 2013.

WEISS, M. et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0130350, 2015.

WELTMANN, K. et al. The future for plasma science and technology. **Plasma Processes And Polymers**, v. 16, n. 1, p. e1800118, 2018.

WELZ, C. et al. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0141827, 2015.

WIRTZ, M. et al. Actinic Keratoses Treated with Cold Atmospheric Plasma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 1, p. 37–39, 2018.

WYPIJ, J. M. A Naturally Occurring Feline Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Pathology Research International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

XIA, J. et al. Cold Atmospheric Plasma Induces Apoptosis of Melanoma Cells via Sestrin2-Mediated Nitric Oxide Synthase Signaling. **Journal of Biophotonics**, v. 12, n. 1, p. e201800046, 2019..

XU, H. Y. et al. Association between Ankylosing Spondylitis and the MiR-146a and MiR-499 Polymorphisms. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0122055, 2015.

YAN, D.; SHERMAN, J. H.; KEIDAR, M. Cold Atmospheric Plasma, a Novel Promising Anti-Cancer Treatment Modality. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15977–15995, 2017.

YAN, D. et al. On the Selective Killing of Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment: Status and Beyond. **Plasma Processes and Polymers**, v. 18, n. 10, p. 2100020, 2021.

YAN, X. et al. Plasma-Induced Death of HepG2 Cancer Cells: Intracellular Effects of Reactive Species. **Plasma Processes and Polymers**, v. 9, n. 1, p. 59–66, 2012.

YUSUPOV, M. et al. Atomic scale simulation of H₂O₂ permeation through aquaporin: toward the understanding of plasma cancer treatment. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 51, n. 12, p. 125401, 2018.

ZHOU, L. et al. Effects of Nitric Oxide on the Biological Behavior of HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1875–1880, 2016.

CAPITULO I - USO DO PLASMA NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS: ESTUDO *IN VITRO* E APLICAÇÃO CLÍNICA EM TUMORES FELINOS

RESUMO

Objetivos: O plasma frio atmosférico (PFA) tem apresentado resultados promissores contra o carcinoma de células escamosas (CCE) *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a sua aplicabilidade para tumores felinos é desconhecida. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos anticancerígenos do PFA sobre linhagem celular de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) e contra o CCE felino cutâneo e oral. **Métodos:** Linhagem celular de CCECP (SCC-25) foi dividida em grupo controle e tratamento, ao qual foi exposto ao PFA por 60s, 90s ou 120s. As células foram submetidas ao ensaio de oxidação nítrica, ensaio de MTT e análise termográfica *in vitro*. A aplicação clínica foi realizada em felino com SCC cutâneo (n=2) e oral (n=1). As lesões foram tratadas e avaliadas por exame termográfico, histopatológico e imunoistoquímico. **Resultados:** O tratamento das células SCC-25 com plasma por 90s e 120s resultou em aumento significativo da concentração de nítrito. Foi observada redução de viabilidade celular decorridas 24h e 48h, independente do tempo de exposição. Entretanto, em 72h o efeito foi significativo apenas com o tratamento de 120s. *In vitro*, a temperatura reduziu com todos os tempos de exposição ao PFA. *In vivo*, o tratamento induziu leve aumento de temperatura média (0.7 °C). Os dois tumores cutâneos responderam ao tratamento, sendo uma resposta completa, com cura histológica, e outra parcial. O CCE oral permaneceu estável. Ambos os tumores remanescentes apresentaram o surgimento de áreas em apoptose. Houve aumento da expressão de caspase-3 e TNF-alfa. Os efeitos adversos foram leves e limitados a eritema e formação de crostas. **Conclusões e relevância:** O PFA apresenta efeito anticancerígeno *in vitro* contra o CCECP. Para o CCE cutâneo felino, a terapia parece segura e eficaz. Entretanto, para tumores orais proliferativos, a utilização do plasma de forma direta e isolada pode ter eficácia limitada.

Palavras-chave: Oncologia. Câncer. Gato. Plasma não térmico.

CHAPTER I - USE OF PLASMA IN THE TREATMENT OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA: *IN VITRO* STUDY AND CLINICAL APPLICATION IN FELINE TUMORS

ABSTRACT

Aims: Cold atmospheric plasma (CAP) has shown promising results against squamous cell carcinoma (SCC) *in vitro* and *in vivo*. However, its applicability to feline tumors is unknown. The aim of this study was to evaluate the anticancer effects of CAP on head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line and against cutaneous and oral feline SCC. **Methods:** HNSCC cell line (SCC-25) was divided into control and treatment groups, which were exposed to CAP for 60s, 90s or 120s. Cells were subjected to nitric oxidation assay, MTT assay and *in vitro* thermographic analysis. Clinical application was performed in a feline with cutaneous (n=2) and oral (n=1) SCC. The lesions were treated and evaluated by thermographic, histopathological and immunohistochemical tests. **Results:** Treatment of SCC-25 cells with plasma for 90s and 120s resulted in a significant increase in nitrite concentration. A reduction of cell viability was observed after 24h and 48h, regardless of the exposure time. However, at 72h there was a significant effect only with the treatment of 120s. *In vitro*, temperature reduced with all times of exposure to CAP. *In vivo*, the treatment induced a slight increase in mean temperature (0.7 °C). Both skin tumors responded to treatment, presenting a complete response, with histological cure, and a partial response. Oral SCC remained stable. Both remaining tumors showed the appearance of areas in apoptosis. Expression of caspase-3 and TNF-alpha was increased. Adverse effects were mild and limited to erythema and crusting. **Conclusions and relevance:** CAP showed an *in vitro* anticancer effect on HNSCC cell lines, as evidenced by the dose-dependent reduction in cell viability. *In vivo*, the therapy appears safe and effective against feline cutaneous SCC. For proliferative oral tumors, treatment did not result in a clinical response. However, there was a biological effect, demonstrated by the higher expression of apoptosis indicators.

Keywords: Oncology. Cancer. Cat. Non thermal plasma.

Introdução

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor maligno originado do epitélio escamoso [1]. As células escamosas formam a maior parte da pele, leito ungueal e coxins, bem como revestem a cavidade oral e o esôfago [1]. Assim como para os humanos [2,3], o CCE representa um dos principais tumores cutâneos [4] e a grande maioria das neoplasias orais em gatos [5].

O CCE felino e humano compartilham uma série de similaridades, incluindo fatores de risco, comportamento biológico, terapia e prognóstico. Em pele, eles são especialmente relacionados com a exposição solar crônica (radiação UV), mais precisamente a radiação ultravioleta B [6]. Para o CCE oral, um dos principais fatores de risco é o contato com a fumaça do cigarro [7]. Ambas as formas apresentam comportamento local invasivo, com maiores taxas de metástases para os tumores orais [8,9], os quais estão associados a um pior prognóstico [10].

O comportamento invasivo do CCE exige a adoção de terapias locais adequadas. Embora a excisão cirúrgica seja o tratamento com as melhores taxas de sucesso para gatos com CCE cutâneo, a depender da área acometida, a reconstrução pode ser desafiadora e o resultado estético pode desagradar aos tutores [1]. Para a forma oral, abordagens multimodais associadas à cirurgia apresentam maiores chances de êxito [11]. Entretanto, não é incomum que esses tumores sejam inoperáveis ao diagnóstico, tornando o manejo laborioso [5]. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas ou complementares para o CCE felino.

O plasma frio atmosférico (PFA) tem se mostrado uma terapia promissora para o câncer [12, 13]. Ele é produzido em temperaturas abaixo de 40 ° C sob pressão atmosférica, possibilitando sua aplicação terapêutica segura em animais e humanos [14]. As vantagens da

sua utilização incluem: baixo custo, rapidez, fácil manuseio e seletividade para células neoplásicas. Além disso, pode ser uma alternativa aos tratamentos convencionais, que apresentam maiores custos e efeitos colaterais aos tecidos saudáveis, muitas vezes com resultados insatisfatórios [15, 16].

Estudos *in vitro* tem demonstrado que o PFA apresenta efeitos contra uma ampla variedade de neoplasias incluindo: CCE de cabeça e pescoço [17], CCE cutâneo [18], osteossarcoma [19], câncer de pulmão [20], linfoma [21], câncer de pâncreas [22], câncer de próstata [23], câncer colorretal [24] e câncer de mama [25].

Pesquisas clínicas com uso do plasma ainda são incipientes, mas apontam para resultados promissores. Pacientes humanos com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) avançado foram beneficiados pelo tratamento, apresentando redução de dor e carga microbiana em leito tumoral, bem como remissão parcial da neoplasia em alguns casos [26, 27].

Para animais com câncer, não existem relatos da aplicação clínica do PFA. Devido à similaridade entre gatos e humanos quanto ao comportamento biológico, manifestação clínica, terapia e prognóstico do CCECP, o objetivo foi investigar os efeitos anticancerígenos do PFA sobre linhagem celular de carcinoma de cabeça e pescoço e contra o CCE felino cutâneo e oral.

Material e métodos

Cultura celular

Cultura de células de carcinoma escamoso de língua humana, linhagem SCC-25 (ATCC, Manassas, VA, USA), foram mantidas em meio de Eagle modificado 1:1 por Dulbecco e meio N-F12 de Ham (DMEN - F12) contendo 1,2 g / L de bicarbonato de sódio,

2,5 mM L-glutamina, 15 mM HEPES e 0,5 mM piruvato de sódio, suplementado com 400 ng / mL de hidrocortisona, 10% de soro fetal bovino e adicionado 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera composta por 5% de dióxido de carbono (CO₂), à temperatura de 37°C.

Tratamento in vitro

A linhagem celular foi dividida em dois grupos, o grupo I (controle) consistiu em células que não receberam nenhum tratamento. No grupo II, as células foram tratadas com PFA durante 60s, 90s ou 120s a uma distância de 20 mm, medida do líquido contendo as células até a ponta do dispositivo. O jato de plasma a pressão atmosférica fria tinha hélio de alta pureza (99,99%) como gás de trabalho a um fluxo de 2 L/min e potência de 2,4 W.

Ensaio de oxidação nítrica

Realizou-se o ensaio de oxidação nítrica através da determinação da concentração de nitrito (NO₂⁻). Foi utilizado um kit comercial (Griess Reagent Kit for Nitrite Determination, Invitrogen, Waltham, MA, USA) e seguidas às instruções do fabricante. Resumidamente, 100 µL do reagente foram adicionadas em placas de 96 poços, em quintuplicata. Cada poço continha 200 µL de meio de cultura e uma concentração celular de 3×10^4 . A mistura foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. Por fim, a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

Ensaio MTT

O ensaio MTT foi realizado com células (5×10^3 células / poço) cultivadas em placas de 96 poços, em quintuplicata. Análises foram realizadas decorridas 24h, 48h e 72h. O meio de cultura foi removido dos poços e substituído por 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-solução de brometo de difenil-tetrazólio (MTT, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), diluído em meio de

cultura na proporção de 1:10. O tempo de incubação foi de 4 horas, até o MTT ser reduzido a cristais de formazan a uma temperatura de 25 ° C em incubadora composta por 5% de CO₂. Após a incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em 1 ml de etanol P.A. (Reagente ACS \geq 99,5%) e mantidos por 15 minutos sob agitação constante. Por fim, 100 μ L da solução foram transferidos para placas de 96 poços, nas quais a densidade óptica dos cristais de formazan foi quantificada por espectrofotometria de absorvância a 570 nm e 600 nm em um leitor de placas múltiplas (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). A viabilidade celular foi verificada como a razão entre a absorvância das células de CCE tratadas com PFA e as que não foram tratadas.

Termografia in vitro

A temperatura do meio de cultura foi mensurada por uma câmera termográfica modelo b60 (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA), calibrada para emissividade de 0.98. As imagens foram capturadas a uma distância de 10 cm do meio de cultura antes e após os diferentes tempos de exposição ao plasma, em octuplicata.

Aplicação clínica

O estudo clínico foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido sob o parecer 13/2020 (Anexo A). O paciente foi incluído no estudo após o tutor assinar o termo consentimento livre e esclarecido (Apêndice A)

Um felino de pelagem branca, macho, seis anos, sem raça definida e pesando 3.8 kg foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O paciente foi submetido a exame clínico e foram identificadas três lesões faciais. Duas eram cutâneas, localizadas no canto medial do olho direito (0.6 x 0.6 cm) e em plano nasal (1.5 x 1.6 cm), enquanto a outra era situada em lábio inferior (1.4 x 1.6 x 0.6 cm). Foram realizados

hemograma, bioquímicas séricas, radiografia de tórax e crânio, bem como ultrassonografia abdominal para estadiamento. Não foram visualizados indícios de metástase ou invasão óssea. Os tumores foram submetidos à biópsia incisional e exame histopatológico, confirmando a suspeita de CCE cutâneo e oral. O diagnóstico foi acordado por dois veterinários patologistas, D. A. V e I. L. B.

Os tumores foram tratados por dois ciclos de PFA. Cada ciclo foi composto de três aplicações semanais de plasma, seguido por uma semana sem exposição. A área do tumor e uma margem de 5 mm com tecido aparentemente saudável foram varridas em modo contínuo por 1 min/cm² a uma distância de aproximadamente 8 mm . O plasma foi gerado com gás hélio, a um fluxo de 2 L/ min e potência de 2,4 W. O paciente foi sedado em todas as sessões de tratamento. A pré-medicação foi realizada com acepromazina (0.03 mg/kg IM) e butorfanol (0.03 mg /kg IM). Após 15 minutos, propofol (2 mg/kg IV) foi administrado em dose-efeito.

Termografias foram realizadas antes e após o tratamento dos tumores. As imagens foram capturadas por uma câmera modelo FLIR SC620 (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA). A tricotomia foi realizada 15 minutos antes e a câmera foi posicionada a uma distância de 50 cm da face do animal. As imagens foram analisadas no software Flir Tools (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA). A emissividade adotada foi de 0.98.

A resposta à terapia [28] e os efeitos adversos [29] foram avaliados e registrados de acordo com os critérios estabelecidos pelo grupo de oncologia cooperativa veterinária. Tumores em doença estável ou resposta parcial foram submetidos à análise histopatológica e imunohistoquímica, sendo realizada análise comparativa com as amostras pré-tratamento.

A imunomarcagem foi realizada em secções de 4 µm dos tecidos embebidos em parafina, usando a técnica do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase com anticorpo

primário monoclonal anti caspase-3 (74T2, 1:100, Invitrogen) e policlonal anti TNF-alfa (PA1079, 1:100, Boster). O cromógeno utilizado para visualização foi 3,3-diaminobenzidina. A análise foi realizada como descrita previamente [30], categorizando a reação como (–) sem marcação nas células; (1+), 10–20% de células positivas; (2+), <50% de células positivas; e (3+), >50% de células positivas. A intensidade da marcação foi classificada como leve, moderada e acentuada.

Estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal para o ensaio de MTT e termografia *in vitro*. Assim, estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Para o ensaio de oxidação nítrica foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Foram considerados significativos valores de $p < 0.05$. As análises foram realizadas no software Prism 9 (GraphPad, versão 9.0.0, San Diego, CA, USA).

Resultados

Concentração de nitrito

Foi verificado aumento significativo de nitrito no meio de cultura contendo as células SCC-25 tratadas com PFA durante 90s e 120s em relação ao grupo controle (Figura 1).

Viabilidade celular

Foi observada redução significativa de viabilidade das células SCC-25 decorridas 24 e 48h do tratamento, independente do tempo de exposição. Para avaliação em 72h, o efeito foi significativo apenas com o tratamento de 120 segundos (Figura 2).

Impacto térmico do CAP

A temperatura média reduziu significativamente com a exposição das células SCC-25 ao plasma em todos os tempos avaliados (Figura 3).

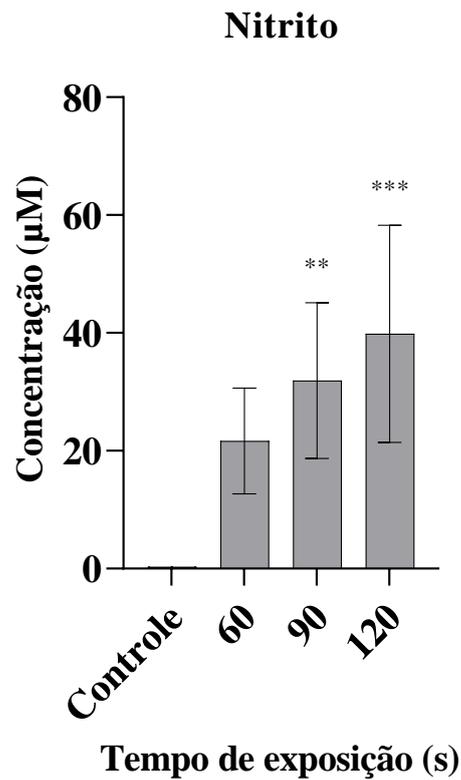


Figura 1. Concentração de nitrito no meio de cultura contendo células SCC-25 tratadas com PFA por diferentes tempos de exposição. Os dados são apresentados como média \pm SD. Diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle são demonstradas no gráfico da seguinte forma, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

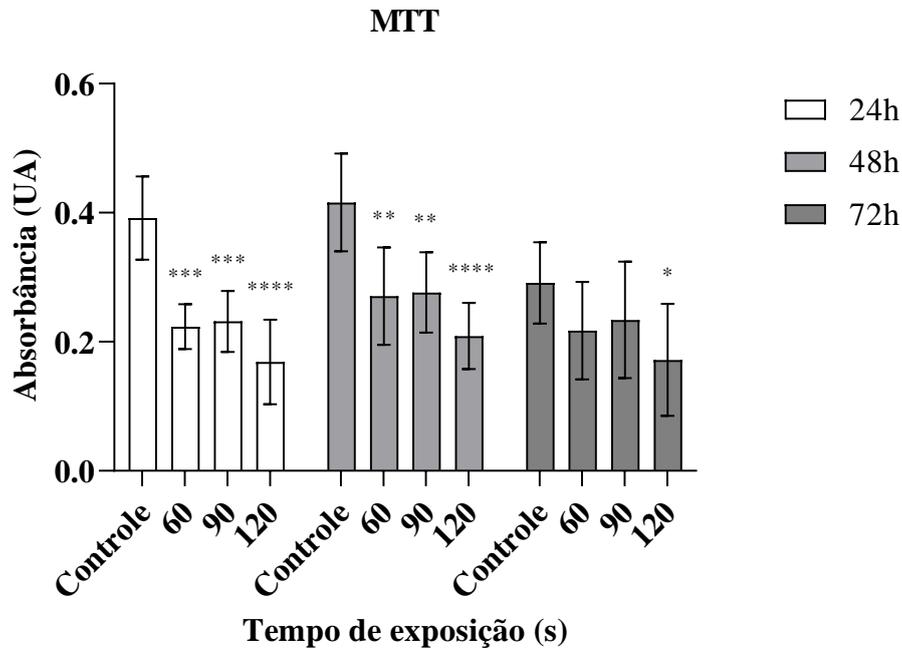


Figura 2. Viabilidade das células SCC-25 após diferentes tempos de exposição ao PFA. Os dados são apresentados como média \pm DP. UA = unidades arbitrárias. Diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle são demonstradas no gráfico da seguinte forma, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

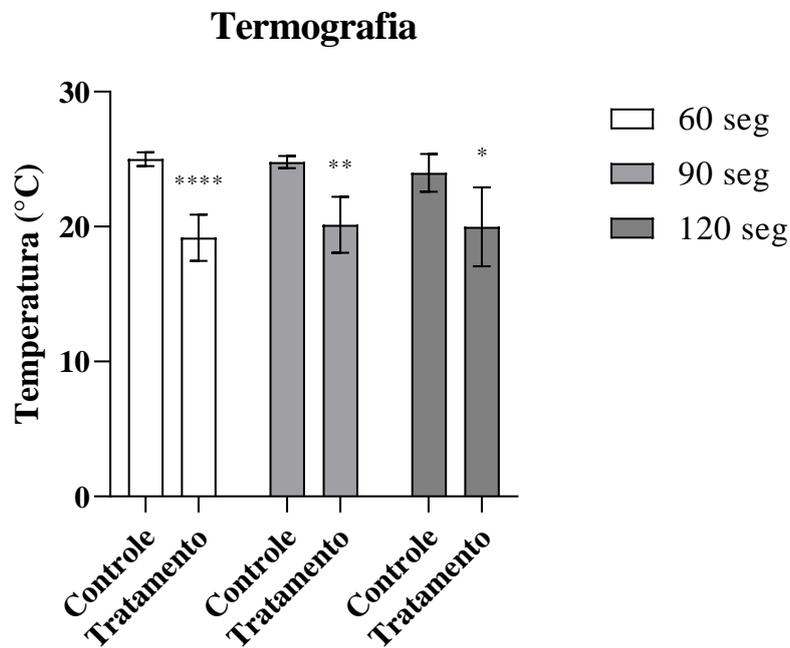


Figura 3. Termografia do meio de cultura contendo células SCC-25 tratadas com PFA por diferentes tempos de exposição. Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle são demonstradas no gráfico da seguinte forma, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Resultados clínicos

A termografia evidenciou leve aumento de temperatura para o CCE em plano nasal (35.8 °C vs. 36.3 °C), em canto medial do olho (35.6°C vs. 36.1°C) e oral (33.6°C vs. 34.9°C) (Figura 4). A média de temperatura pré-tratamento foi de 35°C ± 1.2° e no pós-tratamento foi de 35.7°C ± 0.7°.

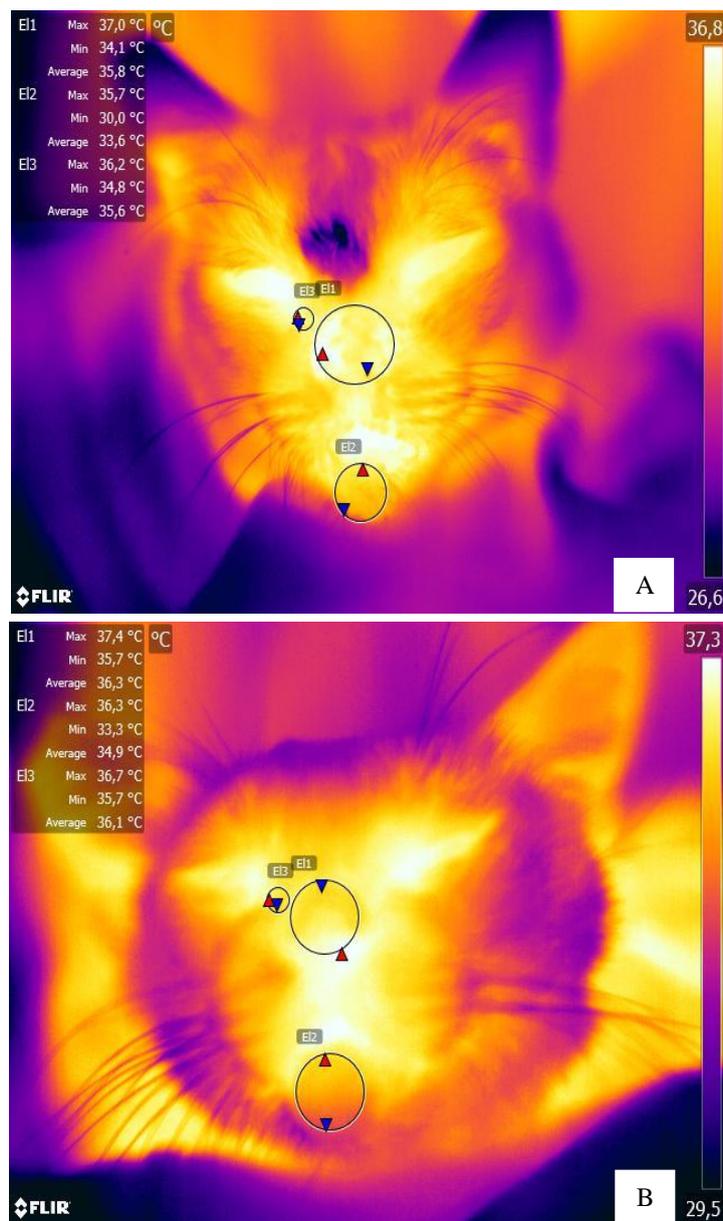


Figura 4. Termografia pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) dos tumores com PFA, evidenciando leve aumento de temperatura.

O tratamento resultou em resposta completa para o CCE em canto medial do olho e resposta parcial para o CCE em plano nasal (0.7 x 0.7 cm), enquanto O CCE labial (1.6 x 1.5 x 0.8 cm) permaneceu estável (Figura 5). A biópsia pós-tratamento indicou a cura do tumor em canto do olho e a presença de áreas em apoptose nos tumores remanescentes (Figura 6). Houve aumento do percentual de células marcadas ou da intensidade de expressão para caspase-3 e TNF-alfa na neoplasia cutânea (figura 7) e oral (figura 8). Os efeitos adversos foram locais e incluíram eritema e formação de crostas. As reações foram em grau I, autolimitantes e não exigiram intervenção médica (Figura 9).

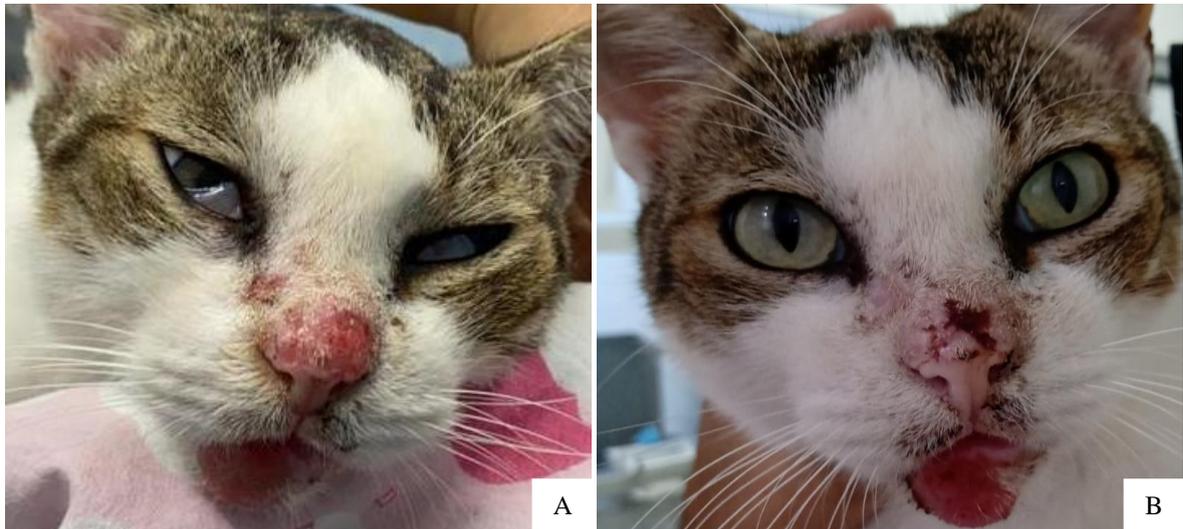


Figura 5. Aspecto do paciente felino imediatamente antes da primeira sessão com PFA (A) e 21 dias após o término do segundo ciclo de terapia (B).

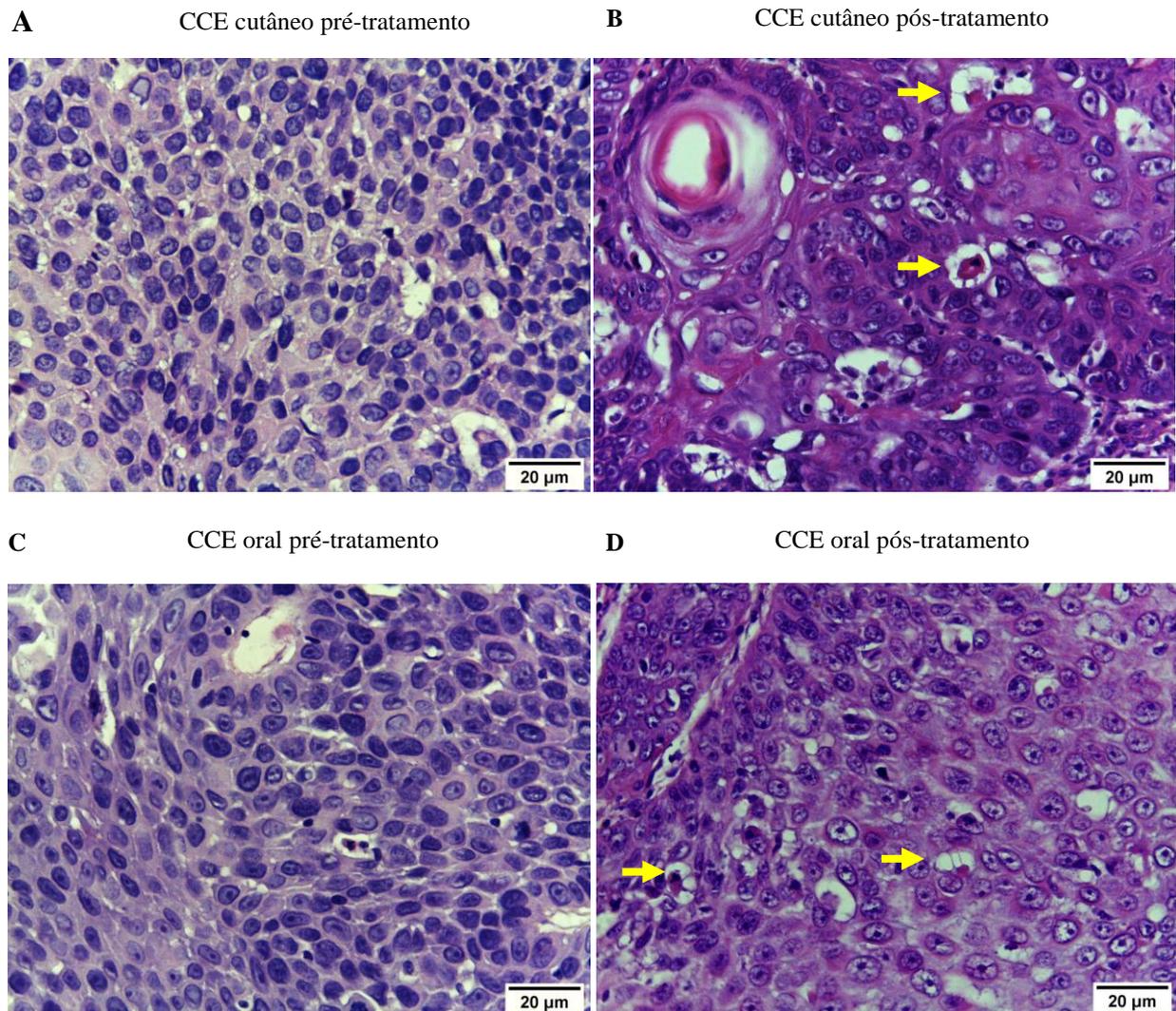


Figura 6. Avaliação histopatológica de secções do CCE felino cutâneo (A-B) e oral (C-D) coradas por hematoxilina e eosina (H&E) 400x. O tratamento com PFA resultou no surgimento de áreas em apoptose (setas). As células indicadas apresentam núcleo picnótico, cariólise, citoplasma hipereosinofílico e contração celular.

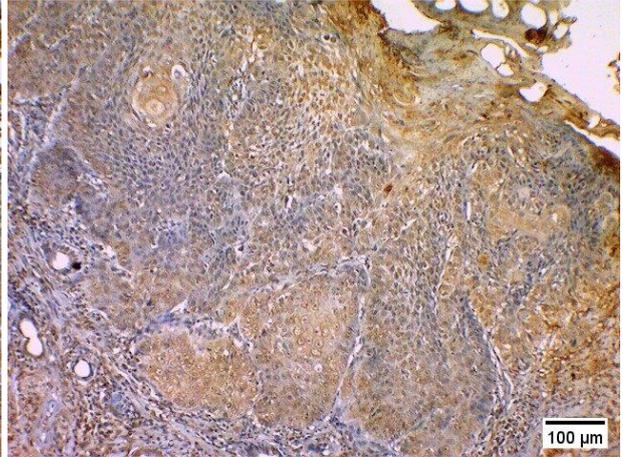
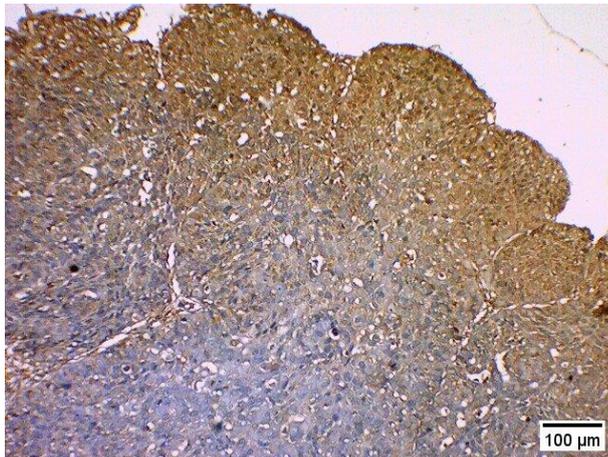
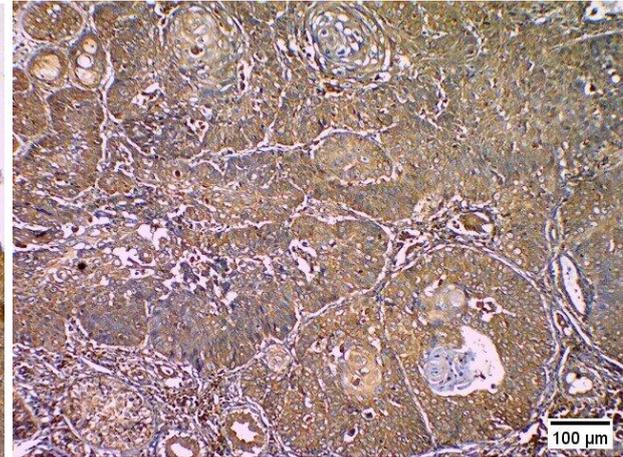
A CCE cutâneo pré-tratamento (Caspase-3)**B** CCE cutâneo pós-tratamento (Caspase-3)**C** CCE cutâneo pré-tratamento (TNF-alfa)**D** CCE cutâneo pós-tratamento (TNF-alfa)

Figura 7. Expressão imunohistoquímica de caspase-3 (A-B) e TNF-alfa (C-D) no CCE cutâneo (100x). Pré-tratamento (*caspase 3*: 2+ moderado; *TNF-alfa*: 2+ acentuado). Pós-tratamento (*capase 3*: 2+ acentuado; *TNF-alfa*: 3+ acentuado).

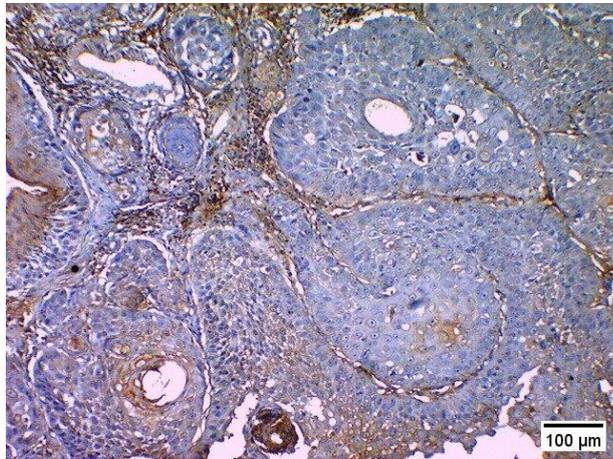
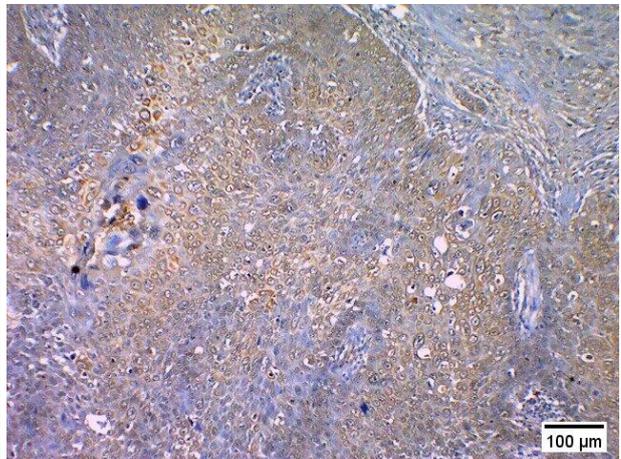
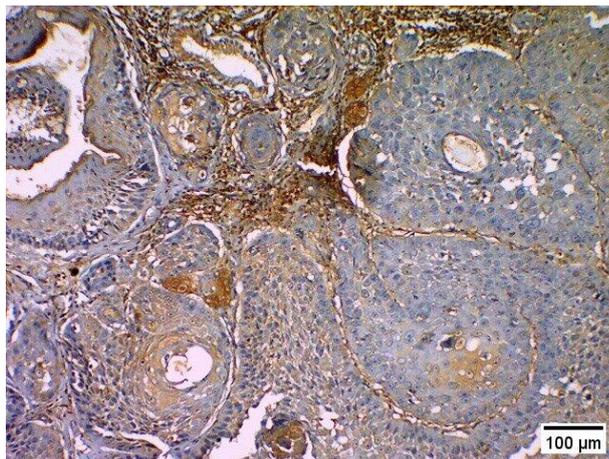
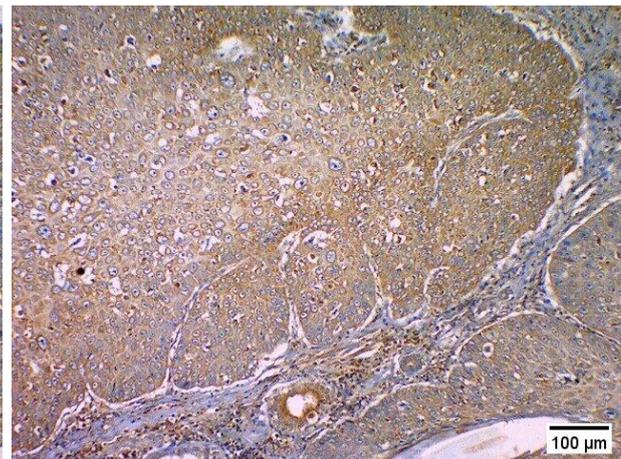
A CCE oral pré-tratamento (Caspase-3)**B** CCE oral pós-tratamento (Caspase-3)**C** CCE oral pré-tratamento (TNF-alfa)**D** CCE oral pós-tratamento (TNF-alfa)

Figura 8. Expressão imunohistoquímica de caspase-3 (A-B) e TNF-alfa (C-D) no CCE oral (100x). Pré-tratamento (*caspase 3*: 1+ leve; *TNF-alfa*: 2+ leve). Pós-tratamento (*capase 3*: 2+ leve; *TNF-alfa*: 3+ moderado).

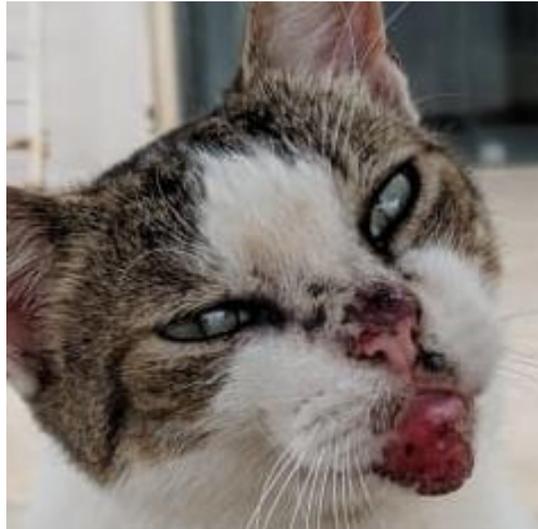


Figura 9. Aspecto do paciente felino durante o segundo ciclo de terapia com PFA, evidenciando a presença de eritema e crostas em áreas tumorais.

Discussão

O presente estudo avaliou a produção de óxido nítrico, impacto na viabilidade celular e efeito térmico do PFA em linhagem de carcinoma de cabeça e pescoço. Ao mesmo tempo, foi realizado o tratamento pioneiro com plasma contra o CCE felino cutâneo e oral. Em nosso conhecimento, o único estudo prévio aplicando o PFA à oncologia animal foi conduzido em linhagem celular de osteossarcoma canino [31].

O potencial anticancerígeno do plasma é atribuído principalmente à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) [32]. As ERONs se difundem para o meio intracelular e desencadeiam senescência, apoptose ou necrose dose-dependente [13]. Entre as ERONs produzidas pelo plasma, o óxido nítrico (NO) apresenta interesse especial devido ao seu importante papel na proliferação e morte celular [33]. Em doses elevadas, ele é reconhecido como molécula anticancerígena pela capacidade de promover estresse oxidativo, dano ao DNA, citotoxicidade e apoptose [34, 35].

O óxido nítrico foi avaliado nesse estudo pela mensuração de nitrito, pois em líquidos, o NO é convertido em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Por reação enzimática, o nitrato pode ser reduzido a nitrito, que é quantificado pelo ensaio de Griess. Dessa forma, a concentração de NO_2^- mensurada após administração do plasma está associada a um valor aproximado de óxido nítrico [36].

Verificamos que a concentração de nitrito aumentou significativamente após a exposição das células cancerígenas ao PFA por 90s e 120s, quando comparado ao grupo controle. Resultados similares de acúmulo de óxido nítrico após exposição de células cancerígenas ao plasma foram reportados anteriormente e associados com a geração de estresse oxidativo e consequente apoptose para o melanoma [37], câncer de próstata [38] e câncer de pulmão [39]. Assim, inferimos que o efeito anticancerígeno do plasma pode estar relacionado ao aumento da concentração de óxido nítrico no meio de cultura.

Nesse estudo, a citotoxicidade do PFA foi avaliada pelo ensaio MTT, que detecta alterações na viabilidade celular com base na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase [40]. A partir da redução do número de células metabolicamente ativas, verificamos que o plasma exerceu efeito anticancerígeno decorridas 24h e 48h da exposição por 60s, 90s e 120s. Entretanto, em 72h, os resultados só foram significativos com a exposição das células por 120s. Tal resultado reforça o efeito anticancerígeno dose-dependente do PFA, corroborando com estudos prévios [17, 40].

O efeito térmico do PFA foi avaliado *in vitro* e *in vivo*. Sabe-se que a produção de calor pode ser utilizada como modalidade terapêutica para o câncer através da hipertermia local ou ablação térmica [41]. No primeiro caso, a temperatura deve ser mantida entre 40 – 43°C por aproximadamente uma hora [42], resultando em inibição de reparo do DNA, hipóxia, resposta imune antitumoral e apoptose [43]. Para ablação térmica são necessárias

temperaturas de 60°C, que geram necrose quase que instantaneamente [44]. No entanto, não observamos impacto térmico associado ao tratamento das células cancerígenas *in vitro*, corroborando com estudos prévios [45, 46]. Porém, verificamos uma diminuição de temperatura em todos os tempos avaliados. Em laboratório, sabe-se que as configurações do PFA podem influenciar diretamente na redução de temperatura dos alvos a partir do acréscimo do fluxo de gás, aumento de diâmetro da pluma, diminuição no ciclo de trabalho ou redução da amplitude de tensão [45]. Assim, em alguns casos a temperatura registrada pode ser inclusive menor que a do ambiente, devido à variação de entalpia do plasma [23].

Para análise *in vivo*, a termografia indicou aumento de temperatura em todos os tumores tratados. Entretanto, o acréscimo médio foi de apenas 0.7°C, e a temperatura máxima atingida durante os tratamento foi de 36.3°C. Trabalhos realizados com aplicação do plasma na pele de camundongos hígidos relataram que a temperatura de 50°C foi incapaz de causar danos térmicos à análise histológica [45]. Baseado em nossos resultados e em estudos prévios em pele de camundongos [45, 46] e humanos com úlceras do pé diabético [47], podemos afirmar que o plasma induz leve aumento de temperatura tecidual. No entanto, considerando a quantidade de calor produzido e o tempo de tratamento, podemos afirmar que o PFA é incapaz de causar dano térmico ao CCE felino.

Para pacientes humanos com ceratose actínica, lesão pré-neoplásica antecedente ao CCE, a terapia com plasma tem apresentado bons resultados [48, 49, 50, 51]. Entretanto, análises *in vivo* para o CCE cutâneo foram reportadas até o momento apenas em camundongos, evidenciando limitação de progressão das lesões [52]. Nesse estudo, o uso do PFA para o tratamento do CCE cutâneo foi promissor e resultou em resposta para todas as lesões, sendo uma completa, apresentando cura histológica, e outra parcial. Em nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo clínico a confirmar a cura histológica de um câncer utilizando o plasma como modalidade terapêutica. Sugerimos que a apresentação frequente do

CCE cutâneo como placa pode permitir uma boa interação entre o PFA e a superfície do tumor, resultando em cura ou resposta clínica principalmente em estádios iniciais. Assim, baseado em estudos prévios com o uso do plasma para CCECP humano [26,27], propomos um protocolo terapêutico para o CCE cutâneo felino.

Atualmente, um dos principais desafios para o uso clínico do PFA é a baixa capacidade de penetração das suas ERONs. Um estudo *in vivo*, apontou que o plasma é capaz de induzir apoptose para camadas de células cancerígenas em até 60 μm de profundidade [53]. Entretanto, resultados de simulações mostram que as ERONs geradas podem penetrar entre 1 a 3 mm [54]. Acreditamos que a difusão limitada das substâncias ativas derivadas do PFA pode ter restringido uma resposta terapêutica para o CCE oral. Ainda assim, foi possível observar a ocorrência de apoptose pós-tratamento em ambos os tumores remanescentes, indicando que o uso do plasma desempenhou efeito biológico.

As ERONs produzidas pelo plasma podem induzir apoptose pela via intrínseca, gerando dano ao DNA [55] ou extrínseca, mediando a liberação de TNF-alfa e ativação do receptor TNFR-1 [56]. A efetuação do processo é precedida pela ativação das caspases efetoras [57]. A caspase-3 é a executora final, sendo considerada uma forma simples e precisa para identificação de apoptose [58, 59]. Nesse estudo, verificamos que o tratamento resultou em um aumento da expressão de caspase-3 e TNF-alfa, corroborando com análises prévias [56, 60, 61]. Assim, confirmamos a predisposição para morte celular programada induzida pelo tratamento.

Em pacientes humanos com CCECP, a terapia com PFA foi bem tolerada e segura [26, 27]. Os eventos adversos incluíram dor [26, 27, 62], hemorragia, edema, sialorréia [26, 27] e necrose [27]. De forma semelhante, verificamos que o uso do PFA foi seguro para o paciente felino. Os eventos adversos, que incluíram eritema e formação de crostas foram todos em grau

I e não necessitaram de intervenção médica. Uma boa tolerância ao tratamento já era esperada, pois diferentemente da quimioterapia e radioterapia, o plasma exibe seletividade para células neoplásicas [63]. Os mecanismos envolvidos são a maior vulnerabilidade das células cancerígenas ao estresse oxidativo e a larga proporção de aquaporinas e menor quantidade de colesterol na membrana celular, que contribui para melhor difusão de certas ERONs geradas pelo PFA [63, 64, 65].

Perspectivas futuras incluem o estudo do plasma no tratamento do CCE em um amplo número de animais e avaliação da eficácia do uso intratumoral de soluções tratadas por plasma (STPs) para formações proliferativas, visando estimular a penetração tecidual. As STPs têm demonstrando bons resultados *in vitro* contra linhagens celulares de CCECP humano [66], bem como *in vitro* e *in vivo* contra o câncer de pâncreas [67], glioblastoma [68] e câncer ovariano quimioresistente [69]. Outra possibilidade é explorar o efeito sinérgico do PFA com outras modalidades terapêuticas. Tal hipótese é baseada em estudos prévios que verificaram benefícios da sua adição para camundongos com melanoma submetidos à eletroquimioterapia [70], bem como para células de carcinoma oral humano tratadas por cisplatina [71] e células de melanoma murino tratadas por radioterapia [72] ou doxorrubicina [73].

Conclusões

O PFA apresentou efeito anticancerígeno *in vitro* sobre linhagem de células CCECP, evidenciado pela redução da viabilidade celular dose-dependente. *In vivo*, a terapia parece segura e eficaz contra o CCE cutâneo felino. Para o tumor oral proliferativo, o tratamento não resultou em resposta clínica. Entretanto, houve efeito biológico, demonstrado pela maior expressão de indicadores de apoptose. Estudos adicionais são necessários para definir o papel do PFA no tratamento de gatos com CCE.

Referências

1. Murphy S. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Cat: Current Understanding and Treatment Approaches. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 401–407. <https://doi.org/10.1177/1098612X13483238>.
2. Dooley TP et al. Biomarkers of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma from Tissues and Cell Lines Identified by DNA Microarrays and QRT-PCR. *Biochem Bioph Res Co* 2003; 306:1026–1036. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01099-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01099-4).
3. Tandon P et al. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural Health Care Centre in Loni, Maharashtra – a retrospective 10-year study. *Wspolczesna Onkol* 2017; 2: 178–183. <https://doi.org/10.5114/wo.2017.68628>.
4. Miller MA et al. Cutaneous Neoplasia in 340 Cats. *Vet Pathol* 1991; 28: 389–395. <https://doi.org/10.1177/030098589102800506>.
5. Bilgic O et al. Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinical Manifestations and Literature Review. *J Vet Dent* 2015; 32: 30–40. <https://doi.org/10.1177/089875641503200104>.
6. Dorn CR et al. Sunlight Exposure and Risk of Developing Cutaneous and Oral Squamous Cell Carcinomas in White Cats. *J Natl Cancer Inst* 1971; 46: 1073-1078. <https://doi.org/10.1093/jnci/46.5.1073>.
7. Bertone ER et al. Environmental and Lifestyle Risk Factors for Oral Squamous Cell Carcinoma in Domestic Cats. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 557–562. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02478.x>.
8. Poirier VJ et al. Efficacy and Toxicity of an Accelerated Hypofractionated Radiation Therapy Protocol in Cats With Oral Squamous Cell Carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound* 2013; 54: 81–88. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2012.01970.x>.

9. Lino M et al. Prognostic Factors for Cats with Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum Following High-Dose Rate Brachytherapy. *J Feline Med Surg* 2019; 21: 1157–1164. <https://doi.org/10.1177/1098612X18822409>.
10. Wypij JM. A Naturally Occurring Feline Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Res Int* 2013; 2013: 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/502197>.
11. Marconato L et al. Multimodal Therapeutic Approach and Interdisciplinary Challenge for the Treatment of Unresectable Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Six Cats: A Pilot Study: Multimodal Treatment for Feline Head and Neck Squamous Carcinoma. *Vet Comp Oncol* 2013; 11: 101–112. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00304.x>.
12. Dai X et al. The Emerging Role of Gas Plasma in Oncotherapy. *Trends Biotechnol.* 2018; 36: 1183–98. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.010>.
13. Semmler ML et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers* 2020; 12: 269. <https://doi.org/10.3390/cancers12020269>.
14. Gay-Mimbrera J et al. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther* 2016; 33: 894–909. <https://doi.org/10.1007/s12325-016-0338-1>.
15. Saadati F et al. Comparison of Direct and Indirect Cold Atmospheric-Pressure Plasma Methods in the B16F10 Melanoma Cancer Cells Treatment. *Sci Rep* 2018; 8: 7689. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25990-9>.
16. Dai X et al. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Controller of Cancer Cell States. *Cancers* 2020; 12: 3360. <https://doi.org/10.3390/cancers12113360>.

17. Guerrero-Preston R et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Selectively Targets Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Int J Mol Med* 2014; 34: 941–946. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1849>.
18. Wang L et al. The Inhibition Effect of Cold Atmospheric Plasma-Activated Media in Cutaneous Squamous Carcinoma Cells. *Future Oncol* 2019; vol. 15: 495–505. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0419>.
19. Tornin J et al. Pyruvate Plays a Main Role in the Antitumoral Selectivity of Cold Atmospheric Plasma in Osteosarcoma. *Sci Rep* 2019; 9: 10681. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47128-1>.
20. Karki SB et al. Miniature Non-Thermal Plasma Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Lung Carcinoma Cells. *Plasma Chem Plasma Process* 2020; 40: 99–117. <https://doi.org/10.1007/s11090-019-10037-2>.
21. Cheng F et al. Cold Plasma with Immunomodulatory Properties Has Significant Anti-Lymphoma Activities in Vitro and In Vivo. *Blood* 2019; 134: 5307–5307. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-131065>.
22. Van Loenhout J et al. Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells. *Cancers* 2019; 11: 1597. <https://doi.org/10.3390/cancers11101597>.
23. Fofana M et al. Selective Treatments of Prostate Tumor Cells with a Cold Atmospheric Plasma Jet. *Clin Plasma Med* 2020; 17-18: 100098. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2020.100098>.
24. Schneider C et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Inhibits Growth in Colorectal Cancer Cells. *Biol Chem* 2018; 400: 111–122. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0193>.

25. Wang M et al. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. *PLoS One* 2013; 8: e73741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073741>.
26. Metelmann HR et al. Head and Neck Cancer Treatment and Physical Plasma. *Clin Plasma Med* 2015; 3: 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.02.001>.
27. Metelmann HR et al. Clinical Experience with Cold Plasma in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Clin Plasma Med* 2018; 9: 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2017.09.001>.
28. LeBlanc AK et al. Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) Following Investigational Therapy in Dogs and Cats. *Vet Comp Oncol* 2021; 19: 311–352. <https://doi.org/10.1111/vco.12677>.
29. Nguyen SM et al. Response Evaluation Criteria for Solid Tumours in Dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) Consensus Document: RECIST (v1.0): A VCOG Consensus Document. *Vet Comp Oncol* 2015; 13: 176–183. <https://doi.org/10.1111/vco.12032>.
30. Cecco, BS et al. Feline Giant-Cell Pleomorphic Sarcoma: Cytologic, Histologic and Immunohistochemical Characterization. *J Feline Med Surgery* 2021; 13: 738–744. <https://doi.org/10.1177/1098612X20972667>
31. Lee J et al. Anticancer Effects of Cold Atmospheric Plasma in Canine Osteosarcoma Cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4556. <https://doi.org/10.3390/ijms21124556>.
32. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J Phys D Appl Phys* 2012; 45: 263001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/26/263001>.

33. Kim PKM et al. The Regulatory Role of Nitric Oxide in Apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1421–1441. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00088-1).
34. Vahora H et al. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. *J Cancer Prev* 2016; 21: 1–12. <https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.1.1>.
35. Zhou L et al. Effects of Nitric Oxide on the Biological Behavior of HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Ex Ther Med* 2016; 11: 1875–1880. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3128>.
36. Gibson AR et al. Interactions of a Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Effluent with PC-3 Prostate Cancer Cells: Interactions of a Non-Thermal Atmospheric Pressure e Plasma Effluent with PC-3 Prostate Cancer Cells. *Plasma Process Polym* 2014; 11: 1142–1449. <https://doi.org/10.1002/ppap.201400111>.
37. Xia J et al. Cold Atmospheric Plasma Induces Apoptosis of Melanoma Cells via Sestrin2-Mediated Nitric Oxide Synthase Signaling. *J Biophotonics* 2019; 12: e201800046. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800046>.
38. Kim SJ and Chung TH. Cold Atmospheric Plasma Jet-Generated RONS and Their Selective Effects on Normal and Carcinoma Cells. *Sci Rep* 2016; 6: 20332. <https://doi.org/10.1038/srep20332>.
39. Rai Y et al. Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition. *Sci Rep* 2018; 8: 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.
40. Pansare K et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma Jet and Gamma Radiation Treatments on Gingivobuccal Squamous Cell Carcinoma and Breast Adenocarcinoma

- Cells. Plasma Chem Plasma Process 2022; 42: 163-178.
<https://doi.org/10.1007/s11090-021-10212-4>.
41. Rossmanna C and Haemmerich D. Review of Temperature Dependence of Thermal Properties, Dielectric Properties, and Perfusion of Biological Tissues at Hyperthermic and Ablation Temperatures. Crit Rev Biomed Eng 2014; 42: 467–492.
<https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2015012486>.
42. Crezee J et al. Hyperthermia-Based Anti-Cancer Treatments. Cancers 2021; 13: 1240.
<https://doi.org/10.3390/cancers13061240>.
43. Gao S et al. Local Hyperthermia in Head and Neck Cancer: Mechanism, Application and Advance. Oncotarget 2016; 7: 57367–57378.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10350>.
44. Nikfarjam M et al. Mechanisms of Focal Heat Destruction of Liver Tumors. J Surg Res 2005; 127: 208–223. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.02.009>.
45. Binenbaum Y et al. Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma. PLoS One 2017; 12: e0169457.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169457>.
46. Duchesne C et al. Cold Atmospheric Plasma Modulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Signalling and Enhances Burn Wound Neovascularisation. J Pathol 2019; 249: 368–80. <https://doi.org/10.1002/path.5323>.
47. Mirpour S et al. Cold Atmospheric Plasma as an Effective Method to Treat Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. Sci Rep 2020; 10: 10440.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67232-x>.

48. Daeschlein G et al. Treatment of Recalcitrant Actinic Keratosis (AK) of the Scalp by Cold Atmospheric Plasma. *Cogent Med* 2017; 4: 1412903. <https://doi.org/10.1080/2331205X.2017.1412903>.
49. Friedman PC et al. Successful Treatment of Actinic Keratoses Using Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma: A Case Series. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76: 349–350. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.09.004>.
50. Wirtz M et al. Actinic Keratoses Treated with Cold Atmospheric Plasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32: e37–39. <https://doi.org/10.1111/jdv.14465>.
51. Arisi M et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) for the Treatment of Actinic Keratosis and Skin Field Cancerization: Clinical and High-Frequency Ultrasound Evaluation. *Dermatol Ther* 2021; 11: 855–866. <https://doi.org/10.1007/s13555-021-00514-y>.
52. Pasqual-Melo G et al. Plasma Treatment Limits Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Development In Vitro and In Vivo. *Cancers* 2020; 12: 1993. <https://doi.org/10.3390/cancers12071993>.
53. Partecke LI et al. Tissue Tolerable Plasma (TTP) Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *BMC Cancer* 2012; 12: 473. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-473>.
54. Xu D et al. In Situ OH Generation from O_2^- and H_2O_2 Plays a Critical Role in Plasma-Induced Cell Death. *PLoS One* 2015; 10: e0128205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128205>.
55. Hirst AM et al. Low-Temperature Plasma Treatment Induces DNA Damage Leading to Necrotic Cell Death in Primary Prostate Epithelial Cells. *Br J Cancer* 2015; 112: 1536–1545. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.113>.

56. Ishaq M et al. Atmospheric Gas Plasma–Induced ROS Production Activates TNF-ASK1 Pathway for the Induction of Melanoma Cancer Cell Apoptosis. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 1523–1531. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-10-0590>.
57. D’Arcy MS. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol Int* 2019; 43: 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
58. Konstantinidou AE et al. Caspase-3 Immunohistochemical Expression is a Marker of Apoptosis, Increased Grade and Early Recurrence in Intracranial Meningiomas. *Apoptosis* 2007; 12: 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0001-4>.
59. Khodavirdipour A et al. Apoptosis Detection Methods in Diagnosis of Cancer and Their Potential Role in Treatment: Advantages and Disadvantages: A Review. *J Gastrointest Cancer* 2021; 52: 422–430. <https://doi.org/10.1007/s12029-020-00576-9>.
60. Jezeh MA et al. Direct Cold Atmospheric Plasma and Plasma-activated Medium Effects on Breast and Cervix Cancer Cells. *Plasma Processes Polym* 2020; 17: 1900241. <https://doi.org/10.1002/ppap.201900241>.
61. Vaquero J et al. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical in Vivo and in Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. *Cancers* 2020; 12: 1280. <https://doi.org/10.3390/cancers12051280>.
62. Schuster M et al. Visible Tumor Surface Response to Physical Plasma and Apoptotic Cell Kill in Head and Neck Cancer. *J Cranio Maxill Surg* 2016; 44: 1445–1452. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.07.001>.
63. Ratovitski EA et al. Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Process Polym* 2014; 11: 1128–1137. <https://doi.org/10.1002/ppap.201400071>.

64. Yusupov M et al. Atomic scale simulation of H₂O₂ permeation through aquaporin: toward the understanding of plasma cancer treatment. *J Phys D Appl Phys* 2018; 51: 125401. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aae7a>.
65. Yan D et al. On the Selective Killing of Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment: Status and Beyond. *Plasma Process Polym* 2021; 18: 2100020. <https://doi.org/10.1002/ppap.202100020>.
66. Chauvin J et al. Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: Comparison of 3D and 2D Response. *Anti-cancer Agents Med Chem* 2018; 18: 776–783. <https://doi.org/10.2174/1871520617666170801111055>.
67. Sato Y et al. Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer's Solution on Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Ann Surg Oncol* 2018; 25: 299–307. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-6239-y>.
68. Tanaka H et al. Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Activates Lactate in Ringer's Solution for Anti-Tumor Effects. *Sci Rep* 2016; 6: 36282. <https://doi.org/10.1038/srep36282>.
69. Utsumi F et al. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 2013; 8: e81576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081576>.
70. Daeschlein G et al. Comparison between Cold Plasma, Electrochemotherapy and Combined Therapy in a Melanoma Mouse Model. *Exp Dermatol* 2013; 22: 582–586. <https://doi.org/10.1111/exd.12201>.
71. Lee CM et al. Combinatorial Effect of Cold Atmosphere Plasma (CAP) and the Anticancer Drug Cisplatin on Oral Squamous Cell Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 7646. <https://doi.org/10.3390/ijms21207646>.

72. Pasqual-Melo G et al. Combination of Gas Plasma and Radiotherapy Has Immunostimulatory Potential and Additive Toxicity in Murine Melanoma Cells in Vitro. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1379. <https://doi.org/10.3390/ijms21041379>.
73. Pefani-Antimisiari K et al. Synergistic Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma and Free or Liposomal Doxorubicin on Melanoma Cells. *Sci Rep* 2021; 11: 14788. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94130-7>.

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Título do projeto:**

*Uso Do Plasma Frio Atmosférico No Tratamento Do Carcinoma De Células Escamosas
Felino Em Estágio Avançado*

Nome do pesquisador principal:

Carlos Eduardo Bezerra de Moura e/ou Genilson Fernandes de Queiroz

Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou:

Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA / 01.0203.2014.

Objetivos do estudo:

Avaliar a eficácia de tratamento do tumor do tipo carcinoma de células escamosas, comum em gatos, utilizando um aparelho de plasma atmosférico a frio, capaz de induzir a morte das células cancerígenas, baseando-se em estudos que já comprovaram a eficácia desse método em outros tipos de tumores.

Procedimentos a serem realizados com os animais:

1. Os animais serão submetidos a coletas de sangue sempre que necessário para avaliação de parâmetros fisiológicos, bem como avaliação de risco anestésico/cirúrgico e/ou avaliação de complicações no decorrer do tratamento;
2. Será realizada biópsia do tumor antes de iniciar o tratamento e logo após o último ciclo de aplicações, cujo protocolo anestésico do paciente será definido pela equipe de anestesiologia;

3. Os animais serão fotografados com câmera digital e infravermelha para estudo termográfico antes e imediatamente após tratamento dos tumores na primeira sessão;
4. Tratamento com plasma frio com duração de tempo de acordo com o tamanho do tumor. O protocolo completo compreenderá quatro ciclos de três aplicações em dias consecutivos com intervalo de uma semana sem exposição, entre eles.

Potenciais riscos para os animais:

O plasma a frio pode atingir temperatura por volta de 35 a 40°C podendo causar desconforto tolerável no animal. Em caso de intolerância, será realizada sedação com protocolo definido pela equipe anestésica.

Cronograma:

O projeto terá duração de quatro anos, com início em 07/2019 e término em 06/2024.

Benefícios:

O estudo em questão busca oferecer oportunidade de tratamento/controle e/ou cuidado paliativo para animais, bem como acompanhamento por veterinário especialista em oncologia enquanto durar o experimento.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. O Médico

Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a) _____, inscrito(a) no CRMV sob o nº _____. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal _____ também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos: (84) 3317-8310.

Contato/Tel. de emergência:

1. Que os pesquisadores deixarão um canal de livre comunicação para que eu possa tirar dúvidas sobre cada uma das etapas do estudo e possíveis complicações;
2. Que poderei contar com a assistência do hospital veterinário da UFERSA, sendo responsável por ela o Dr. Genilson Fernandes de Queiroz e o médico veterinário André Gustavo Alves Holanda através do telefone (84) 3317-8310.

Equipe:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura, Prof. Dr. Genilson Fernandes de Queiroz, Discentes: André Gustavo Alves Holanda, Bruno Henrique Morais do Nascimento, Victória Morais Silva.

Endereço:

R. Francisco Mota, 572 – Pres. Costa e Silva, Mossoró – RN, 59625-900 - Telefone: (84) 3317-8310.

Declaração de Consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Mossoró/RN, ____ / ____ / ____

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

Responsável:

Nome:

Documento de Identidade: (quando aplicável):

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantos foram os animais)

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

ANEXO A

PARECER 13/2020 CEUA-UFERSA



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 28 de maio de 2020.

PARECER 13/2020

Certificamos que o projeto intitulado "USO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS FELINO EM ESTÁGIO AVANÇADO" sob a responsabilidade de Carlos Eduardo Bezerra de Moura, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com as preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião de 19/05/2020.

Vigência do projeto	Setembro de 2020 a junho de 2024
Especie/linhagem	Felis catus
N. de Animais	30
Peso/idade	adultos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	HOVET/UFERSA

Emanuelle Fontenelle Rabelo
Emanuelle Fontenelle Rabelo
Coordenadora CEUA-UFERSA