

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Doctorado: “Medicina Veterinaria e Investigación
Terapéutica”

Título de la Tesis

**ELECTROQUIMIOTERAPIA COMO ESTRATEGIA
TERAPÉUTICA EN ONCOLOGÍA COMPARADA:
ESTUDIO EN GATOS CON CCE DE ORIGEN SOLAR Y
APLICACIÓN EN OTROS TUMORES Y ESPECIES
ANIMALES.**

Tesis Doctoral presentada por Dña. Sara E. Peña Santana

Dirigida por la Dra. Otilia R. Ferrer Quintana

La Directora

Otilia R. Ferrer Quintana

La Doctoranda

Sara E. Peña Santana

Aruca 2025

1.-INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1.- Introducción	1
1.2.- Objetivos	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.-Epidemiología	3
2.2.- Etiología y fisiopatología	3
2.2.1. <i>Virosis en gatos con CCE</i>	5
2.3.- Diagnóstico	6
2.3.1.- <i>Signos clínicos</i>	6
2.3.2.- <i>Citologías/Estudios histopatológicos</i>	7
2.3.3.- <i>Diagnóstico por imagen</i>	9
2.4.- Tratamientos	9
2.4.1.- <i>Crioterapia/Criocirugía</i>	10
2.4.1.1.- Principios de la criobiología	10
2.4.1.2.- Técnica de crioterapia	11
2.4.1.3.- Crioterapia en carcinoma de células escamosas (CCE)	12
2.4.2.- <i>Tratamiento tópicos</i>	13
2.4.3.- <i>Terapia fotodinámica</i>	13
2.4.4.- <i>Terapia quirúrgica</i>	14
2.4.5.- <i>Radioterapia</i>	15
2.4.6.- <i>Plesioterapia</i>	16
2.4.7.- <i>Microbraquiterapia</i>	16
2.4.8.- <i>Quimioterapia</i>	16
2.4.8.1.- Toceranib	16
2.4.8.2.- Metotrexato	18
2.4.9.- <i>Electroquimioterapia</i>	18
2.4.9.1.- Introducción a la electroquimioterapia	18
2.4.9.2.- Electroporadores y parámetros de pulso	20
2.4.9.3.- Fármacos utilizados.....	20
2.4.9.3.1.- <i>Bleomicina</i>	21
2.4.9.3.2.- <i>Cisplatino</i>	22
2.4.9.3.3.- <i>Carboplatino</i>	22
2.4.9.3.4.- <i>Calcio</i>	22
2.4.9.3.5.- <i>Otros fármacos</i>	23
2.4.9.4.- Indicaciones de la electroquimioterapia	23
2.4.9.5.- <i>Otras aplicaciones</i>	24
2.4.9.5.1.- <i>Electrotransferencia génica</i>	24
2.4.10.- <i>Inmunoterapia</i>	25
2.4.11.- <i>Antinflamatorios no esteroideos (AINEs)</i>	26
2.4.12.- <i>Otros tratamientos</i>	26

2.5.- Electroquimioterapia en otros tumores y/o especies	27
2.5.1.- <i>Sarcoma de tejidos blandos</i>	27
2.5.2.- <i>Tumores de estirpe epitelial.....</i>	27
2.5.3.- <i>Mastocitomas</i>	28
2.5.4.- <i>Melanoma canino.....</i>	29
2.5.5.- <i>Plasmocitomas</i>	29
2.5.6.- <i>Linfoma cutáneo canino y felino.....</i>	29
2.6.- Perspectivas clínicas y de futuro de la electroquimioterapia.....	30
2.6.1.- <i>Inmunomodulación inducida por electroquimioterapia</i>	30
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
3.1.- Diseño del estudio y selección de pacientes	33
3.2.- Procedimiento de estadificación en pacientes felinos.....	33
3.3.- Fase I: Crioterapia.....	36
3.3.1.- <i>Preparación y anestesia.....</i>	36
3.3.2.- <i>Aplicación técnica de crioterapia</i>	36
3.3.3.- <i>Cuidados post-crioterapia</i>	37
3.3.4.- <i>Evaluación de la respuesta clínica y seguimiento.....</i>	38
3.4.- Fase II: Electroquimioterapia con bleomicina	38
3.4.1.- <i>Criterios de Inclusión y Exclusión</i>	39
3.4.2.- <i>Elaboración del grupo y subgrupo en el estudio de EQT/Bleomicina</i>	39
3.4.3.- <i>Electroporador y parámetros eléctricos</i>	40
3.4.4.- <i>Selección de electrodos</i>	41
3.4.5.- <i>Selección y preparación del citostático</i>	41
3.4.6.- <i>Protocolo anestésico</i>	41
3.4.7.- <i>Procedimiento de electroquimioterapia</i>	42
3.4.8.- <i>Cuidados post-EQT.....</i>	42
3.4.9.- <i>Tratamiento con toceranib.....</i>	43
3.4.10.- <i>Seguimiento y evaluación de la respuesta</i>	43
3.4.10.1.- <i>Evaluación de la respuesta clínica</i>	44
3.4.10.2.- <i>Definiciones de respuesta al tratamiento</i>	44
3.4.11.- <i>Toxicidad local y efectos adversos</i>	44
3.4.11.1.- <i>Evaluación de la toxicidad local</i>	44
3.4.11.2.- <i>Evaluación de efectos adversos</i>	44
3.5.- Estudio estadístico	45
3.5.1.- <i>Análisis Fase I: Crioterapia (Grupo 1)</i>	46
3.5.2.- <i>Análisis Fase II: Electroquimioterapia/bleomicina (Grupo 2 y subgrupos 1,2,3 y 4)</i>	46
3.6.- Fase III: Casos clínicos tratados con EQT/bleomicina	47
3.6.1.- <i>CCE en halcón peregrino (Falco peregrinus)</i>	47
3.6.2.- <i>Condroma mandibular canino</i>	48
3.6.3.- <i>CCE del tercer párpado felino.....</i>	49

3.6.4.- <i>Plasmocitomas extramedulares en pacientes caninos</i>	49
4.- RESULTADOS	50
4.1.- Fase I	50
4.1.1 <i>Crioterapia en CCE (grupo 1)</i>	50
4.1.1.1.- Cicatrización y evolución de las lesiones	52
4.2.- Fase II	52
4.2.1 <i>Gatos tratados con electroquimioterapia/bleomicina (grupo 2)</i>	52
4.2.1.1.- Población de estudio	52
4.2.1.2.- Reseña y procedencia de los pacientes	53
4.2.1.3.- Presentación clínica y localización de las lesiones	56
4.2.1.4.- Diagnóstico y estadificación de los pacientes	58
4.2.1.5.- Evaluación de metástasis	60
4.2.1.6.- Aplicación electroquimioterapia con bleomicina	62
4.2.1.6.1.- Evaluación de la respuesta tumoral	63
4.2.1.6.2.- Respuesta a la EQT a los 30, 90 y 180 días del tratamiento	63
4.2.1.6.2.1.- <i>Resultados a los 30 días</i>	64
4.2.1.6.2.2.- <i>Resultados a los 90 días</i>	64
4.2.1.6.2.3.- <i>Resultados a los 180 días</i>	66
4.2.1.6.3.- Respuesta clínica según el grado tumoral (subgrupo 1 y subgrupo 2)	68
4.2.1.6.3.1.- <i>Resultados a los 30 días</i>	68
4.2.1.6.3.2.- <i>Resultados a los 90 días</i>	69
4.2.1.6.3.3.- <i>Resultados a los 180 días</i>	69
4.2.1.6.4.- Respuesta clínica a la EQT en gatos positivos a FeLV/FIV (subgrupo 3)	70
4.2.1.6.4.1.- <i>Resultados a los 30 días</i>	70
4.2.1.6.4.2.- <i>Resultados a los 90 días</i>	71
4.2.1.6.4.3.- <i>Resultados a los 180 días</i>	71
4.2.1.6.5.- Respuesta en gatos que recibieron terapia combinada EQT-bleomicina/ Toceranib (subgrupo 4)	72
4.2.1.6.6.- Análisis de supervivencia en la población de estudio 74	
4.2.1.6.6.1.- Análisis de supervivencia en el grupo global (grupo 2)	74
4.2.1.6.6.2.- Análisis de supervivencia según grado del tumor (subgrupo 1 y 2)	74
4.2.1.6.6.3.- Análisis de supervivencia en animales tratados con EQT/ bleomicina con y sin toceranib (subgrupo 4)	76
4.2.1.6.7.- Tasas de respuestas al tratamiento	77
4.2.1.6.7.1.- Tiempo de supervivencia	77
4.2.1.6.7.2.- Tasa de recidiva	78
4.2.1.6.7.3.- Intervalo libre de enfermedad	79
4.2.1.6.7.4.- Supervivencia libre de progresión	79
4.2.1.6.8.- <i>Estado final de los animales del estudio</i>	80
4.2.1.6.9.- <i>Evaluación de la seguridad</i>	80
4.2.1.6.9.1.- Toxicidad local	80
4.2.1.6.9.2.- Efectos adversos sistémicos	82

4.2.1.6.9.2.1.- Efectos adversos grupo tratado EQT/bleomicina	82
4.2.1.6.9.2.2.- Efectos adversos asociados toceranib	82
4.3.- Fase III	83
4.3.1.- Casos clínicos tratado con EQT/bleomicina en otras neoplasias y/o especies	83
4.3.1.1.-Carcinoma de células escamosas en halcón peregrino (<i>Falco peregrinus</i>)	83
4.3.1.2.-Condroma en mandíbula canina	84
4.3.1.3.-Carcinoma de células escamosas del tercer párpado felino	84
4.3.1.4.-Plasmocitomas extramedulares en pacientes caninos	84
5.- DISCUSIÓN	86
5.1. Datos demográficos	86
5.2. Localización de los CCE y características histológicas	87
5.3. Metástasis	87
5.4. Tratamientos	88
5.4.1. Crioterapia/criocirugía	88
5.4.2. Cirugía	89
5.4.3. Quimioterapia	90
5.4.4. Electroquimioterapia	90
5.4.4.1. Bleomicina combinada con EQT	90
5.4.4.2. Respuestas a la EQT	92
5.4.4.3. Sesiones de EQT	93
5.4.4.4. Gatos testados frente a FeLV/FIV	94
5.4.4.5. EQT/bleomicina con toceranib	95
5.4.4.6. Análisis de supervivencia	95
5.4.4.7. Tasas de respuesta al tratamiento	96
5.4.4.8. Evaluación de la seguridad: Toxicidad local y sistémica	97
5.5. Electroquimioterapia en otros tipos de tumores y especies	98
5.5.1.-Carcinoma de células escamosas en halcón peregrino (<i>Falco peregrinus</i>)	98
5.5.2.-Condroma en mandíbula canina	99
5.5.3.-Carcinoma de células escamosas del tercer párpado felino	99
5.5.4.-Plasmocitomas extramedulares en pacientes caninos	100
6.- CONCLUSIONES	101
7.- RESUMEN Y ABSTRACT	102
8.- BIBLIOGRAFÍA	104
9.- ANEXOS	125

10.- AGRADECIMIENTOS	132
-----------------------------------	------------

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
ALA	Ácido Aminolevulínico
ATP	Adenosin Trifosfato
CBCT	Tomografía Computarizada de Haz Cónico
CCB	Carcinoma de Células Basales
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CK2	Proteína Kinasa 2
COX	Ciclooxigenasa
COX1, COX2, COX3	Ciclooxigenasa-1, Ciclooxigenasa-2, Ciclooxigenasa-3
CRT	Crioterapia
ctDNA	ADN tumoral circulante
CX	Cirugía
DE	Desviación Estándar
EE	Enfermedad Estable
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EP	Enfermedad Progresiva
EQT	Electroquimioterapia
90Sr	Estroncio 90
FeLV	Virus de la Leucemia Felina
FCEV	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
FIV	Virus de la Inmunodeficiencia Felina
Flt-1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1 (Gen que codifica VEGFR)
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HMGB1	Proteínas B1 de alta movilidad
166Ho MS	Holmio-166 Microesferas
IFN-α	Interferón Alfa
IFN-γ	Interferón Gamma
IL-12	Interleucina 12
ILE	Intervalo Libre de Enfermedad
ITQ	Inhibidores de la Tirosin Kinasa
KDR	Kinase Insert Domain Receptor (VEGFR-2)
KIT/c-KIT/CD117/SCFR	Kit del recetor de Tirosin Kinasa/Kit del Receptor de Células Madre del Factor de Crecimiento de Mastocitos
MM	Mieloma Múltiple
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEM	Plasmocitoma Extra Medular
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PGHS	Prostaglandina G/H Sintasa
PLGF	Factor de Crecimiento Placentario
PV	Papiloma Virus
RC	Remisión Completa
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

ABREVIATURAS

RM	Resonancia Magnética
RP	Remisión Parcial
RTQ	Receptores Tirosina Quinasa
SCFR	Kit del receptor de células madre del factor de crecimiento de mastocitos
sFlt-1	Tirosin Quinasa 1 soluble tipo FMS
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
STB	Sarcomas de Tejidos Blandos
sVEGFR-1	Receptor-1 del factor de crecimiento endotelial vascular soluble
TC	Tomografía Computarizada
Tis	Tumor <i>in situ</i>
TLR	Receptores Toll
TMS	Tiempo Medio de Supervivencia
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TR	Tasa de recidiva
TS	Tiempo de supervivencia
VEGFR-1	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-1
VEGFR-2	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-2
VEGF-A	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-A

1.1.- INTRODUCCIÓN

La oncología cutánea es una especialidad dentro de la dermatología cuya importancia en la clínica de pequeños animales ha ido cobrando relevancia en las últimas décadas. Las neoplasias cutáneas son de origen multifactorial, en el que los agentes ambientales juegan un papel importante, siendo uno de los mayores factores de riesgo la exposición a la luz del sol. Canarias, dada su proximidad al Ecuador, tiene el índice ultravioleta (UV) más alto de España (<https://www.aemet.es/es/portada>), lo que previsiblemente repercute en la incidencia de los tumores cutáneos.

El carcinoma de células escamosas (CCE) representa una de las neoplasias cutáneas más comunes en gatos, en particular en aquellos con exposición solar prolongada. Su evolución clínica puede variar considerablemente según el grado de malignidad, lo que complica las decisiones terapéuticas, sobre todo en etapas avanzadas o en pacientes con enfermedades concomitantes. Aunque existen distintas opciones terapéuticas, como cirugía, crioterapia o radioterapia, su efectividad no siempre es óptima y, en numerosos casos, se observan recurrencias.

En este contexto, la electroquimioterapia (EQT) se ha propuesto como una estrategia alternativa de interés. Esta técnica combina fármacos citotóxicos con pulsos eléctricos que aumentan la permeabilidad de la membrana celular, favoreciendo así una mayor penetración del medicamento en las células tumorales. La bleomicina, en particular, ha mostrado una alta eficacia cuando se utiliza en combinación con EQT, incluso en tumores localmente avanzados o de difícil acceso quirúrgico.

No obstante, el uso de la EQT en animales, y específicamente en gatos con CCE, sigue estando poco documentado en la literatura científica. Son escasos los estudios que evalúan de manera comparativa su eficacia frente a otras terapias, así como su impacto en la supervivencia o sus posibles efectos adversos en situaciones clínicas especiales, como en gatos portadores de infecciones virales (FeLV/FIV), cuya alta prevalencia subclínica suele dificultar el abordaje terapéutico, y llevar a decisiones de eutanasia anticipadas, especialmente en presencia de tumores de naturaleza neoplásica.

Por ello, el objetivo de este trabajo es generar evidencia clínica relevante sobre el uso de la EQT con bleomicina en CCE felino, valorando su eficacia, seguridad y viabilidad en distintos contextos clínicos. Asimismo, pretende abrir nuevas líneas de investigación sobre su uso en oncología veterinaria, contribuyendo al desarrollo de terapias más eficaces, accesibles y adaptadas a las necesidades individuales de los pacientes.

1.2.- OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de la EQT combinada con bleomicina en comparación con otras terapias utilizadas en las distintas fases del CCE felino, con el fin de identificar la opción terapéutica más adecuada según el grado tumoral. Asimismo, explorar su aplicación en otros tipos de tumores y/o especies animales como alternativa terapéutica cuando las opciones convencionales no sean viables o se requieran tratamientos complementarios

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Valorar la eficacia de la crioterapia como tratamiento del CCE felino, tanto como monoterapia como en combinación con otras técnicas, en función del grado tumoral.
2. Analizar los factores que influyen en la aparición de metástasis en casos de CCE de origen solar en gatos.
3. Determinar cómo responden clínicamente los gatos con CCE al tratamiento combinado de EQT y bleomicina, considerando variables como el grado tumoral, valorando los indicadores de eficacia terapéutica.
4. Analizar la relación entre el número de sesiones de EQT requeridas y el grado de control tumoral alcanzado en gatos con CCE.
5. Estudiar la respuesta al tratamiento con EQT/bleomicina en gatos positivos a FeLV/FIV con CCE de bajo grado (T1-T2).
6. Determinar la eficacia de una terapia multimodal basada en la combinación de EQT/bleomicina y toceranib en gatos con CCE de alto grado, analizando su impacto en la respuesta tumoral, la supervivencia y el control de la enfermedad.
7. Analizar la supervivencia global, el tiempo medio de supervivencia (TMS), el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la supervivencia libre de progresión (SLP) en gatos con CCE tratados con EQT y bleomicina, y estimar su relación con el grado tumoral.
8. Determinar la tasa de recurrencia en gatos con CCE tratados con EQT y bleomicina, analizando su relación con el grado del tumor.
9. Evaluar la incidencia, tipo y gravedad de los efectos adversos locales y sistémicos asociados al uso de EQT en gatos con CCE, considerando la localización tumoral, los parámetros eléctricos aplicados y el manejo clínico posterior.
10. Explorar la aplicabilidad de la EQT en el tratamiento de otros tipos de tumores y en distintas especies animales, evaluando su viabilidad, seguridad y respuesta clínica preliminar, especialmente en aquellos casos donde la obtención de muestras representativas es limitada, con el fin de generar evidencia inicial que justifique estudios más amplios.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El carcinoma de células escamosas (CCE) es una neoplasia altamente maligna que surge de las células epidérmicas, que inducen la diferenciación en queratinocitos que normalmente producen queratina (Baba *et al.*, 2007; Goldschmidt y Chen, 2017). El CCE se puede clasificar según la ubicación de su origen como CCE oral, CCE ocular o CCE cutáneo. Esta neoplasia produce un gran impacto médico y económico por su capacidad de invasión local, los tratamientos limitados y su tendencia a la recidiva (Alam y Ratner, 2001).

Comprender la carcinogénesis y la progresión del CCE cutáneo es fundamental para desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento.

2.1.- EPIDEMIOLOGÍA

En medicina humana, el CCE es la segunda neoplasia más común en piel después de la neoplasia basocelular, su incidencia es aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de piel no melanoma, la cual ha aumentado en las últimas décadas debido al crecimiento en la expectativa de vida, y los avances en la detección de este tipo de tumores (Alam y Ratner, 2001; Uribe *et al.*, 2017). En Estados Unidos, la incidencia se estima entre 200.000 y 400.000 casos nuevos cada año y responsable de 9.000 muertes en ese periodo (Rogers *et al.*, 2015; Waldman y Schmults, 2019). La incidencia entre países es variable, y en España se detectan unos 20.000 casos por año (Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2016).

La incidencia de tumores cutáneos de origen solar en el perro y el gato, depende de áreas geográficas concretas, existiendo diferencias entre países y regiones por la influencia de la climatología (Vail y Withrow, 2007). En medicina veterinaria, el CCE es uno de los tumores más comunes que afectan a la piel, junto con los tumores de células basales y mastocitomas. Los CCE son los tumores cutáneos más frecuentes en el gato, con una frecuencia de aparición que fluctúa entre el 9 y el 25% de todas las neoplasias en esta especie (Clarke, 1991; Murphy, 2013; Bertino *et al.*, 2016).

Esta neoplasia se origina en las células escamosas de la piel y los gatos de cualquier raza pueden verse afectados. Sin embargo, los gatos con áreas de escaso pelo y piel no pigmentada (blanca) o ligeramente pigmentada de la cara y las orejas, que pasan tiempo al aire libre en un clima soleado, están predispuestos a desarrollar CCE (Murphy, 2013). Generalmente, es más frecuente en gatos domésticos de pelo corto, con mayor prevalencia en animales mayores (10-12 años) (Simčič *et al.*, 2021), y algunas razas como las Siamés, Himalayo o Persa, suelen tener menos riesgo (Hauck y Oblack, 2020).

2.2.- ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

El CCE se desarrolla en las células escamosas y basales de la epidermis, a partir de lesiones precancerosas (células displásicas), como se observa en las queratosis actínicas, que se forman como resultado de la exposición al sol y a otros factores ambientales. Estas lesiones precancerosas son parches de piel áspera, escamosa y seca, que pueden ser de color rojo o marrón (Thomson, M., 2007).

En humanos, los principales factores de riesgo que favorecen su aparición aparte de la exposición a radiación ultravioleta, son los fototipos claros, la exposición a algunos químicos como arsénico o hidrocarburos, cicatrices o inflamaciones crónicas, infección por virus del papiloma humano, inmunosupresión, consumo de tabaco y las genodermatosis preexistentes (Rigel, 2008; Sánchez y Nova, 2013). De manera similar a

otros cánceres, la progresión de la queratosis actínica a CCE se ha relacionado con mutaciones en genes clave involucrados en vías celulares que controlan la reparación del ADN, crecimiento celular, la supervivencia y la mortalidad, así como facilitando el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Chen *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998; Hanahan y Weinberg, 2000; Liotta y Kohn, 2001; Patel *et al.*, 2012; Murphy, 2013; Simčič, 2021).

A nivel bioquímico, se ha descubierto que ciertos genes y proteínas están involucrados en el desarrollo del CCE. Una mutación en el gen p53 debido a la exposición a la radiación ultravioleta se ha correlacionado con la regulación al alza del factor de crecimiento endotelial vascular (factor angiogénico FCEV o VEGF, por Vascular Endothelial Growth Factor) VEGF-A en CCE (Riedel *et al.*, 2000). Este gen está presente en más del 90% de los CCE en humanos, así como en bovinos, caninos, felinos, y CCE equino (Ziegler *et al.*, 1994; Teifke y Löhr, 1996; Carvalho *et al.*, 2005). La proteína del gen p53 actúa como un supresor de tumores, lo que significa que normalmente ayuda a prevenir el desarrollo del cáncer al controlar el ciclo celular y promover la muerte celular programada en las células dañadas o anormales. Sin embargo, cuando esta proteína está mutada o inactivada, las células anormales pueden crecer y multiplicarse sin control, lo que puede llevar a la formación del CCE (Carvalho *et al.*, 2005).

La angiogénesis es un importante factor que contribuye al crecimiento de tumores malignos, metástasis y supervivencia (Folkman, 1995). Los tumores sólidos dependen de la perfusión vascular para crecer y migrar; de lo contrario, estos se limitan a crecer entre 1 a 2 mm antes de que la hipoxia en el centro del tumor induzca la necrosis (Cullen y Breen, 2016). Además, la medición de la densidad microvascular en tumores puede considerarse como un reflejo de la actividad angiogénica y se utiliza como un indicador de pronóstico para la supervivencia global para cáncer de pulmón y de mama, carcinoma hepático y gástrico, melanoma cutáneo y glioblastomas en humanos (Behrem *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2007).

La angiogénesis en tejido normal y tumoral es estimulada por péptidos del tumor o células estromales adyacentes (Klagsbrun y D'amore, 1991). El factor de crecimiento del endotelio vascular, el factor de crecimiento placentario (PLGF), y sus receptores Flt-1, sFlt-1 y KDR (también conocidos como VEGFR-1, sVEGFR-1 y VEGFR-2, respectivamente), son los promotores más importantes de la angiogénesis fisiológica y tumoral (Fischer *et al.*, 2008; Silvan *et al.*, 2015). El VEGF-A interactúa con mayor afinidad con Flt-1, aunque KDR es capaz de inducir una cascada de señalización de la fosforilación más fuerte para inducir la aparición, la supervivencia y aumentar la permeabilidad en células endoteliales o tumorales (Ferrara, 2000). Por el contrario, PLGF interactúa preferentemente con Flt-1 y sFlt-1, que controlan indirectamente la disponibilidad de VEGF-A para interactuar con KDR con efectos sinérgicos (Dor *et al.*, 2001; Ribatti, 2008; Kabak *et al.*, 2020). El Flt-1 soluble carece de dominios transmembrana e intracelulares; de este modo, se secreta al espacio extracelular donde puede actuar como un receptor señuelo retenido en la matriz extracelular, induciendo un efecto antiangiogénico (Carmeliet *et al.*, 2001). La expresión elevada de VEGF-A y sus receptores se han relacionado con la clasificación histopatológica, la progresión tumoral, y pronóstico de múltiples tumores humanos (Du *et al.*, 2003).

Del mismo modo, la abundancia relativa de PLGF se ha relacionado con la vascularización y progresión tumoral. Los niveles más altos de ARNm o proteína de PLGF se correlacionan con angiogénesis patológica (Fischer *et al.*, 2008), tamaño del

tumor, metástasis, estadio clínico, tasa de recurrencia y mal pronóstico de múltiples tipos de cáncer (Marcellini *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2010).

Existe un estudio sobre la relación de la proteína kinasa 2 (CK2), que es una proteína que participa en el crecimiento y la proliferación celular, es esencial para la supervivencia celular y se expresa de forma ubicua en los tejidos (Cannon *et al.*, 2017). La CK2 no parece tener un potencial oncogénico directo notable; más bien, apoya otras acciones responsables de la génesis tumoral. Las funciones de la CK2, que promueven un entorno pro-tumoral, incluyen la activación del factor nuclear κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Eddy *et al.*, 2005), vías de señalización Wnt- β -catenina (vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior) (Seldin *et al.*, 2005) y las vías de la fosfatodilinositol 3-kinasa-Akt (Guerra, 2006); inactivación de supresores de tumores tales como homólogo de fosfatasa y tensina y supresión de la apoptosis (Shin *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2008; McDonnell *et al.*, 2008; Hellwig *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2014). Según los resultados de este estudio, existe una mayor expresión o localización nuclear (o ambas) de la proteína CK2 en muchos tumores humanos (Guo *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2005; Trembley *et al.*, 2010), y se asocian comúnmente con un pronóstico negativo.

Esta proteína también se detectó en tejidos felinos y la falta o poca regulación de la CK2 en células cancerígenas felinas afectó a la inducción de apoptosis y reducción de la viabilidad celular. Las funciones de la CK2 en la supervivencia celular y la supresión de la apoptosis, junto con la alteración de la expresión y la actividad en los tumores humanos y felinos, la convierten en un objetivo atractivo para el tratamiento del cáncer (Cannon *et al.*, 2017).

Las células del CCE felino se pueden inhibir de manera efectiva al atacar a CK2 e identificar los casos clínicos que serían más o menos propensos a beneficiarse de los tratamientos dirigidos a CK2, dependiendo de la cantidad de expresión de esta proteína (Cannon *et al.*, 2017).

2.2.1 Virosis en gatos con CCE

Los papilomavirus (PV) son pequeños virus de ADN de doble cadena sin envoltura que infectan la piel y las superficies mucosas de los mamíferos y muchos otros vertebrados de forma predominantemente específica del hospedador. Las consecuencias de las infecciones por PV van desde las clínicamente asintomáticas hasta los cánceres epiteliales malignos. El potencial oncogénico de los PV depende del genotipo del virus, de factores del huésped como el estado inmunitario y de factores ambientales como la exposición a la luz (McBride, 2017). En general, se considera que los PV felinos son la causa de los papilomas orales, las placas virales y los carcinomas de Bowen *in situ*, todos ellos poco frecuentes (Gross *et al.*, 2005). De mayor relevancia clínica, se sospecha que una proporción de CCE cutáneos tienen una etiología por PV. La expresión de oncogenes virales, vinculan algunos genotipos de estos virus con un subconjunto de CCE cutáneos, pero otros PV no (Hoggard *et al.*, 2018).

El virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la leucemia felina (FeLV) son responsables de la inmunosupresión de los gatos infectados, haciéndolos más susceptibles a infecciones secundarias y crónicas, así como al desarrollo de neoplasias (Little, 2020). El FeLV se reconoce como una causa de linfoma y leucemia felino, aunque aún se

desconoce su incidencia en la población general de gatos (Beatty, 2021). Se reporta una asociación entre linfoma, CCE, fibrosarcoma y mastocitoma con infecciones por FIV (Magden, 2011).

Los virus pueden desempeñar un papel crucial en la carcinogénesis, debido a su efecto prooncogénico o por la inmunosupresión desencadenada que permite la proliferación neoplásica (Hartmann, 2011; Sequeira, 2022). La exposición crónica a factores ambientales, como los rayos UV, combinada con los virus, pueden favorecer el desarrollo del CCE (Magden, 2011; Little, 2020; Sequeira, 2022).

2.3.- DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del CCE en animales se basa en una combinación de signos clínicos, examen físico y pruebas de diagnóstico.

El diagnóstico diferencial es amplio e incluye herpesvirus, esporotricosis, criptococosis, micobacteriosis atípica y el complejo de granuloma eosinofílico, y se hace un diagnóstico preciso y definitivo por histopatología (Lucas y Larsson, 2006).

2.3.1.- Signos clínicos

El CCE puede presentarse como una lesión o un tumor en la piel que puede crecer y extenderse hacia los tejidos circundantes. Esta neoplasia puede afectar a los nervios, los músculos y los vasos sanguíneos cercanos, lo que puede provocar dolor, sangrado crónico, debilidad y otros síntomas. Si no se trata, la lesión puede extenderse a los linfonodos y a otros órganos, lo que puede poner en riesgo la vida del paciente (Spugnini *et al.*, 2009; Murphy, 2013).

Clínicamente, el CCE pueden aparecer como placas o pápulas, cráteres o lesiones fungiformes que puede estar ulceradas y eritematosas con costras (Vail y Withrow, 2007). Es altamente invasivo y las metástasis son poco comunes (Carpenter *et al.*, 1987; Ruslander *et al.*, 1997; Moore y Ogilvie, 2001) pero tienen una tendencia a progresar hacia ulceraciones cancerosas dando lugar a lesiones dolorosas y que no cicatrizan (Lana *et al.*, 1997). Muchos animales pueden tener lesiones que desfiguran en los casos avanzado de CCE, aun así, pueden vivir por períodos prolongados, sobre todo si reciben tratamientos paliativos o con respuestas parciales (Spugnini *et al.*, 2009; Zacccone *et al.*, 2022).

Las manifestaciones clínicas del CCE en gatos pueden variar considerablemente según la localización anatómica de la lesión y el grado de progresión de la enfermedad. Estas neoplasias pueden presentarse como lesiones solitarias o múltiples, con diversidad en su tamaño, forma y aspecto. En algunos casos, los gatos experimentan alteraciones en su comportamiento habitual, tales como disminución del apetito, apatía, rechazo al contacto físico o conductas agresivas asociadas al dolor (Moore y Ogilvie, 2001; Spugnini *et al.*, 2009). Cuando el CCE afecta áreas orales o labiales, es común observar dificultades al alimentarse, salivación excesiva o halitosis, mientras en casos de compromiso digital, los animales pueden presentar cojera o inflamación en las extremidades (Melzer *et al.*, 2006).

Se deben explorar los linfonodos submandibulares, palpándolos, así como realizar examen citológico y/o histopatológico para poder determinar si existen metástasis de las

células del tumor primario en los linfonodos centinelas, en este caso de la cabeza y cuello (Thomson, 2007). Es más probable que los gatos desarrollen tumores en la cara, párpados y las orejas, pero cualquier sitio de la piel puede verse afectado (Bertone *et al.*, 2003; Spugnini *et al.*, 2009).

2.3.2.- Citologías/Estudios histopatológicos

La citología es una técnica de diagnóstico no invasiva, que normalmente no requiere anestesia ni analgesia y produce resultados en muy poco tiempo. Esta técnica se utiliza para recolectar las muestras de lesiones o masas cutáneas y linfonodos aumentados de tamaño. Se puede obtener un diagnóstico citológico definitivo o diagnósticos adicionales que se interpretan junto con la histopatología. Esta técnica reduce el estrés en el paciente, es rentable para los clientes y permite a los profesionales iniciar un tratamiento adecuado más rápidamente (MacNeill, 2011; Zacccone, 2022).

La interpretación citológica coincide con el resultado histopatológico de las muestras en el 90,9% de los casos de masas cutáneas y subcutáneas. La sensibilidad y especificidad citológica oscila entre el 89,3% y el 97,9% con valores predictivos positivos y negativos del 99,4% y 68,7%, respectivamente (MacNeill, 2011; Murphy, 2013).

El diagnóstico citológico del CCE puede ser difícil por la presencia de inflamación. Los tumores epiteliales escamosos tienen varias características distintivas de malignidad incluyendo queratinización aberrante y presencia de vacuolas citoplasmáticas anormales, que le da a las células un aspecto de anillo de sello. Se pueden observar, además, neutrófilos y otros signos de malignidad como la presencia de células dentro del citoplasma de las células epiteliales, un proceso denominado emperipolesis (Raskin, 2015). Los CCE poco diferenciados, carecen de estas características distintivas. Se deben evaluar los linfonodos de drenaje (centinelas) para detectar la presencia de metástasis (Favrot *et al.*, 2009; MacNeill, 2011).

Sin embargo, la prueba diagnóstica de elección es la biopsia, que es una prueba en la que se obtiene una muestra de la lesión mediante escisión quirúrgica (tomando el espesor de la piel con sus tres capas) para su estudio histopatológico, bajo sedación o anestesia general, pudiendo utilizar técnicas de biología molecular como la inmunohistoquímica. Es la prueba “gold standard” y de elección, para el diagnóstico definitivo, porque además podemos conocer el índice mitótico de la neoplasia y poder determinar el grado o estadio de la enfermedad a nivel local (foco primario) (Thomson, 2007).

Histológicamente, el CCE en humanos y gatos se caracteriza por islas, cordones y trabéculas de queratinocitos epidérmicos desorganizados, invadiendo y traspasando a través de la capa basal de la epidermis hacia la dermis (Goldschmidt y Chen, 2017). Con frecuencia, se forman queratinocitos neoplásicos formando islas que secretan fibras de queratina eosinofílicas concéntricas en el centro, formando “perlas de queratina” que son útiles para el diagnóstico de CCE (Lehnerdt *et al.*, 2005; Murphy, 2013; Schmitz *et al.*, 2019).

Las células tumorales son normalmente grandes, de forma ovalada y con núcleos hipercromáticos prominentes, aunque se pueden observar grados altos de anisocitosis y pleomorfismo nuclear en CCE de alto grado menos diferenciados (Goldschmidt *et al.*, 2017). Éstas pueden tener múltiples desmosomas en la membrana, que se ven como puentes entre celdas (Baba *et al.*, 2007). El CCE cutáneo invade localmente la dermis y

puede alcanzar hueso y cartílago de zonas afectadas con graves consecuencias para el paciente. El CCE induce una fibrosis intensa y una respuesta inflamatoria del tejido circundante con abundante vascularización (Caruntu *et al.*, 2021).

El CCE en gatos comparte múltiples características con el CCE cutáneo humano y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; ambos son localmente invasivos, desarrollan metástasis en etapas avanzadas, a menudo muestran recurrencia local y tienen una progresión tumoral similar (Petter y Haustein, 1998; Lehnerdt *et al.*, 2005; Wypij, 2013; Schmitz *et al.*, 2019; Caruntu *et al.*, 2021). En especies domésticas (Yager *et al.*, 1993) y en humanos (Hald *et al.*, 1995), el CCE induce una intensa respuesta inmunitaria antitumoral local caracterizada por abundantes células linfoplasmocíticas infiltradas, que parece influir en el crecimiento del tumor. Así, en los humanos una infiltración peritumoral marcada de linfocitos T se ha considerado un factor pronóstico positivo (Sadanaga *et al.*, 1994; Hald *et al.*, 1995).

En la especie felina se observa un abundante infiltrado inflamatorio local, principalmente de linfocitos T CD3⁺, linfocitos B y células plasmáticas portadoras de IgG. Las lesiones bien diferenciadas y levemente invasivas, exhiben un número significativamente mayor de estas células, y expresaron complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-II) en mayor proporción que los CCE moderadamente diferenciados e invasivos. Esta respuesta celular y humoral parece estar relacionada con la regulación del crecimiento del tumor, pero no induce la regresión completa del mismo (Pérez *et al.*, 1999).

En análisis de inmunohistoquímica de tejidos afectados por CCE en gatos, se ha observado que existe una sobreexpresión de la ciclina A, con un 90% de inmunorreactividad (Murakami *et al.*, 2000). Este hallazgo se ha observado también en CCE en pacientes humanos (Furihata *et al.*, 1996; Dobashi *et al.*, 1998). Las ciclinas son proteínas reguladoras de la multiplicación celular de las células eucariotas y en concreto la ciclina A, se detecta desde la fase S del ciclo celular y aumenta hasta la fase G2 del mismo (Murakami *et al.*, 2000).

Mediante la inmunohistoquímica se determinan, además, las tasas de proliferación celular y apoptosis de las células neoplásicas y permite evaluar el comportamiento biológico del tumor. En un estudio reciente (Ribeiro *et al.*, 2023) se analizó la expresión inmunohistoquímica de Ki-67, COX-2 y caspasa-3 y se correlacionó con el tipo de respuesta a la electroquimioterapia (EQT) en el CCE. El estudio muestra que el grado histopatológico, el tamaño y estadificación del tumor, el grado de pleomorfismo celular y grado de infiltrado inflamatorio, que pueden considerarse factores negativos pronóstico del CCE cutáneo y predictores negativos de respuesta a la EQT. Sin embargo, los marcadores Ki-67, COX-2 y caspasa-3 no se consideraron factores predictivos del tipo de respuesta a la EQT. Los CCE evaluados en este estudio mostraron un marcaje de COX-2, que sigue demostrando el objetivo terapéutico con respecto al uso de antiinflamatorios no esteroides (AINES) con efecto anti-COX-2 (Ribeiro *et al.*, 2023).

En el caso de los CCE orales se están utilizando técnicas de biopsia líquida, muy prometedores en la detección temprana y el seguimiento de este tipo de tumor. Esta técnica de diagnóstico no invasiva implica la detección de ADN tumoral circulante (ctDNA) en la sangre, lo que ofrece la posibilidad de identificar tempranamente la enfermedad y monitorear las respuestas al tratamiento (Tài y Ngán, 2023).

En la misma línea, el campo de la proteómica se perfila como una herramienta útil en la identificación de biomarcadores que pueden proporcionar información valiosa sobre el

pronóstico de la enfermedad y la respuesta terapéutica (Olmsted *et al.*, 2017; Altamura *et al.*, 2021).

2.3.3.- Diagnóstico por imagen

Una de las pruebas del diagnóstico por imagen, es la radiografía, que puede ser útil para determinar si el CCE se ha diseminado a los tejidos circundantes (principalmente óseos) o a otros órganos, aunque para los tejidos blandos son preferibles otras pruebas de imagen, como la Tomografía Computarizada (TC) o la Resonancia Magnética (RM) (Randal *et al.*, 2016).

El papel de las imágenes avanzadas en el tratamiento del CCE felino es fundamental, siendo la TC y la RM las técnicas más frecuentes. Estos métodos han mejorado considerablemente la precisión de la estadificación del tumor, permitiendo una evaluación más detallada del tumor, los linfonodos regionales afectados y cualquier metástasis potencial (Supsavhad *et al.*, 2016; Piegols *et al.*, 2018).

En el caso de la TC, se puede utilizar para definir con precisión la masa, la extensión y facilitar la estadificación de los linfonodos en gatos con CCE, pero estas características no se correlacionaron con la supervivencia en el tiempo (Randal *et al.*, 2016). Se ha comprobado que la combinación de la TC con emisión de positrones (18F-fluorodeoxiglucosa) denominada PET, permite una mejor identificación y detalle de las lesiones en el caso de los CCE orales en gatos (Randal *et al.*, 2016; Tàì y Ngàn, 2023), siendo esta técnica diagnóstica, una herramienta muy utilizada en medicina humana para el mismo tipo de lesiones (Randal *et al.*, 2016).

Además de la PET, se están usando técnicas de imagen avanzadas como la tomografía computarizada de haz cónico (CBCT), que han demostrado un gran potencial para proporcionar información más detallada sobre la extensión del tumor, lo que ayuda a guiar las decisiones de tratamiento de manera más efectiva (Tàì y y Ngàn, 2023).

La RM, se utiliza también para el diagnóstico de los CCE, y se basa en la creación de campos magnéticos y ondas de radio para formar imágenes detalladas y puede ser útil para evaluar la extensión del tumor y la invasión a los tejidos cercanos. Tiene mayor definición de los tejidos blandos y se pueden añadir, además, contrastes para mejorar la definición del alcance de la neoplasia (Tàì y y Ngàn, 2023).

2.4.- TRATAMIENTOS

El tratamiento para el CCE en gatos depende del tamaño y la ubicación del tumor, así como de la extensión de la neoplasia. En la literatura se han descrito varios enfoques terapéuticos, incluyendo la cirugía (Withrow y Straw, 1990), crioterapia (Kuflik y Cage, 1991; Lana *et al.*, 1997), radioterapia (Theon *et al.*, 1995; Melzer *et al.*, 2006), plesioterapia (Goodfellow *et al.*, 2006), terapia fotodinámica (Peaston *et al.*, 1993; Frimberger *et al.*, 1998), quimioterapia sistémica, intralesional (Théon *et al.*, 1996; Spugnini *et al.*, 2009), y por vía oral (London *et al.*, 2003). Además, en las lesiones más superficiales, están descritos los tratamientos tópicos (Gil *et al.*, 2008; Piegols *et al.*, 2018), así como el curetaje y la diatermia (Jarrett *et al.*, 2013). En algunos casos, se puede recomendar una combinación de tratamientos.

Los resultados de estas terapias generalmente son buenos, si las lesiones se tratan en la fase inicial de la enfermedad. Pero en fases más avanzadas los resultados no son tan

favorables, aunque parecen prometedoras técnicas aplicadas como la electroquimioterapia (Spugnini *et al.*, 2009; Tozon *et al.*, 2014).

En general, las terapias combinadas han mostrado resultados más alentadores. Existen estudios donde se realiza terapia multimodal con terapia médica, radioterapia y cirugía, con tiempos de supervivencia largos. Se ha demostrado que la terapia multimodal es efectiva para muchos tipos de tumores en animales y en las personas. Es posible que los mejores resultados para los pacientes incluyan una combinación de control locoregional mediante cirugía y/o radioterapia, más quimioterapia con agentes de quimioterapia dirigidos como toceranib y/o quimioterapia citotóxica (Olmsted *et al.*, 2017).

2.4.1.- Crioterapia/Criocirugía

La criocirugía es una rama de la criobiología y la cirugía que se ocupa de la aplicación terapéutica del frío a temperaturas muy bajas (inferiores a 0 °C) para destruir tejidos en zonas seleccionadas (Rubinsky, 2000). La criocirugía o crioterapia se conceptualizó inicialmente, en los años 60 con fines terapéuticos destinado a la congelación de material biológico, que provoca una inhibición fisiológica o destrucción de tejidos (Cooper, 1963). Es un procedimiento donde se produce la destrucción selectiva del tejido alternando ciclos de congelación y descongelación (Goldstein y Hess, 1977; Withrow y Straw, 1980).

La crioterapia, también llamada criocirugía, crioablación, crioterapia percutánea o terapia de crioablación dirigida. Aunque crioterapia y crioablación pueden utilizarse indistintamente, el término «criocirugía» se reserva mejor para la crioterapia realizada mediante un abordaje quirúrgico abierto (Fesseha y Yilma. 2020).

Esta técnica está muy extendida en medicina humana, donde existen numerosos estudios que caracterizan su aplicación e indicaciones (Marques, 1989; Andrews, 2004). Esta terapia es bastante utilizada en dermatología (verrugas, lunares, neoplasias cutáneas, queratosis solares) y en algunos trastornos internos (cáncer de hígado, próstata y lesiones cervicales), donde el uso de bajas temperaturas está controlado, con el fin de destruir tejidos neoplásicos y no neoplásicos (Clarke, 1991; Andrews, 2004; Gage *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2017).

2.4.1.1.- Principios de la criobiología

Las células de mamíferos se destruyen cuando se enfrían a una temperatura de -20°C. La lesión primaria comienza con la formación de cristales de hielo, tanto intracelulares como extracelulares (Graham, 1993). La membrana externa de la célula se rompe por los cristales intracelulares, y la formación de hielo fuera de la célula deshidrata el entorno celular, provocando concentraciones letales de electrolitos y cambios en el pH. Cuando se dañan los orgánulos, la célula pierde su capacidad de regular la permeabilidad iónica y se produce la muerte celular (Korpan, 2012; Baust *et al.*, 2016).

Las neoplasias cutáneas malignas suelen necesitar una temperatura de -50°C, mientras que las lesiones benignas sólo requieren una temperatura de -20°C a -25°C (Jacobs y Oliver, 2011). Las lesiones pequeñas y de bajo grado sufren una respuesta inflamatoria, pero si se realiza una congelación severa, ésta produce la muerte de las células y da como resultado la destrucción del tejido. Además, en el tejido tratado se produce hipotermia con estasis vascular en la microcirculación del tejido (Gage *et al.*, 2009; Korpan, 2012). El efecto de la congelación en la vasculatura, es claramente la causa principal de la muerte celular. Con la descongelación, el fallo en la microcirculación es progresivo, resultando

en estasis vascular en aproximadamente 1h, lo que asegura la muerte celular por isquemia (Gage *et al.*, 2009) (Figura 1).

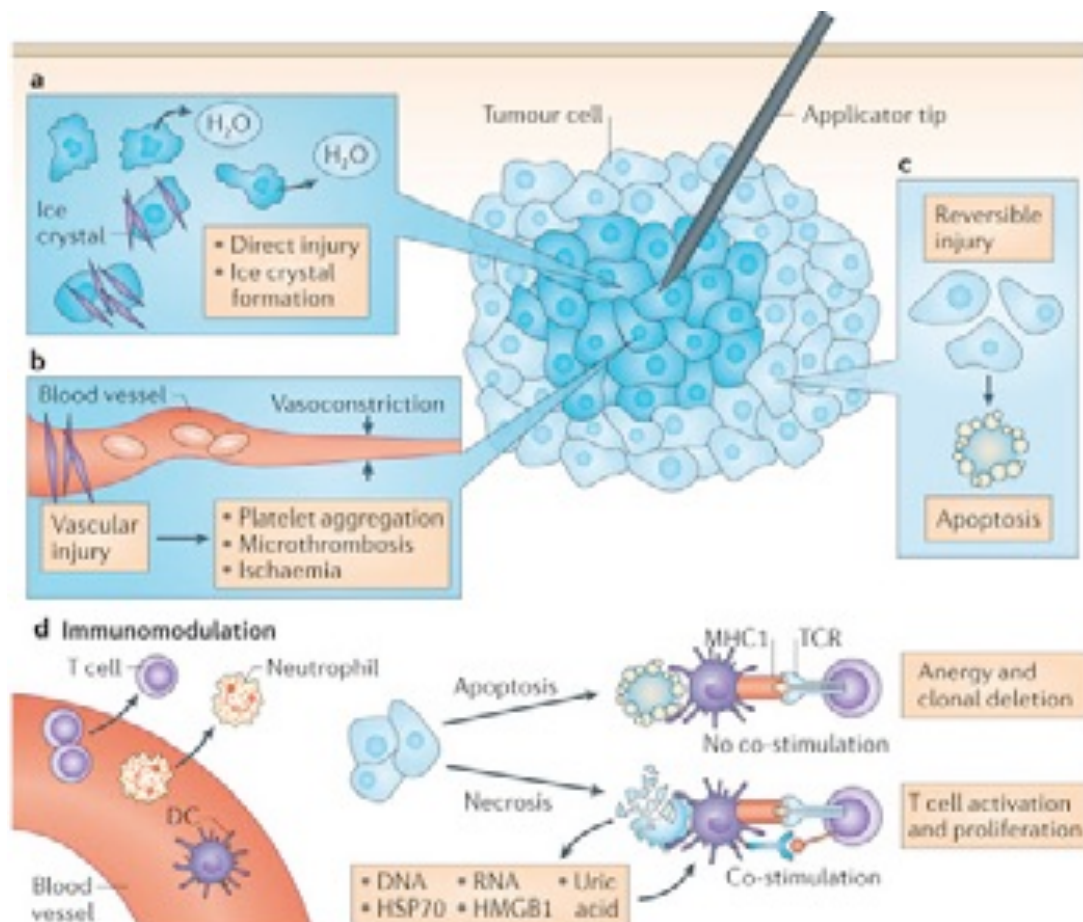


Figura 1. Mecanismo de crioterapia (Gage *et al.*, 2009)

Las variaciones en la vascularización, la estructura celular y el contenido de agua hacen que los tejidos respondan de forma diferente a la crionecrosis. Los tejidos secos (por ejemplo, la córnea) no forman fácilmente cristales de hielo y, por lo tanto, no responden muy bien a la crioterapia. Los componentes celulares de los nervios periféricos se destruyen por congelación, pero como el andamiaje de fibras del epineuro no resulta dañado, es posible la regeneración (Beazley *et al.*, 1974; Graham *et al.*, 2004). Los tejidos cercanos a vasos sanguíneos importantes o en zonas muy vasculares son difíciles de congelar rápidamente y tienden a descongelarse rápidamente sin pérdida de función (Korpan, 2012).

Se han documentado respuestas inmunitarias dirigidas contra las células tumorales después de la criocirugía, y la reacción inmunitaria anticancerosa inducida por la crioablación, siendo un fenómeno bien documentado tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (Cooper y Dawber, 2001; Andrews, 2004).

2.4.1.2.- Técnica de crioterapia

Se han ideado varias modalidades de tratamiento en el uso de la crioterapia de las lesiones. Entre ellas se encuentran la técnica de congelación con spray, la técnica del aplicador, el método de la criosonda y el método del termoacoplador (Figura 2). El nitrógeno líquido

es la mejor fuente universal de congelación debido a su bajo punto de ebullición y a su facilidad de uso. Existen otras fuentes que se utilizan para congelar, como el freón, el dióxido de carbono y el óxido nitroso, pero no son tan eficaces para destruir las lesiones debido a sus puntos de ebullición más altos (Fesseha y Yilma, 2020).



Figura 2. Dispositivos de criocirugía: Aplicador con punta de algodón (izquierda), aerosol de nitrógeno líquido (centro), criosonda (derecha).

Los tiempos de congelación varían desde los 60 segundos (Graham, 1983) a 3 minutos (Otterson, 2003). Los tiempos de descongelación se definen como el tiempo que tarda en desaparecer el halo de congelación (hielo) alrededor de la lesión. Las lesiones se pueden someter a tres ciclos de congelación-descongelación (Prado *et al.*, 2017). Si en este procedimiento se utiliza nitrógeno líquido atomizado (Yiu *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2017), las temperaturas medias alcanzadas con la aplicación de nitrógeno líquido varían entre -160°C (Otterson, 2003) ó el óxido nitroso (NO_2) con -89°C (Fesseha y Yilma, 2020).

La técnica de crioterapia por pulverización es probablemente el método más utilizado (Andrews, 2004). Este método es adecuado para la mayoría de las lesiones benignas y algunas lesiones neoplásicas superficiales. La pulsación de cada pulverización para evitar la sobreexpansión de la zona tratada evita complicaciones. Los conos redondos son los más adecuados para las lesiones redondas y para las lesiones grandes y de forma irregular, es necesaria la congelación secuencial (Korpan, 2012; Baust *et al.*, 2016).

El procedimiento se considera seguro, ya que requiere un menor tiempo de anestesia (Queiroz *et al.*, 2008). Además, presenta mejores resultados estéticos y menor morbilidad que la cirugía convencional (Hoffman y Bischof, 2002). Este procedimiento es apropiado para el tratamiento de varias lesiones cutáneas superficiales (Kufik, 1994; Zouboulis, 1998), y cuando la cirugía convencional no se puede realizar debido a las comorbilidades o la localización anatómica de la lesión (Ruslander *et al.*, 1997).

2.4.1.3.- Crioterapia en carcinoma de células escamosas (CCE)

Entre las neoplasias malignas, el CCE cutáneo puede ser tratado satisfactoriamente por criocirugía, ya que este procedimiento permite márgenes de seguridad adecuados (Thomson, 2007; Rodaski *et al.*, 2008). En el caso del CCE, la terapia tiende a ser efectiva, siempre y cuando se adopten unos criterios de selección para los pacientes. El tiempo de congelación de las lesiones puede ser un factor determinante para el éxito de la criocirugía (Prado *et al.*, 2017).

Existen pocos estudios prospectivos en gatos, pero en algunos describen remisiones completas del 38,5% y parcial de un 46.1% (Prado *et al.*, 2017). Las principales complicaciones que se observan son la formación de costras y estenosis de las fosas

nasales en los CCE del plano nasal (Thomson, 2007; De Quieroz *et al.*, 2008), así como despigmentación y fibrosis (Otterson, 2003). La efectividad de la terapia depende de la selección correcta de los candidatos en función del tamaño de la lesión, el tiempo de congelación y los cuidados postoperatorios (Prado *et al.*, 2017).

2.4.2.- Tratamiento tópicos

Uno de los tratamientos tópicos usados en medicina humana y veterinaria para el tratamiento de lesiones carcinomatosas, como el CCE, es el imiquimod (Gill *et al.*, 2008; Peters-Kennedy *et al.*, 2008). El Imiquimod es una imidazoquinolinamina, que es un modulador del sistema inmunológico y posee una potente actividad antiviral y antitumoral en modelos animales y humanos (Stanley, 2002; Schon *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que el imiquimod actúa tanto directamente al inducir la apoptosis como al inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias (Stanley, 2002; Schon *et al.*, 2003; Lysa y Wolf, 2004; Smith *et al.*, 2004). El imiquimod activa los macrófagos y otras células al unirse a los receptores de la superficie celular, como el receptor Toll 7, y por lo tanto induce la secreción de citoquinas proinflamatorias como el interferón- α y γ (IFN- α , IFN- γ), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), e interleucina-12 (IL-12). Estas citocinas promueven una respuesta inmunitaria dominante Th1, que en general se asocia con inflamación y daño tisular a través de leucocitos inflamatorios activados y con actividad citolítica como los linfocitos CD8⁺ (Abbas *et al.*, 1996). El imiquimod también puede inducir la apoptosis directamente de una manera dependiente de la familia Bcl-2 mediante la regulación negativa de genes antiapoptóticos como hurpin y HAX-1 (Schon *et al.*, 2003; Lysa y Wolf, 2004). Los receptores Toll (TLR) son receptores de patrones moleculares asociados a patógenos, como el ADN bacteriano o el ARN viral. Se expresan en una variedad de células presentadoras de antígenos (Schon *et al.*, 2003; Lysa y Wolf, 2004).

El uso de la crema de imiquimod al 5% está indicado para la queratosis actínica, el carcinoma de células basales superficiales y las verrugas genitales externas en humanos (Gill *et al.*, 2008).

En medicina humana se utiliza el fluorouracilo al 5% tópico en las lesiones preneoplásicas (dermatosis actínicas) y neoplásicas (Weinstock *et al.*, 2018), pero en medicina veterinaria su uso se considera peligroso si se ingiere, ya que es extremadamente tóxico en los animales de compañía (Snively *et al.*, 2010).

2.4.3.- Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica consiste en la aplicación tópica de un profármaco como el ácido aminolevulínico (ALA) o aminolevulinato de metilo seguido de un período de incubación definido en que el medicamento es absorbido y convertido a la protoporfirina IX a través del metabolismo celular (Kibbi *et al.*, 2020). Luego, la protoporfirina IX se activa mediante el tratamiento con luz visible, que genera radicales libres, citotoxicidad y muerte celular (Alex *et al.*, 1999).

Tras la absorción de la energía luminosa, el sensibilizador se transforma de su estado fundamental a una molécula en estado de triplete excitado. El triplete excitado puede sufrir dos tipos de reacción. Puede transferir su energía al oxígeno directamente, para formar oxígeno singlete, un radical libre de oxígeno altamente reactivo (reacción de tipo II). Alternativamente, puede transferir su energía a moléculas intermedias que luego

reaccionan con el oxígeno para producir radicales libres (reacción tipo I) (Henderson y Dougherty, 1992).

El oxígeno singlete ha sido identificado como una de los principales elementos dañinos en la fototerapia (Weishaupt *et al.*, 1976). Los radicales libres provocan una serie de eventos intracelulares complejos, dañando las membranas celulares (membranas mitocondriales, retículo endoplásmico y membranas lisosomal, nuclear y plasmática) y culminando en la muerte celular. La liberación de mediadores inflamatorios de las células dañadas provoca vasoconstricción, agregación plaquetaria y estasis sanguínea, lo que lleva a la necrosis por coagulación. Los efectos combinados de estos procesos conducen a la muerte de las células tumorales (Stell *et al.*, 2001).

Varios ensayos clínicos y estudios retrospectivos de CCE han reportado tasas de recuperación completa con la terapia fotodinámica que van desde 50% a 100% (Cairnduff *et al.*, 1994; Bath-Hextall *et al.*, 2013) y se comparan con algunos tratamientos médicos (Morton *et al.*, 2006). La terapia fotodinámica tiene varias ventajas potenciales sobre otras terapias, como la baja morbilidad, excelentes resultados funcionales y estéticos, la corta duración del tratamiento y la capacidad para tratar el tejido circundante del tumor (O'Connell *et al.*, 2018).

Existe cierta controversia con respecto a la respuesta del tratamiento teniendo en cuenta parámetros como el tamaño de la lesión (Morton *et al.*, 2006) o la ubicación anatómica (Truchuelo *et al.*, 2012). El número de tratamientos y el tiempo de incubación de ALA también ha sido analizado con respecto a la eficacia en la eliminación de lesiones malignas y premalignas (Salim *et al.*, 2003).

La fototerapia con ALA y luz azul se considera un método efectivo y bien tolerado para los casos de CCE. La fototerapia puede proporcionar, además, el beneficio adicional de tratar lesiones premalignas actínicas en los márgenes de la zona tratada (Christensen, 2018), para prevenir la formación de carcinomas en pacientes de alto riesgo con múltiples lesiones. De esta manera, la fototerapia puede tratar tanto CCE *in situ* y prevenir lesiones posteriores (Willey *et al.*, 2010).

Con un único tratamiento, se han observado respuestas completas en nueve de cada diez lesiones, que incluyen el plano nasal, lesiones auriculares y palpebrales. La tasa de respuesta completa general para las lesiones tratadas con un único tratamiento de terapia fotodinámica se ha mostrado con un 85% (Stell *et al.*, 2001).

2.4.4.- Terapia quirúrgica

Tradicionalmente, la escisión quirúrgica se ha considerado el tratamiento de elección en este tipo de tumores (Withrow y Straw, 1990; Hauck, 2013). La incisión debe ser amplia para lograr márgenes limpios del tumor y la elección correcta de los límites de los márgenes de escisión es fundamental para tener éxito en la cirugía. En la mayoría de los casos suele tratarse de cirugías radicales y la limitación principal es la estética. Se considera el tratamiento más exitoso para tratar las lesiones en etapas avanzadas (T3 o T4) del pabellón auricular, los párpados y el plano nasal. Sin embargo, la principal limitación de la cirugía es que el resultado final suele ser inaceptable para algunos tutores (Murphy, 2013). Los animales con CCE cutáneo con diagnóstico temprano y grados bajos pueden tener un pronóstico excelente después de una cirugía agresiva, con tiempos de supervivencia que oscilan entre 67 y 1860 días (promedio de 673 días) (Moore y Ogilvie, 2001).

Otra modalidad dentro de la cirugía es la utilización de láser quirúrgico de dióxido de carbono (CO₂). En la bibliografía, el uso del láser de CO₂ para la escisión quirúrgica en medicina veterinaria se ha descrito en algunos artículos (Bartels, 2002; Paczuska *et al.*, 2014). Comparado con la cirugía convencional con bisturí, se ha visto una reducción en la pérdida de sangre y el sellado de pequeños vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas (Hernandez-Divers *et al.*, 2008). Además, existen evidencias de que se puede reducir la contaminación intraoperatoria con células cancerígenas (Holt y Mann, 2002). Por lo tanto, estos efectos pueden prolongar los días libres de enfermedad en gatos a los que se les extirpa el CCE cutáneo mediante láser de CO₂. La estenosis de las fosas nasales es una complicación en las técnicas de escisión quirúrgica convencional, por lo que se suelen colocar tubos nasales (Hendrick *et al.*, 1995).

Este tipo de láser gaseoso emite una luz infrarroja con una longitud de onda de unos 10.600 nm (Kaplan, 2010). Este potente gas produce coagulación, ablación y cortes en el tejido blando y la energía es absorbida por los tejidos que presentan alta concentración de agua en su composición, que antes de transformar esta energía en calor, crean una ebullición celular (Omi y Nomano, 2014). Las ventajas del láser de CO₂ incluyen el control del sangrado, el edema del tejido y la posibilidad de presentar menos dolor post operatorio (Ize-Iyamu *et al.*, 2013). Sin embargo, el láser de CO₂, puede producir retraso en la cicatrización de los tejidos, al producirse necrosis (Paczuska *et al.*, 2014).

La reconstrucción microvascular representa una alternativa innovadora en el abordaje quirúrgico del CCE oral. Tras la resección extensa del tumor, que frecuentemente implica la eliminación de una porción significativa del hueso mandibular, es posible recurrir a esta técnica para recuperar tanto la forma como la funcionalidad de la zona afectada. El procedimiento consiste en trasplantar un segmento óseo vascularizado, usualmente tomado del peroné o del radio, con el objetivo de reemplazar el hueso extraído. Posteriormente, mediante técnicas de microcirugía, los vasos sanguíneos del injerto se conectan a la red vascular cervical del paciente. Este enfoque no solo permite una adecuada integración del tejido trasplantado, sino que también contribuye a mejorar notablemente la calidad de vida del animal al permitirle retomar funciones básicas como la alimentación e hidratación (Yoshikawa *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2019).

2.4.5.- Radioterapia

La radiación es una modalidad de tratamiento de tumores donde el objetivo principal es la muerte de las células neoplásicas, respetando el tejido sano adyacente (Hand *et al.*, 2004).

En el momento del diagnóstico, si las lesiones neoplásicas ya se encuentran en estadios avanzados, en muchas ocasiones, los tratamientos convencionales, como la cirugía con márgenes amplios y la criocirugía, no son factibles. Hasta hace unas décadas, la radioterapia era el único tratamiento disponible en estos casos (MacEwen *et al.*, 1987; Moore y Ogilvie, 2001).

En la literatura se describe que las lesiones avanzadas tienen menos éxito con la radioterapia que las lesiones en estadios iniciales (Theón *et al.*, 1995; Moore y Ogilvie, 2002). Un estudio analizó el pronóstico de 90 lesiones de CCE en felinos tratadas con radioterapia, y llegó a la conclusión de que las neoplasias estadificadas como T1 tenían una mejor respuesta que las neoplasias estadificadas como T4 (Theón *et al.*, 1995).

En general, el 88 % de los gatos con CCE cutáneo en estadio temprano están libres de enfermedad durante 1 año después del tratamiento con radioterapia, frente a solo el 36 % de los gatos con CCE cutáneo avanzado (Moore y Ogilvie 2001).

2.4.6.- Plesioterapia

Dentro de la radioterapia, existe una modalidad denominada plesioterapia, que consiste en la aplicación terapéutica directa/superficial de una fuente de radiación a un área de patología. Se utiliza estroncio 90 (90Sr) y se ha demostrado su efectividad en el tratamiento del CCE ocular en pacientes humanos (Cerezo *et al.*, 1990), en perros (Andrade *et al.*, 2003; Nevile *et al.*, 2015), y en neoplasias cutáneas (Foster *et al.*, 1999; Hardman y Stanley, 2001; Hammond *et al.*, 2007) y oculares felinas (Bailey, 2023).

2.4.7.- Microbraquiterapia

Se ha desarrollado la técnica de “microbraquiterapia”, como opción de tratamiento para tumores inoperables, mediante inyección intratumoral directa de microesferas radiactivas de holmio-166 (166Ho). El 166Ho emite radiación β que potencialmente permite una dosis alta, ablativa y absorbida de radiactivos en el tejido tumoral sin afectar los tejidos circundantes. La aplicación de microbraquiterapia con 166Ho condujo a respuestas prometedoras en pacientes felinos con CCE irresecable (Van Nimwegen *et al.*, 2018).

La microbraquiterapia intratumoral se considera un tratamiento eficaz y mínimamente invasivo con una morbilidad mínima y efectos secundarios limitados. La optimización del procedimiento puede mejorar la distribución espacial de 166Ho MS dentro del tumor después de la inyección, especialmente en tumores grandes, y dar como resultado una tasa de respuesta tumoral mejorada (Van Nimwegen *et al.*, 2018).

2.4.8.- Quimioterapia

La quimioterapia sistémica es una terapia utilizada frecuentemente en el tratamiento de neoplasias, a pesar de la cantidad de salvedades relativas al hecho de que se basa principalmente en pautas de administración pulsátil utilizando las dosis máximas toleradas de fármacos citotóxicos. Basándose en la tolerancia media del medicamento y considerando que los medicamentos contra neoplasias son más tóxicos que los medicamentos pertenecientes a otras categorías, esto a menudo resulta en una alta morbilidad y mortalidad para los pacientes. Debido a esto, se pautan pausas entre las administraciones de las dosis de quimioterapia para permitir la recuperación de los efectos secundarios (Emmenegger *et al.*, 2004).

La quimioterapia se ha utilizado para controlar la enfermedad local o reducir el estadio de la enfermedad macroscópica, pero su uso ha sido limitado en CCE felino debido a la baja tasa de respuesta (Theon *et al.*, 1996; Martinez-Ruzafa *et al.*, 2009; Murphy, 2013). La quimioterapia con carboplatino intratumoral se considera segura y eficaz en gatos con CCE del plano nasal (Theon *et al.*, 1996).

2.4.8.1.- Toceranib

Uno de los tratamientos de quimioterapia oral utilizados en la clínica diaria es el fosfato de toceranib, que suele ser bien tolerado en gatos y perros, y mejora los tiempos de supervivencia, especialmente cuando se combina con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). La administración de AINEs también se asocia con mejores tiempos de supervivencia (Wiles *et al.*, 2017). El toceranib es un inhibidor que bloquea varios receptores de tirosina quinasa que se encuentran en la superficie celular, incluido el KIT (Split-quinasas), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas, la tirosina quinasa FMS 3 y el Flt-3 (Mitchell *et al.*, 2012).

Los receptores tirosina quinasa (RTQ) son unas proteínas de membrana a través de las cuales median sus efectos la mayoría de los factores de crecimiento. La activación de los RTQ participa en la mediación de muchos procesos, incluyendo el crecimiento celular, la supervivencia celular, la formación de nuevos vasos (neovascularización) y la reparación de los tejidos (Druker *et al.*, 1996). Existe un RTQ que se denomina KIT, expresado en la superficie de las células madre hematopoyéticas, así como en otros tipos de células. El KIT ó c-KIT, también llamado CD117 ó Kit del receptor de células madre del factor de crecimiento de mastocitos (SCFR) (Abbaspour Babaei *et al.*, 2016). Hasta donde sabemos, las mutaciones en los genes que codifican KIT aún no se han identificado en el CCE felino (Žagar y Schmidt, 2023), aun así, se sigue utilizando en oncología felina.

El toceranib produce una inhibición competitiva del trifosfato de adenosina en los receptores y previene la fosforilación del mismo y la consecuente activación de las vías de señalización asociadas (London *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de toceranib en tumores sólidos aún no se ha establecido por completo, pero puede deberse a efectos antitumorales directos, inhibición de la angiogénesis o ambos (London *et al.*, 2012). Al inhibir la fosforilación del KIT, suprime la proliferación celular e induce el arresto del ciclo celular en la fase G1, así como apoptosis de las líneas malignas de los mastocitos *in vitro*, expresando varias formas de mutación del KIT (Halsey *et al.*, 2014). Debido a todo lo expuesto, se considera que este inhibidor de la tirosina quinasa es un tratamiento con alto grado de especificidad (Winkler *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2018).

Este fármaco fue desarrollado originalmente como un agente angiogénico, pero posteriormente se observó que poseía un potencial antitumoral a través de la inhibición de la autofosforilación del Kit y la proliferación de mastocitos (Hasley *et al.*, 2014). Por esta razón, es un tratamiento usado en los mastocitomas caninos, sin embargo, este fármaco, tiene actividad contra otros tumores en perros como el carcinoma mamario, el sarcoma de tejidos blandos y el adenocarcinoma de glándulas anales (London *et al.*, 2009).

Los inhibidores de la tirosina quinasa (ITQ) con frecuencia pueden producir toxicidad en los tejidos sanos, posiblemente por el efecto de la inhibición mantenida en el tiempo de los receptores de tirosina quinasa, expresados en los tejidos normales. Pueden producir anorexia, vómitos, diarrea y sangrado en el sistema gastrointestinal en los pacientes tratados (London *et al.*, 2009). La anorexia es un hallazgo común en gatos tratados con toceranib; sin embargo, la alta incidencia de anorexia antes del tratamiento sugiere que

muchos de estos pacientes experimentan anorexia debido a las lesiones de CCE (Harper y Blackwood, 2017; Merrick *et al.*, 2017).

Según los datos que se manejan, el toceranib puede tener potencial hepatotóxico en gatos, evidenciándose en algunos casos, elevaciones de la ALT, hiperbilirrubinemia, elevación leve de la fosfatasa alcalina sérica, cardiotoxicidad y muerte. A pesar de estos datos, también se han observados aumentos de la supervivencia a largo plazo con un beneficio clínico en >56 % de los gatos tratados con toceranib (Rathore *et al.*, 2014; Merrick *et al.*, 2017). Otro de sus efectos tóxicos, que es bien conocido, es la inducción de leve neutropenia, sin embargo, con frecuencia se resuelve con el tiempo. Se ha descrito en la especie canina, el desarrollo de temblores musculares, que se tratan con AINEs, tramadol u otras drogas. Curiosamente, este efecto tóxico en perro, desaparecen una vez que la terapia se reinicia (London *et al.*, 2009).

En gatos no hay evidencias de que produzca proteinuria o cojera, como ocurre en perros (Merrick *et al.*, 2017; Žagar y Schmidt, 2023). Por otro lado, con respecto a los efectos tóxicos, hay que tener en cuenta que, como ocurre con muchos perros tratados con toceranib, la mayoría de estos animales ya han recibido terapia multimodal, incluida cirugía, radioterapia y quimioterapia citotóxica previa (Harper y Blackwood, 2017).

Aunque este tratamiento tienes grandes ventajas en el tratamiento del cáncer, aún existen ciertos retos que superar, como, por ejemplo, pacientes que, aunque son sensibles a los ITQ, las células son capaces de autorregularse contra la diana del inhibidor de tirosina. Por eso, hoy en día, existe una resistencia a los ITQ y la progresión de la enfermedad oncológica es inevitable (Togashi *et al.*, 2015). Se ha visto que estas moléculas inhiben la proliferación celular por inhibición de KIT pero también aumentan la expresión de COX-2, lo que sugiere un posible mecanismo para la resistencia al tratamiento y una justificación para combinar masitinib o toceranib con un inhibidor de la COX-2 (Rathore *et al.*, 2014).

2.4.8.2.- Metotrexato

Se ha estudiado el uso de este fármaco antimetabólico (retrasa el crecimiento celular) de uso humano para el cáncer de mama o la psoriasis, en líneas celulares (*in vitro*) de CCE oral felino, con buenos resultados. Las dosis efectivas que se utilizaron eran más bajas que las usadas en medicina humana, por lo que su uso para el CCE oral en felinos parece una buena opción (Tortochaux *et al.*, 2011; Piegols *et al.*, 2018).

2.4.9.- Electroquimioterapia

2.4.9.1.- Introducción a la electroquimioterapia

La electroquimioterapia (EQT) se ha mostrado eficaz para tratar neoplasias sólidas en diversos tipos histológicos, y se ha utilizado en medicina humana desde 1991. En medicina veterinaria, el primer caso descrito data de 1997 (Devauchelle *et al.*, 1997). La EQT ha sido investigada durante los últimos 15 años como tratamiento paliativo, adyuvante, neoadyuvante o administrada en el momento de la cirugía en multitud de lesiones neoplásicas (Maglietti *et al.*, 2016; Spugnini *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2023).

Este tratamiento presenta una serie de propiedades únicas como la alta especificidad enfocada en las células cancerígenas, el alto grado de efecto localizado, la capacidad de conservar la respuesta inmunitaria innata y la estructura de la matriz extracelular (Miklavčič, 2012; Simčič *et al.*, 2021).

Esta terapia se basa en la electroporación (creación de poros en la membrana celular) reversible y temporal de las células tumorales, mediante la aplicación de pulsos eléctricos, con electrodos diseñados para este fin. El objeto de permeabilizar la membrana celular es la de permitir el ingreso de agentes citotóxicos al espacio intracelular, causando de esta manera que su efectividad aumente considerablemente (Spugnini y Porrello, 2003; Cemazar y Sersa, 2019) (Figura 3).

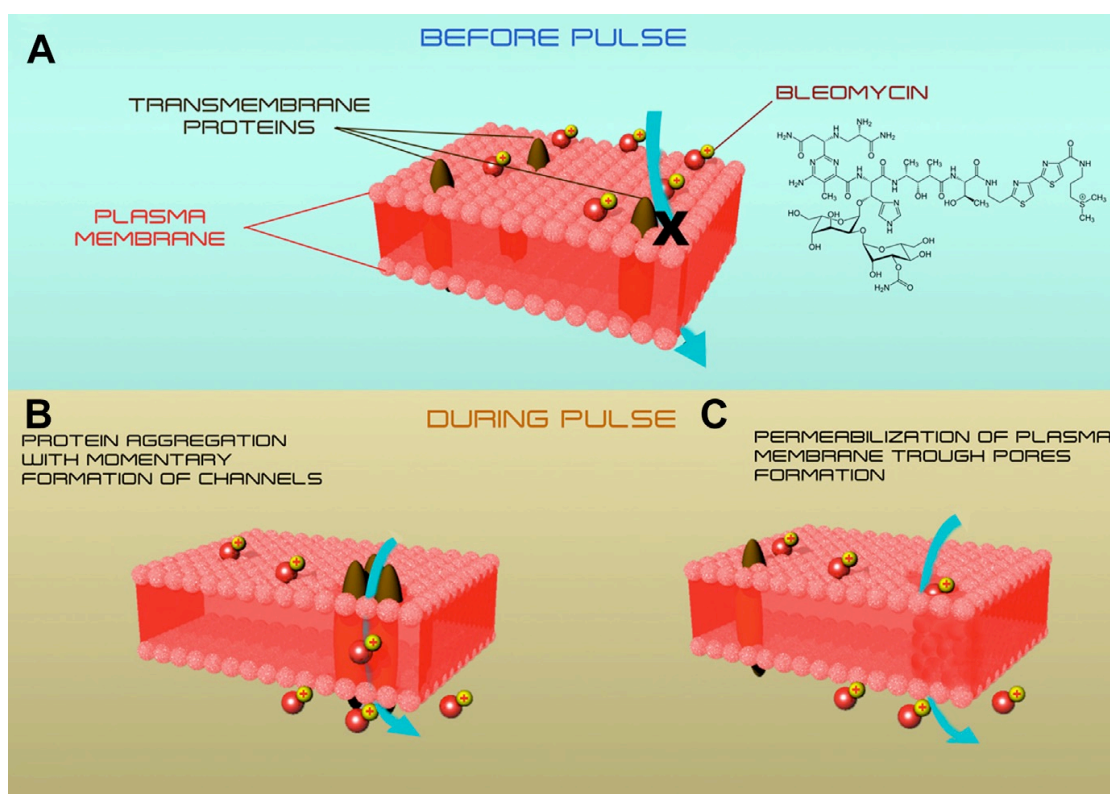


Figura 3: Mecanismos de perfusión del fármaco tras la electroporación. (A) Membrana citoplasmática antes de la aplicación de pulsos permeabilizantes: el fármaco lipofóbico no puede entrar en la célula sin la intervención de un transportador transmembrana. (B) Los pulsos permeabilizantes inducen transmembrana y/o (C) la formación de poros en la bicapa lipídica de la membrana (Spugnini y Baldi, 2019).

Cuando una célula es expuesta a un campo eléctrico externo, un voltaje transmembrana induce en la célula la creación de estos poros en su superficie. Este voltaje debe exceder el valor límite, para que se produzca la electroporación y se formen estos poros hidrofílicos y comience el flujo de moléculas a través de la membrana celular hacia su interior (Daskalov *et al.*, 1999; Kotnik *et al.*, 2010) (Figura 4).

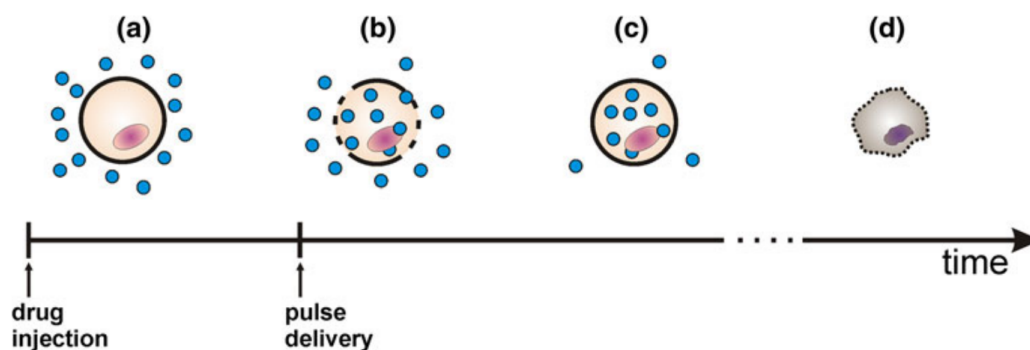


Figura 4: Esquema donde se representa una célula rodeada de una molécula hidrofóbica (azul) y cómo al recibir pulsos eléctricos se crean poros (electroporación), y se produce la entrada de la droga a través de la membrana celular (Miklavčič, 2012).

Aunque el límite para la electroporación depende de numerosos factores físicos, como el tamaño y la forma de la célula, factores biológicos como la estructura del citoesqueleto y la composición de la membrana, así como los parámetros eléctricos de amplitud, duración, número de pulsos y la frecuencia de repetición de éstos, es posible lograr la electroporación *in vitro* e *in vivo* independientemente del tipo de célula o tejido (Teissie *et al.*, 2005; Dos Anjos *et al.*, 2020).

2.4.9.2.- Electroporadores y parámetros de pulso

Los parámetros de pulso estándar aceptados para EQT son 8 pulsos monopoles de onda cuadrada de 100 μ s, con una frecuencia de repetición de 1 a 5.000 Hz, con una relación voltaje-distancia de 1.000 a 1300 V/cm, dependiendo de los electrodos utilizados. La frecuencia de repetición no afecta a la respuesta. Cuando se utilizan frecuencias superiores a 100 Hz, solo se ve una contracción muscular que mejora la tolerancia y la comodidad para el paciente (Pucihar y Miklavčič, 2002; Miklavčič *et al.*, 2005).

Los pulsos de onda cuadrada monopolar son el tipo de pulso preferido para EQT. Sin embargo, muchas configuraciones de pulsos bipolares también han mostrado buenos resultados (Spugnini *et al.*, 2004; Spugnini y Baldi., 2019). Se necesita más investigación para determinar si hay beneficios de usar pulsos bipolares en la electrotransferencia de genes o la EQT (Maglietti *et al.*, 2020; Potočnik *et al.*, 2021).

2.4.9.3.- Fármacos utilizados

Se utilizan agentes lipofóbicos combinados con la electroporación, promoviendo la muerte celular después de mejorar la captación de estos fármacos dentro de las células neoplásicas (Cemazar y Sersa, 2008; Murphy, 2013; Spugnini *et al.*, 2015; Diop *et al.*, 2024). El mecanismo de acción de esta terapia, consiste en estos cambios en la membrana celular que se han descrito y se han podido observar bajo microscopía electrónica, con la cual se han visto defectos en la organización dinámica de los lípidos y proteínas de la membrana, que culminan con la formación de áreas que presentan estructura de poros, con una intensa agrupación de las proteínas transmembranales (Spugnini *et al.*, 2007; Maglietti *et al.*, 2016; De Castro Cunha *et al.*, 2023).

Estos cambios sugieren que las alteraciones en los lípidos y las proteínas, y la cohesión de las proteínas alteradas, producen cambios en la polaridad al mismo tiempo que

cambian la orientación de las cabezas de los lípidos en las membranas celulares. Finalmente, el flujo intercelular de microvesículas en las células cancerígenas cesa, seguida de la destrucción de los orgánulos, por los pulsos eléctricos, e inducido por deterioro de las citoquinas y patrones de señalización intracelular (Spugnini *et al.*, 2009; Simčič *et al.*, 2021).

2.4.9.3.1.- Bleomicina

La bleomicina se ha considerado el fármaco citotóxico fundamental de la EQT, ya que su captación se facilita después de la permeabilización de la membrana celular por pulsos eléctricos (electroporación), lo que produce un aumento de la citotoxicidad en 700 veces (Spugnini *et al.*, 2019). La bleomicina produce la fragmentación del ADN, lo que da como resultado la detención de la fase G2-M del ciclo de replicación celular de las células neoplásicas (Maglietti *et al.*, 2016; Spugnini *et al.*, 2016; Spugnini *et al.*, 2019).

Este fármaco puede atravesar la membrana celular utilizando receptores proteicos específicos, ya que su naturaleza lipofílica evita que pueda difundir (difusión simple), lo que se traduce en una lenta y extremadamente limitada entrada en condiciones normales (Pron, 1993). El complejo formado entre la bleomicina y el receptor de membrana es transferido al citosol mediante endocitosis utilizando vesículas. Una vez se encuentra en el núcleo, la bleomicina, rápidamente produce alteraciones en el ADN, que es similar a la que produce la radiación (Pron *et al.*, 1993; Tounekti *et al.*, 1993). La toxicidad de la bleomicina cuando esta alcanza el ambiente intracelular está limitada por su tipo de difusión (menos del 0.1% alcanza su diana en cultivos celulares) a través de la membrana (Pron *et al.*, 1993; Dos Anjos *et al.*, 2020). Por esta razón, a pesar de su potencial terapéutico, el uso de la bleomicina estuvo limitado en el ámbito clínico, hasta que se observó que su citotoxicidad aumentada significativamente mediante el uso de la electroporación, lo que ha provocado que se haya retomado su uso (Spugnini y Porrello, 2003; Sersa *et al.* 2008; Diop *et al.*, 2024).

En la EQT para tratar los CCE en gatos, el citostático elegido para la administración intravenosa es también la bleomicina. Se puede utilizar inyectándolo directamente en la lesión (intratumoral) e incluso, combinar con la inyección por vía intravenosa. Tras su ingreso en el paciente y su distribución en el espacio intersticial de las células, se procede a la aplicación de una serie de pulsos eléctricos que se aplican en el área directamente con electrodos diseñados para cada localización o tipo de lesión. La propia electricidad, además del efecto del quimioterápico en el ADN de las células cancerígenas, puede destruir por sí sola, a las células (Spugnini *et al.*, 2009; Spugnini y Baldi, 2019).

Los estudios han utilizado diferentes dosis de bleomicina que oscilan entre 15 y 30 mg/m² en gatos diagnosticados con CCE con resultados variables (Spugnini *et al.*, 2015; Tozon *et al.*, 2015; Spugnini *et al.*, 2019; Diop *et al.*, 2024). En humanos se ha propuesto una dosis reducida (10.000 UI/m²) para mostrar la misma eficacia que la dosis estándar (15.000 UI/m²) en pacientes ancianos con neoplasias de piel no melanomas en cabeza y cuello. Además, otros autores también han utilizado una dosis reducida de 10 mg/m² y han obtenido buenos resultados en humanos (Mir *et al.*, 1998).

Dado que la dosis reducida presentó buenos resultados en humanos, se planteó la hipótesis que los gatos podrían beneficiarse de los tratamientos con dosis reducidas. Por lo tanto, el estudio tuvo como objetivo evaluar la clínica, parámetros, localización de la lesión, estadificación, intervalo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia, comparando la dosis estándar de bleomicina (15.000 UI/m²) con una dosis reducida (10.000 UI/m²) en gatos con CCE, que se sometieron a EQT como única modalidad de tratamiento (Dos Anjos *et al.*, 2020).

2.4.9.3.2.-Cisplatino

En la EQT se usan bleomicina o cisplatino (ambos agentes lipofóbicos), y su eficacia ha sido demostrada en diversos tipos de tumores con diferentes resultados (Cemazar *et al.*, 2019). El cisplatino, puede aumentar su concentración y citotoxicidad mediante el mismo mecanismo, sin embargo, su captación está menos influenciada por la aplicación de pulsos eléctricos y es por ello, que ha sido menos investigado (Tozon *et al.*, 2001). Al igual que ocurre con la bleomicina, el cisplatino, presenta poca permeabilidad a la hora de atravesar la membrana celular, por lo que también es más efectivo al aplicarlo junto con la electroporación (Miklavčič, 2014). El cisplatino está contraindicado en gatos debido a su grave toxicidad pulmonar, que puede provocar edema pulmonar agudo y ser potencialmente mortal. Por lo tanto, este fármaco no debe administrarse a gatos por ninguna vía (Maglietti *et al.*, 2020; Tellado *et al.*, 2022). En el caso de los perros la vía de elección es la intratumoral cuando se utiliza en EQT en una concentración de 1mg/ml. En pacientes caninos se puede usar por la vía intravenosa, pero tiene un potencial nefrotóxico importante (Tellado *et al.*, 2022). En aves está descrita la administración de cisplatino intratumoral a dosis de 1mg/kg combinada con la electroporación (Tellado *et al.*, 2022).

2.4.9.3.3.- Carboplatino

Otro agente quimioterápico, menos usado que la bleomicina, es el carboplatino, utilizado para tratar diversos tipos de tumores en animales, como osteosarcomas, carcinomas de células transicionales y melanomas. En perros, la dosis intravenosa recomendada es de 300 mg/m², administrada en infusión durante 16 a 60 minutos cada 3 semanas. Es fundamental evitar el uso de agujas o equipos que contengan aluminio durante su preparación y administración, ya que el aluminio puede reaccionar con el carboplatino, formando precipitados y reduciendo su eficacia. La monitorización regular de hemogramas completos, recuento de plaquetas y parámetros bioquímicos es esencial para detectar posibles efectos adversos, como mielosupresión o toxicidad renal (Maglietti *et al.*, 2020; Diop *et al.*, 2024).

En gatos, el uso de carboplatino requiere precauciones adicionales. Aunque algunas fuentes indican que puede administrarse por vía intravenosa a dosis de 230-250 mg/m² cada 21 días, otras fuentes señalan que no se recomienda su uso en felinos debido a la falta de estudios concluyentes sobre su seguridad y eficacia en esta especie (Tellado *et al.*, 2022).

2.4.9.3.4.- Calcio

Una sustancia que ha surgido como alternativa a la bleomicina y el cisplatino, es el calcio, que se usa a dosis de 8.8 mg/ml (220 Mm). Su mecanismo de acción consiste cuando entra en el citoplasma celular, provocar apoptosis por depleción de ATP. El calcio ha mostrado menor eficacia que la bleomicina o el cisplatino, ya que posee poca selectividad para las células en replicación, aunque su efectividad se sitúa en el 70%. Se usa principalmente en medicina equina, aunque en pequeños animales se usa principalmente como una alternativa en hembras gestantes, donde los quimioterápicos están contraindicados (Falk *et al.*, 2018; Frandsen *et al.*, 2020).

2.4.9.3.5.- Otros fármacos

Otros fármacos que han demostrado su eficacia *in vitro* mediante la electroporación, potenciando su eficacia, son la peplomycin, ciclofosfamida y mitomicina (Vásquez, 2012). Se han llevado a cabo estudios experimentales *in vitro* sobre la doxorubicina, 5-fluorouracilo y taxol, siendo moderadamente efectiva sólo la doxorubicina en la EQT para sarcomas (Jaroszeski *et al.*, 2002).

2.4.9.4.- Indicaciones de la electroquimioterapia

La EQT se está investigando y utilizando en el tratamiento del CCE y otros tipos de tumores, valorando su eficacia y tasa de efectos adversos. El uso de EQT en medicina veterinaria ha ido en aumento en los últimos años, como terapia única o en combinación con terapias convencionales (cirugía y quimioterapia) obteniéndose buenos resultados en tumores de diferentes grados histológicos y localizaciones, siendo los tumores con localización en la cabeza y el cuello, y especialmente en cavidad oral, en los que más se ha utilizado (Spugnini y Porrello, 2003; Tellado *et al.*, 2022; Diop *et al.*, 2024).

La EQT puede ser particularmente útil para tumores que son difíciles de tratar con cirugía, o radioterapia, o para tumores recidivantes, que han reaparecido después de tratamientos previos (Spugnini y Baldi, 2019). Los estudios han demostrado que la EQT puede ser una opción de tratamiento eficaz para el CCE en gatos, con una alta tasa de control del tumor y efectos secundarios mínimos. Sin embargo, la EQT puede no ser adecuada para todos los casos de CCE en gatos. La decisión de utilizar la EQT debe tomarse caso por caso, teniendo en cuenta factores como el tamaño y la ubicación del tumor, la salud general del gato y las preferencias y el presupuesto del propietario (Maglietti *et al.*, 2016).

Debido al alto grado de efectividad, se están desarrollando nuevas técnicas, electrodos y tecnología para tratar tumores sólidos internos como en el hígado, metástasis óseas, sarcomas de tejidos blandos, tumores cerebrales, en colon y recto, así como tumores esofágicos (Miklavčič, 2012). Tras los ensayos e informes de pacientes humanos (Daskalov *et al.*, 1999), se han realizado varios ensayos en gatos y perros con neoplasias de aparición espontánea utilizando ciclos de pulsos bifásicos electroporabilizantes. Los estudios preliminares fueron destinados a identificar las neoplasias que responden (Spugnini y Porrello, 2003) y posteriormente, a desarrollar electrodos adecuados (Spugnini *et al.*, 2005).

La EQT es una técnica que puede, además de reducir el tamaño del tumor, mejorar la calidad de vida de los pacientes con neoplasias, y aunque no fuese curativa, puede ofrecer un mayor tiempo de supervivencia con menor grado de dolor y sangrado (Maglietti *et al.*, 2016; Spugnini y Baldi, 2019). Sin embargo, la EQT tiene algunos efectos secundarios, como inflamación y dolor en el área de tratamiento. Además, no es adecuada para todos los tipos de tumores. Se puede producir una desfiguración en la zona tratada, resultante de la desaparición del tejido tumoral, pero los gatos con la enfermedad pueden vivir durante largos periodos de tiempo. Como para la mayoría de los tumores, es mejor tratar el CCE cutáneos cuando las lesiones son pequeñas y poco invasivas en el tejido debajo de la capa superior de la piel (Maglietti *et al.*, 2016; Tellado *et al.*, 2022).

En cuanto a los efectos secundarios, cabe señalar la existencia de estudios donde se observó mayor toxicidad del tratamiento local asociado con una mayor relación entre amplitud y distancia eléctrica (1200 frente a 1000 V/cm) (Togángliorrigiani *et al.*, 2019). La EQT ha mostrado una tasa de respuesta objetiva entre el 70 y 94% en lesiones primarias o metastásicas cutáneas, subcutáneas y mucocutáneas tanto en humanos como en animales (Devauchelle *et al.*, 1997; Sersa *et al.*, 2012).

2.4.9.5.- Otras aplicaciones de la electroquimioterapia

2.4.9.5.1.- Electrotransferencia génica

La posibilidad de permeabilizar de forma transitoria la membrana celular mediante la electroporación se emplea con éxito para la introducción de material genético. Los plásmidos específicos se conducen al interior de las células, se transcriben y se traducen para la secreción de la proteína. Los campos de aplicación de la electrotransferencia génica son numerosos: vacunas profilácticas y terapéuticas (oncológicas y antiinfecciosas), terapias oncológicas inmunoestimulantes, terapias génicas (enfermedades congénitas, psoriasis, maculopatía degenerativa) (Daud *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2024).

La investigación y el desarrollo en los últimos años han llevado a el resurgimiento de varios avances tecnológicos notables en las vacunas de ADN. Estos incluyen: optimización de construcciones de ADN; desarrollo de nuevos procesos de fabricación de ADN y formulaciones; aumento de las respuestas inmunes con nuevos adyuvantes moleculares codificados; y la mejora en estrategias de administración *in vivo* que incluyen la electroporación (EP) (Sardesai y Weiner, 2011; Kisakov *et al.*, 2024).

De estos, la entrada de antígenos mediada por la EP ha generado un entusiasmo considerable y parece haber tenido un gran impacto en la inmunogenicidad de las vacunas y su eficacia, al aumentar la entrada de antígenos en las células hasta 1000 veces más que si se introdujera el ADN desnudo (Sardesai y Weiner, 2011). De hecho, las respuestas inmunes y la protección contra los patógenos observadas después de la administración del ADN a través de la EP, en muchos casos es comparable o superior a otros formatos de vacunas bien estudiadas, como las que usan vectores virales y vacunas de virus vivos/atenuados/inactivados (Sardesai y Weiner, 2011; Kisakov *et al.*, 2024).

El uso de electrotransferencia para la introducción de ADN a células procarióticas y eucariotas *in vitro* ha sido bien estudiado y ampliamente utilizado durante muchos años. Sin embargo, sólo recientemente se han utilizado campos eléctricos para mejorar la transferencia de ADN a células animales *in vivo*, y esto se conoce como electrotransferencia génica o electroporación de ADN *in vivo* (Trezise, 2002; Sardesai y Weiner, 2011). Algunas de las ventajas de este método de transferencia de genes de células somáticas son que es un método simple que puede usarse para transferir casi cualquier fracción de ADN a células y tejidos animales *in vivo*; se pueden transfectar múltiples combinaciones de ADN; es igualmente aplicable a células en división y en reposo; no es necesario subclonar el ADN en un vector de transferencia viral específico y no hay necesidad de producir reservas virales de título alto; y, como no se expresan genes virales, hay menos posibilidades de que se produzca una reacción inmunológica adversa a las secuencias del vector (Trezise, 2002; Sardesai y Weiner, 2011).

Además de interesantes aplicaciones en biología del desarrollo embrionario, la electrotransferencia de ADN *in vivo* también se está utilizando para transferir genes al músculo esquelético e impulsar la expresión de proteínas terapéuticamente activas, y para examinar la función de genes y proteínas exógenas en células adultas normales situadas dentro del complejo entorno de un sistema de tejidos y órganos *in vivo* (Trezise, 2002; Sardesai y Weiner, 2011).

2.4.10.- Inmunoterapia

En el frente terapéutico, la inmunoterapia ha surgido como una nueva modalidad de tratamiento prometedora para el CCE oral. Al utilizar el propio sistema inmunológico del gato para combatir las neoplasias, las inmunoterapias, como los inhibidores de los puntos de control inmunológico, pueden mejorar potencialmente las tasas de supervivencia y la calidad de vida (Tài y Ngàn, 2023).

Por ejemplo, las terapias que inhiben la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o su ligando, PD-L1, podrían restaurar la capacidad del sistema inmunológico para reconocer y destruir las células neoplásicas. Aunque estos tratamientos aún se encuentran en etapas experimentales para gatos, se han mostrado prometedores resultados (Araya *et al.*, 2021).

Otro avance reciente en el tratamiento del CCE oral es la aplicación de terapia dirigida. Este enfoque utiliza fármacos diseñados para interferir específicamente con ciertos objetivos moleculares que desempeñan un papel crucial en el crecimiento, la progresión y la propagación de neoplasias. Algunas de estas terapias dirigidas incluyen inhibidores de la tirosina quinasa y anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, el uso de inhibidores de moléculas pequeñas que se dirigen a los receptores del factor de crecimiento implicados en el CCE oral podría ofrecer una forma de detener la progresión de la enfermedad (Gadde y Poda, 2023).

Por último, los sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnología ofrecen nuevas esperanzas en el tratamiento del CCE oral. Al aprovechar partículas a nanoescala, para administrar agentes terapéuticos directamente al sitio del tumor, estas

tecnologías pueden aumentar la eficacia de los fármacos y al mismo tiempo minimizar los efectos secundarios sistémicos. Los liposomas y las nanopartículas poliméricas, por ejemplo, pueden diseñarse para encapsular fármacos de quimioterapia, mejorando su acumulación en el sitio del tumor y reduciendo al mismo tiempo su distribución a los tejidos sanos. Esto es especialmente pertinente en el tratamiento CCE oral, donde la quimioterapia convencional a menudo produce un éxito mínimo debido a la naturaleza quimiorresistente de la enfermedad (Tài y y Ngàn, 2023).

2.4.11.- *Antinflamatorios no esteroideos (AINEs)*

La inflamación suele estar asociada a la progresión y el desarrollo de las neoplasias. Entre otros componentes, las ciclooxigenasas y la producción de prostaglandinas intervienen de forma importante en el desarrollo del proceso inflamatorio (Kumar *et al.*, 2014), razón por la cual, en esta última década, el estudio de su papel en la progresión y prevención del cáncer ha sido ampliamente investigado. La enzima prostaglandina G/H sintetasa, también conocida como ciclooxigenasa (COX), controla la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Se reconocen fundamentalmente tres isoformas de esta enzima: ciclooxigenasa-1 (COX-1), ciclooxigenasa-2 (COX-2), ciclooxigenasa-3 (COX-3) (Smith *et al.*, 2000). La COX-1 se expresa en una amplia variedad de células y tejidos como la corteza renal, la mucosa gástrica y también sobre plaquetas y endotelio vascular. Es la responsable de mantener las funciones esenciales del sistema digestivo, urinario y cardiovascular, mediante la síntesis de eicosanoides (Zmigrodzka *et al.*, 2018). La COX-2 es una enzima que se suele inducir en respuesta a citoquinas asociadas a enfermedades inflamatorias y a carcinogénesis (Bernard *et al.*, 2008). Esta isoforma favorece la angiogénesis, la invasión tisular por parte de células tumorales y la resistencia tumoral a la apoptosis (Xu *et al.*, 2014). De acuerdo con varios de los estudios citados, la tercera isoforma COX-3 es la más abundante en la corteza cerebral de humanos, ratones y perros, relacionándola con el desarrollo de los glioblastomas (Zmigrodzka *et al.*, 2018).

En los diversos estudios en los que se ha evaluado la sobreexpresión de COX-2 en animales, se ha establecido que ésta se sobreexpresaba en varios tipos de tumores tanto felinos como caninos de la piel, glándulas mamarias, vejiga urinaria, intestinos y huesos, entre otras localizaciones (Doré, 2011; Millanta *et al.*, 2014). Pero aún son pocos los estudios en animales que aborden el tratamiento farmacológico del CCE con este tipo de drogas. Respecto a los AINEs no específicos de COX-2, como el piroxicam, se ha observado que pueden tener un efecto antitumoral en perros con CCE (Knapp *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2001). La eficacia de los AINEs específicos de COX-2 como los Coxibs en el tratamiento del CCE no está tan documentada. No existen estudios específicos de este carcinoma en los que se hayan utilizado clínicamente Coxibs como terapia contra el cáncer. Aun así, debido a la característica sobreexpresión de la enzima COX-2 en sus células cancerígenas y a los estudios experimentales y clínicos que se han elaborado con este tipo de fármacos en otras neoplasias similares, estaría justificado proponer un fármaco de este tipo para su tratamiento.

2.4.12.- *Otros tratamientos*

En la literatura se citan algunos tratamientos preventivos como el tatuaje de lesiones y el uso de betacarotenos, que deberían utilizarse al establecer el diagnóstico de queratosis actínica (Lucas y Larsson, 2006).

2.5.- ELECTROQUIMIOTERAPIA EN OTROS TUMORES Y/O ESPECIES

Diversos estudios y artículos han descrito la eficacia de este tratamiento en animales de compañía con neoplasias espontáneas (Tozon *et al.*, 2005; Spugnini *et al.*, 2009; Spugnini *et al.*, 2019; Dos Anjos *et al.*, 2019; De Castro Cunha *et al.*, 2023). La EQT tiene la ventaja de ser efectiva en otro tipo de tumores, y no sólo en el CCE.

2.5.1.- Sarcoma de tejidos blandos

Uno de estos ejemplos, es el Sarcoma de tejidos blandos (STB). La EQT ha demostrado ser una terapia segura y eficaz para el control local de STB en animales de compañía, especialmente cuando se administra de forma adyuvante a través de la generación de trenes de pulsos bifásicos (Spugnini y Porrello 2003; Spugnini *et al.*, 2005; Spugnini *et al.*, 2006; Spugnini *et al.*, 2007). Actualmente, se siguen haciendo ensayos clínicos en animales de compañía, con los diferentes subtipos de STB tratados con EQT, mostrando resultados prometedores e identificando patrones de respuesta y factores pronósticos muy útiles (Spugnini *et al.*, 2007).

En los STB se debe considerar el uso de la EQT con bleomicina junto con cirugía como una opción de tratamiento para el STB canino, especialmente los localizados en una extremidad donde se prefiere el tratamiento conservador (no realizar amputación) o cuando la cirugía no se puede realizar con márgenes amplios o combinar con radioterapia. Además, la EQT como monoterapia debe considerarse una opción de tratamiento en aquellas lesiones diagnosticadas de STB de tamaños pequeños y que no son factibles, o son rechazadas otras estrategias terapéuticas (Torrighiani *et al.*, 2019).

2.5.2.- Tumores de estirpe epitelial

En cuanto a los tumores de estirpe epitelial, encontramos el carcinoma intranasal, donde la aplicación de EQT puede ser eficaz en la eliminación del tumor en la cavidad nasal. Los hallazgos clínicos demuestran que la proximidad ósea con el electrodo (<3 mm) es un factor importante a considerar en aplicaciones de EQT en esta localización. Para mejorar la conductividad de la electricidad en esta zona se puede utilizar una instilación de solución salina al 0,9 % NaCl, así como la propia sangre que pueda existir alrededor de la lesión (Suzuki *et al.*, 2017).

La EQT ha demostrado ser una terapia exitosa y eficiente en el tratamiento de los carcinomas de células basales (CCB), incluso en una amplia gama de tipos histológicos tumorales, aunque el CCB parece ser altamente sensible. En todos los tumores en general, pero en el caso del CCB en particular, el tamaño de la lesión es relevante, donde las lesiones de menos de 3 cm² consistentemente muestran tasas de respuesta más altas. Se han hecho estudios retrospectivos que demuestran, no sólo la eficacia, sino además los

tiempos largos libres de enfermedad de los pacientes tratados con EQT (Clover *et al.*, 2020).

Otra aplicación de la EQT es el tratamiento de los tumores de células apocrinas. Los tratamientos convencionales aplicados en este tipo de tumores eran la cirugía, radioterapia, el tratamiento médico o una combinación de todas estas técnicas (Potanas *et al.*, 2015; Barnes y Demetriou, 2017; Meier *et al.*, 2017; Valenti *et al.*, 2021). La cirugía se considera el mejor tratamiento en el caso de los perros, con lesiones no metastásicas o metástasis en linfonodos regionales (centinelas) (Skorupski *et al.*, 2018), con intervalos libres de enfermedad de la cirugía, con o sin terapia adyuvante, de 262 a 443 días (Potanas *et al.*, 2015; Wouda *et al.*, 2016). En el caso de la EQT se demuestra que puede mejorar o paliar los signos clínicos relacionados con los tumores de células apocrinas, incluso cuando hay metástasis en los linfonodos regionales. Debido a la tolerabilidad y la viabilidad de la EQT, hacen que este tratamiento sea una opción válida para perros con tumores de células apocrinas, siempre que el tutor rechace otras estrategias terapéuticas, como la cirugía y/o radioterapia (Valenti *et al.*, 2021).

La experiencia sugiere que la cirugía como modalidad de tratamiento aislada es una de las mejores opciones en el tratamiento del CCE canino, no relacionado con la exposición solar, si es posible conseguir márgenes limpios (De Castro Cunha *et al.*, 2023). Sin embargo, muchos pacientes presentan múltiples tumores en el momento del diagnóstico, lo que dificulta el abordaje quirúrgico.

Por lo tanto, se necesitan nuevas técnicas para mejorar los resultados de los perros con neoplasias cutáneas (Dos Anjos *et al.*, 2019). En algunas neoplasias, se recomienda encarecidamente el uso de la EQT como terapia neoadyuvante, como en casos de neoplasias de cabeza y cuello humano no melanoma en los que el procedimiento quirúrgico de primera línea sería demasiado agresivo (Gargiulo *et al.*, 2012). En los casos de tumores múltiples, las ventajas significativas de la EQT frente a la cirugía en comparación con la cirugía convencional es que se pueden tratar numerosos tumores al mismo tiempo con buenos resultados estéticos, ya que su efecto sobre los tejidos normales es mínimo (Baltás *et al.*, 2017).

2.5.3.- Mastocitomas

Los mastocitomas se encuentran entre las neoplasias más comunes en medicina veterinaria, y pueden ser difíciles de controlar debido a su velocidad de crecimiento, localización y alto contenido de histamina y otras sustancias vasoactivas (Sledge *et al.*, 2016). La EQT puede utilizarse en casos de mastocitomas que no pueden ser extirpados de forma completa mediante cirugía o como tratamiento adyuvante combinado con ésta.

Uno de los primeros estudios publicados, fue la aplicación de EQT con bleomicina intralesional, en un grupo de 28 perros con mastocitomas extirpados de forma incompleta (Spugnini *et al.*, 2006). En otro ensayo se compararon los resultados aplicando la técnica de EQT con cirugía, deduciendo que la EQT podría ser una alternativa potencial a la misma (Kodre *et al.*, 2009). En un estudio prospectivo en el que se trató a 37 perros con mastocitomas de grado II y III extirpados de forma incompleta, con EQT combinada con

cisplatino, mostró una tasa de respuesta del 78% con efectos secundarios mínimos (Spugnini *et al.*, 2011). En otro informe se describe el uso de EQT en perros con mastocitomas como terapia de primera línea o como adyuvante de la cirugía. En este estudio retrospectivo, 51 perros con mastocitoma fueron clasificados en los siguientes grupos de tratamiento (15 casos sólo con EQT; 11 casos con EQT intraoperatoria; 14 casos con EQT adyuvante a la cirugía y 11 casos quirúrgicos seguidos con EQT). En este estudio, el grupo donde aplicó intraoperatorio, fue el que mostró el mejor intervalo libre de enfermedad (Lowe *et al.*, 2017).

En conjunto, estas observaciones demuestran que la EQT es una técnica eficaz y flexible que puede utilizarse sola o combinada con otras terapias, y que es una opción segura y factible para los mastocitomas extirpados de forma incompleta en animales de compañía (Spugnini *et al.*, 2006).

2.5.4.- *Melanoma canino*

En el caso de los melanomas, las opciones de tratamiento incluyen cirugía, quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia; sin embargo, aún son frecuentes las recurrencias locales y las metástasis a distancia. El melanoma ha sido uno de los primeros tumores de células redondas tratados con EQT (Spugnini y Baldi, 2019). En un pequeño estudio con 10 perros se aplicó EQT intralesional con bleomicina, en el que se obtuvo una respuesta del 80%, y de ellos, el 40% tuvo un control a largo plazo (> 1 año) (Spugnini *et al.*, 2006). Un factor que favoreció una respuesta más prolongada, fue la localización del tumor en zonas blandas de la cavidad oral, donde la ausencia de hueso permitía una distribución más homogénea del fármaco. Cabe destacar, que los pacientes con respuesta completa mostraron decoloraciones persistentes similares al vitíligo en las zonas tumorales, posiblemente secundarias al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria inducida por la EQT. También se ha descrito un caso clínico de melanoma anal en un perro, con respuesta paliativa satisfactoria en el que la EQT permitió preservar la funcionalidad anal (Spugnini *et al.*, 2007).

2.5.5.- *Plasmocitomas*

Los plasmocitomas son generalmente poco comunes en perros, representando alrededor del 3% de las neoplasias, y en gatos este número es aún menor, considerándose raros y observándose en aproximadamente el 1% de los casos. Aunque el uso de la cirugía de mandibulectomía o maxilectomía, para tratar plasmocitomas orales en perros está ampliamente descrito en la literatura, también es cierto que la electroquimioterapia, asociada a quimioterapia antineoplásica adyuvante, ha mostrado una supervivencia de 407 días en el plasmocitoma oral en gatos (De Oliveira, 2021), 515 días en el plasmocitoma oral en perros, 695 días en la localización digital y 240 días en la localización labial, sin comprometer la calidad de vida del paciente, demostrando que incluso con un tratamiento menos invasivo y conservador (Cunha, 2017; Dos Anjos, 2020; De Oliveira, 2021).

2.5.6.- *Linfoma cutáneo canino y felino*

El linfoma cutáneo representa una neoplasia linfoproliferativa poco frecuente en perros y gatos, caracterizada por la infiltración neoplásica de linfocitos malignos en la piel. Se clasifica dentro de los linfomas extranodales y puede presentarse como una enfermedad primaria de la piel o formar parte de una diseminación sistémica. Histológicamente, se distinguen dos formas principales: el linfoma cutáneo epitelotrópico, predominante en linfocitos T, y el no epitelotrópico, asociado principalmente a linfocitos B (Rook, 2019; Mazaro *et al.*, 2023). En perros, el linfoma cutáneo epitelotrópico, también conocido como micosis fungoide, es la variante más común y suele manifestarse con lesiones cutáneas crónicas y progresivas, incluyendo placas, nódulos, alopecia, eritema y ulceraciones. Por su parte, en gatos, el linfoma cutáneo es menos frecuente, pero cuando ocurre, generalmente está asociado a presentaciones no epitelotrópicas y se observa en combinación con signos clínicos sistémicos más evidentes (Siewert *et al.*, 2022; Mazaro *et al.*, 2023).

En esta enfermedad, la estrategia central de tratamiento es la quimioterapia, pero existen casos puntuales en los que otras terapias como la cirugía, la radioterapia o la electroquimioterapia pueden resultar útiles. Tellado y colaboradores han tratado pacientes con linfoma cutáneo o linfomas de mucosas con buena respuesta local. La EQT se ha utilizado como tratamiento paliativo en pacientes donde la localización de las lesiones generaba deterioro de la calidad de vida. Además, aunque reciban quimioterapia sistémica, no fue necesario suspender ésta mientras se realizaba la EQECTT (Tellado *et al.*, 2022). En gatos con linfoma nasal y ocular, se lograron respuestas prolongadas, con tiempos de remisión promedio de 98 días. Sin embargo, la recurrencia sistémica en algunos casos subraya la necesidad de investigar nuevos protocolos y medicamentos para mejorar su eficacia (Spugnini, 2007).

2.6.- PERSPECTIVAS CLÍNICAS Y DE FUTURO DE LA ELECTROQUIMIOTERAPIA.

2.6.1.- Inmunomodulación inducida por electroquimioterapia.

La EQT está teniendo un enfoque terapéutico emergente, que suscita un creciente interés por sus posibles efectos inmunomoduladores en el tratamiento del cáncer, ya que puede ejercer esta respuesta a través de varios mecanismos (Ferioli *et al.*, 2024). La respuesta inmunitaria innata se desencadena cuando las células tumorales liberan estructuras moleculares asociadas al daño, como adenosín trifosfato (ATP) intracelular y las proteínas B1 de alta movilidad (HMGB1). Estas moléculas atraen a las células inmunitarias, incluidos macrófagos y neutrófilos al lugar de destrucción del tumor, promoviendo una respuesta inflamatoria (Sersa *et al.*, 2015). La EQT también induce la activación de las células dendríticas, células presentadoras de antígenos específicos, que desempeñan un papel crucial como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las células dendríticas activadas, procesan antígenos tumorales y los presentan a las células T, iniciando una respuesta inmunitaria adaptativa contra el tumor. A medida que se destruyen las células tumorales, se liberan antígenos que pueden ser captados por las células presentadoras de antígenos, lo que favorece aún más el desarrollo de una respuesta inmunitaria antitumoral específica (Sersa *et al.*, 2015).

Además, la EQT puede provocar la liberación local de citocinas y quimiocinas, lo que contribuye al aumento de las células inmunitarias y a la generación de una respuesta

inmunitaria más amplia. Esta respuesta inmunitaria local puede manifestarse ocasionalmente en actividad inmunitaria sistémica, lo que se conoce como “efecto abscopal” (Figura 5), en el que zonas tumorales distantes y no tratadas se ven afectadas por la activación inmunitaria (Figura 6).

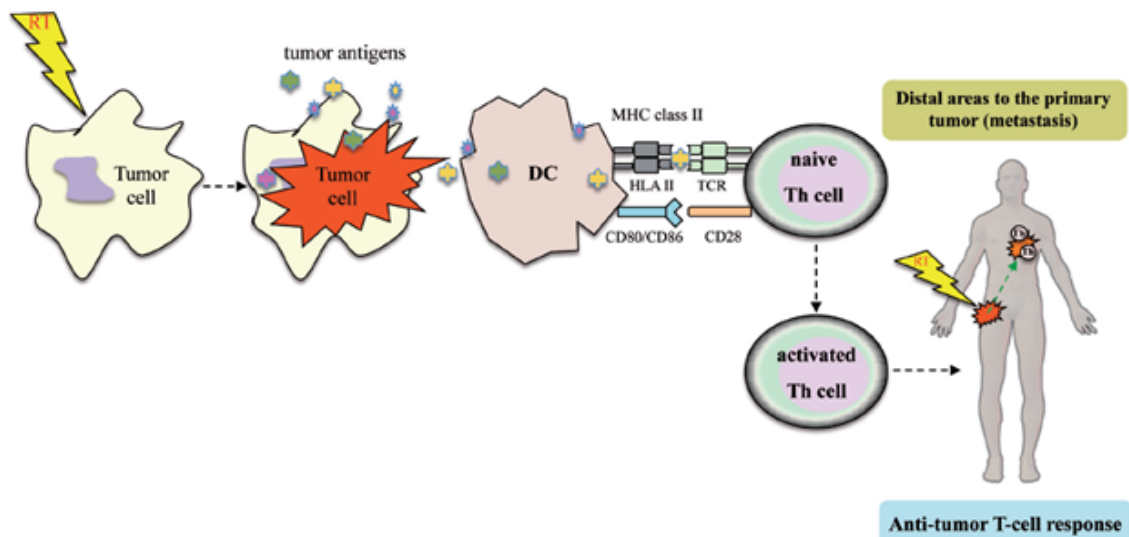


Figura 5: Esquema de la respuesta inmunitaria sistémica a partir de una respuesta inmunitaria local conocido como efecto abscopal (<https://blog.radformation.com/the-abscopal-effect>).

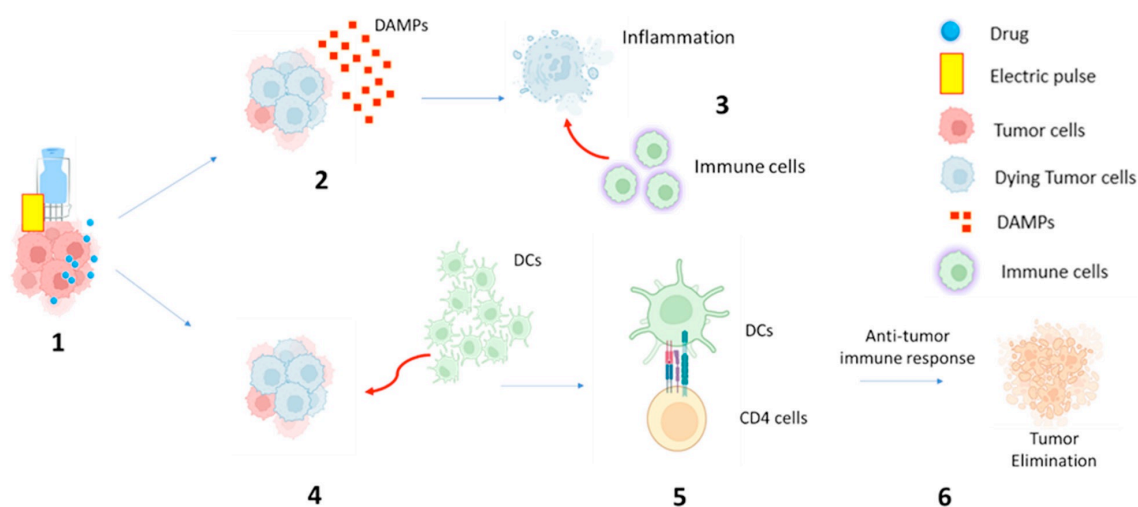


Figura 6: Mecanismo hipotético de la respuesta inmunitaria inducida por la EQT: (1) Se aplica un pulso eléctrico a la masa tumoral y el fármaco quimioterapéutico se administra dentro de la célula tumoral, amplificando el efecto citotóxico; (2) las células tumorales dañadas liberan señales que alertan al sistema inmunitario, como la liberación de patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), al lugar de destrucción del tumor y promueven una respuesta inflamatoria; (4) Al mismo tiempo, la EQT puede provocar el reclutamiento y la activación de células dendríticas; (5) Las células dendríticas activadas procesan los antígenos tumorales y los presentan a las células T; (6) Se produce una respuesta inmunitaria frente al tumor y éste se elimina (Tremble *et al.*, 2019).

Sin embargo, aunque estas hipótesis proponen un papel para la EQT en la modulación del sistema inmunitario, la EQT no se posiciona como sustituto de las inmunoterapias existentes. En su lugar, se especula que las propiedades inmunomoduladoras potenciales

de la EQT podrían complementar estos enfoques establecidos, presentando una vía para mejorar potencialmente la eficacia de las estrategias de tratamiento de neoplasias (Feriolo *et al.*, 2024).

La EQT ha demostrado estos efectos inmunomoduladores en múltiples estudios preclínicos y clínicos, destacando su capacidad para activar respuestas inmunitarias locales y sistémicas (Calvet *et al.*, 2014; Ursik *et al.*, 2018; Polajzer *et al.*, 2020).

Algunos estudios han explorado la combinación de EQT con agentes inmunomoduladores, pero las asociaciones, dosis y combinaciones óptimas aún no se han dilucidado por completo (Feriolo *et al.*, 2024). La identificación de terapias sinérgicas que potencien los efectos inmunomoduladores de la EQT podría mejorar los resultados globales del tratamiento. Además, aunque la EQT ha demostrado efectos inmunomoduladores, es preciso seguir investigando los mecanismos específicos que subyacen a estas respuestas. Es esencial comprender las interacciones entre la muerte celular inducida por la EQT, el reclutamiento de células inmunitarias y la activación inmunitaria sistémica. Además, es necesario estudiar los efectos a largo plazo de la EQT sobre el sistema inmunitario, incluido el posible desarrollo de una memoria inmunológica contra el tumor tratado (Sersa *et al.*, 2015; Feriolo *et al.*, 2024).

Los prometedores resultados observados en estudios de menor envergadura subrayan la necesidad de realizar ensayos clínicos bien diseñados y a gran escala para comprender mejor los mecanismos subyacentes a los efectos de la EQT, optimizar los protocolos de tratamiento y explorar combinaciones con inmunoterapia y otros tratamientos sistémicos (Tian *et al.*, 2021).

En sus inicios, la EQT se utilizó para el tratamiento paliativo de tumores cutáneos y subcutáneos de cualquier histología. Pero hoy en día, se puede usar como tratamiento de primera línea, solo o en combinación con otras terapias. Se ha utilizado para tratar tumores en diferentes regiones anatómicas, con la ayuda de los electrodos especialmente diseñados para la medicina veterinaria y humana (Marty *et al.*, 2006).

La EQT ha demostrado ser una modalidad terapéutica versátil, con una notable capacidad de adaptación según la especie, el tipo de tumor y su localización anatómica (Kodre *et al.*, 2009; Brunner *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2017).

El presente estudio se centra en la aplicación de la EQT como herramienta terapéutica para el tratamiento del carcinoma de células escamosas (CCE) de origen solar en felinos, empleando una muestra representativa y amplia en comparación con estudios previos. Se han tenido en cuenta variables clínicas relevantes como el grado del tumor, la presencia de infecciones víricas concomitantes y combinación de terapias. Asimismo, el trabajo incluye una serie de casos clínicos en otras especies animales y con diferentes tipos tumorales, en los que la EQT, ya sea como terapia única o como tratamiento adyuvante, podría constituir una alternativa más eficaz, menos invasiva o más accesible frente a las opciones terapéuticas convencionales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Diseño del estudio

El presente trabajo se estructuró en tres fases complementarias:

Fase I – Estudio retrospectivo:

Se analizaron de forma retrospectiva casos de gatos diagnosticados con carcinoma de células escamosas (CCE) en plano nasal y región facial, tratados previamente mediante técnicas convencionales (crioterapia y/o cirugía), en un periodo en el que la electroquimioterapia (EQT) aún no estaba disponible en la práctica clínica habitual. El objetivo de esta primera fase fue identificar las limitaciones terapéuticas observadas en estadios avanzados de la enfermedad, lo que evidenció la necesidad de explorar nuevas modalidades terapéuticas más eficaces.

Fase II – Estudio prospectivo:

Posteriormente, se desarrolló un estudio prospectivo orientado a evaluar la eficacia clínica de la EQT con bleomicina como alternativa de tratamiento local en el CCE felino de origen solar. En esta fase, además de valorar la respuesta clínica al tratamiento, se incluyeron otras variables de interés como el grado tumoral y la presencia de infecciones subclínicas (FeLV/FIV), con el fin de identificar posibles factores pronósticos asociados a la respuesta y supervivencia. Asimismo, en casos seleccionados con enfermedad avanzada se evaluó la adición de toceranib tras la terapia de EQT/bleomicina con el propósito de determinar si esta estrategia ofrecía un mayor control en la evolución tumoral o mejoras en las tasas de supervivencias.

Fase III – Casos clínicos complementarios:

Finalmente, se documentaron casos clínicos en diferentes especies y con distintos tipos tumorales tratados con EQT/bleomicina. Aunque en estas neoplasias la baja incidencia dificulta reunir una muestra amplia y homogénea, la experiencia acumulada en gatos con CCE de origen solar (modelo experimental idóneo por su alta prevalencia) permitió extrapolar la técnica a otras situaciones clínicas en las que las opciones terapéuticas disponibles resultaban limitadas.

3.2.- Procedimiento de estadificación en pacientes felinos

Todos los gatos incluidos en los estudios fueron sometidos a un protocolo de estadiaje clínico con el objetivo de establecer la extensión local y sistémica de la enfermedad, así como descartar la presencia de metástasis antes de definir el tratamiento.

El procedimiento de estadificación se realizó siguiendo una secuencia sistemática:

1. Historia clínica y examen físico general:

Se recopiló información detallada sobre la evolución de la lesión, tiempo de aparición, tratamientos previos y posibles comorbilidades. El examen físico incluyó una exploración completa con especial atención a la región nasal, ocular, cavidad oral y auricular, así como a la palpación de linfonodos regionales.

2.- Examen clínico de la lesión primaria:

- Evaluación macroscópica del tumor: tamaño, localización anatómica, presencia de ulceración y bordes de la lesión.
- Clasificación clínica según el sistema TNM adaptado a medicina veterinaria (T: tamaño/ extensión local del tumor, N: afectación linfonodos, M: presencia de metástasis).
- Asignación de grado tumoral (*Tis*, T1–T4) en función del diámetro de la lesión y la invasión en profundidad.

3.- Pruebas de laboratorio:

- Hemograma completo y bioquímica sérica con el fin de evaluar el estado de salud del paciente y su idoneidad para iniciar el tratamiento.
- Test serológico para identificar infecciones concomitantes por retrovirus felinos, virus de la leucemia felina (FeLV) y virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) mediante test de inmunocromatografía (tests rápidos SNAP).

4.- Diagnóstico por imagen:

- Todos los gatos fueron sometidos a radiografías torácicas en tres vistas estándar (dorsoventral y laterolaterales derecha e izquierda) para identificar posibles focos de metástasis en el parénquima pulmonar. En función de la ubicación anatómica de la lesión, se realizaron radiografías craneales cuando fue necesario.
- Ecografía abdominal para descartar la diseminación a otros órganos.
- Pacientes que presentaban lesiones de gran tamaño o sospecha de compromiso óseo, se recurrió a técnicas de imagen avanzada, como la tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM) para delimitar la extensión local de la lesión y su relación con estructuras óseas y blandas.

5.- Citologías y biopsias:

- Citología por aspiración con aguja fina de los linfonodos regionales sospechosos.
- La elección de la técnica citológica se basó en el tipo de lesión cutánea observada: citología por aposición en lesiones ulceradas o erosivas. Se aplicó un portaobjetos directamente sobre la superficie de la lesión, previamente limpiada con papel absorbente para eliminar detritos que pudieran interferir con la evaluación citológica. Punción con aguja fina sin aspiración (PAF): empleada en lesiones nodulares o proliferativas. Se utilizó una aguja de calibre 21, que se introdujo en el centro de la lesión. Mediante movimientos suaves y cambios de dirección dentro del tejido, se obtuvieron células por aspiración capilar. Posteriormente, se retiró la aguja, se conectó a una jeringa con aire, y se depositó el material sobre un portaobjetos. Las muestras se extendieron mediante la técnica de aplastamiento ("squash") y se dejaron secar al aire. Finalmente, se tiñeron con Diff-Quick® para su evaluación microscópica.

- Para el análisis histopatológico, se seleccionaron zonas representativas de las lesiones, evitando áreas con necrosis o inflamación intensa, a fin de preservar la integridad morfológica del tejido y asegurar la calidad diagnóstica. El procedimiento se realizó bajo sedación utilizando hidrocloreto de medetomidina (Medeson® 1 mg/mL, solución inyectable) a una dosis de 50 µg/kg por vía intramuscular. La sedación fue complementada con anestesia local en el sitio de la biopsia, con el objetivo de minimizar el dolor y las molestias asociadas al procedimiento. La extracción de las muestras se llevó a cabo utilizando una hoja de bisturí o un punch dermatológico de 2 o 4 mm de diámetro, aplicando presión y un movimiento rotatorio sobre la zona seleccionada (Figura 1). Las muestras obtenidas fueron fijadas inmediatamente en solución de formol al 10% tamponado, correctamente etiquetadas y enviadas al laboratorio de anatomía patológica para su análisis histológico.

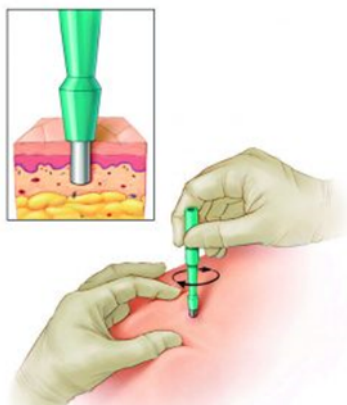


Figura 1. Toma biopsia con punch

Los laboratorios de referencia fueron Letipharma, Histolab, Uranolab, Vetlab.

6.- Clasificación definitiva del estadio clínico:

Con los datos obtenidos, cada paciente fue clasificado dentro del sistema TNM modificado para tumores epiteliales felinos, de acuerdo con el sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 1), lo que permitió categorizar los casos en estadios clínicos (I–IV) y orientar la elección del protocolo terapéutico.

Tabla 1 Clasificación de los tumores de origen epidérmico felinos (Owen, 1980)

Estadio T	T0	Ausencia de tumor
	T is	Tumor <i>in situ</i>
	T1	Tumor menor de 2 cm de diámetro
	T2	Tumor 2-5 cm de diámetro o invasión mínima
	T3	Tumor mayor de 5 cm de diámetro o con invasión en subcutáneo
	T4	Tumor invadiendo otras estructuras como fascias, músculo o hueso.
Estadio (N)	N0	Ausencia de metástasis en linfonodos
	N1	Presencia de metástasis en linfonodos
Estadio (M)	M0	Ausencia de metástasis a distancia
	M1	Presencia de metástasis a distancia

3.3.- FASE I: Crioterapia

Grupo 1 (n= 17): Estudio de gatos tratados con crioterapia (como terapia única o adyuvante de cirugía). Los pacientes de este grupo fueron seleccionados del servicio de Dermatología y Oncología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (n = 13), y de la Clínica Veterinaria Gran Tarajal, en Fuerteventura (n = 4). Periodo 2015-2020.

Los criterios de inclusión de esta fase fueron:

- Gatos con diagnóstico de CCE de origen solar en el plano nasal y áreas faciales (barbilla, labios, mejillas y párpados).
- Pacientes tratados con criocirugía como terapia única o combinada con excisión quirúrgica en casos de mayor tamaño o infiltrativos.
- Animales que se les pudo realizar un seguimiento clínico durante un periodo de un año posterior al diagnóstico inicial y tratamiento.

Los criterios de exclusión fueron:

- Animales con anomalías en análisis sanguíneos y/o comorbilidades (diabéticos, insuficiencia renal).
- Presencia de metástasis.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los tutores responsables de los pacientes, autorizando la realización de los procedimientos de sedación, anestesia y la aplicación de crioterapia.

3.3.1.-Preparación y anestesia

El procedimiento se realizó de manera ambulatoria, bajo sedación y/o anestesia, complementada en algunos casos con butorfanol (0,2 mg/kg) para un mayor control del dolor y la ansiedad. Se monitorizó al paciente durante toda la intervención. La región circundante de la piel de las lesiones se rasuraba cuando era necesario y se desinfectaba con alcohol/clorhexidina. Durante el procedimiento se cubrieron las estructuras

adyacentes sensibles (ojos, comisuras labiales, etc.) con gasas húmedas estériles para evitar el contacto accidental con el nitrógeno líquido o el óxido nitroso.

3.3.2.- Aplicación técnica de crioterapia

El tratamiento consistió en la aplicación de nitrógeno líquido u óxido nitroso mediante un criospray o una sonda metálica previamente enfriada, dependiendo del tamaño y la localización de la lesión. Las lesiones fueron tratadas mediante crioterapia utilizando dos tipos de dispositivos: un criocirculador CRY-AC® (Brymill Cryogenic Systems, Ellington, CT, EE. UU.) con boquillas intercambiables de distintos diámetros (Figura 2), y un dispositivo CryoIQ® (Figura 3), empleados para la pulverización. El diámetro de la boquilla fue seleccionado en función del tamaño de la lesión. El líquido o gas licuado se aplicó a una distancia aproximada de 1 cm de la superficie tumoral, con un ángulo perpendicular (90°) y un margen de seguridad de tejido sano de aproximadamente 20 mm.

Figuras 2 y 3: Modelos envase y boquillas de crioterapia



La técnica empleada fue de congelación y descongelación rápida en uno o varios ciclos, con el objetivo de inducir necrosis tisular por cristalización intracelular según la metodología descrita por Graham (1993). Para lesiones superficiales o de menor tamaño, se aplicaron dos ciclos de congelación de 30 a 60 segundos cada uno, separados por un periodo de descongelación espontánea de 2 a 3 minutos. En casos de lesiones mayores o infiltrativas, se realizaron tres ciclos de congelación para asegurar una mayor profundidad terapéutica. En casos con múltiples lesiones, estas se trataron individualmente durante una misma sesión. La fase de descongelación se consideró completa una vez desaparecido el halo de hielo perilesional. En un total de 7 casos, con tumores de mayor grado o invasivos, esta técnica se aplicó como adyuvante de procesos quirúrgicos.

3.3.3.- Cuidados post-crioterapia

En el período postoperatorio, los pacientes recibieron meloxicam (Metacam®) a una dosis de 0,05 mg/kg por vía oral cada 24 horas durante tres días como antiinflamatorio no esteroideo. Para la profilaxis antibiótica se administró cefalexina (Rilexine®) a una dosis de 30 mg/kg por vía oral cada 12 horas o Amoxicilina/clavulámico (Eupenclav®) a una dosis de 12,5 mg/kg por vía oral cada 12h durante siete días. Como analgésico complementario, se indicó tramadol (Tramadol Genfar®) a una dosis de 2 mg/kg por vía oral cada ocho horas durante dos días.

Se instruyó a los tutores sobre los cuidados domiciliarios, que incluyeron la limpieza de las heridas con solución salina estéril al 0,9 % y clorhexidina a una concentración de 10

mg/mL, dos veces al día. Además, se recomendó la aplicación tópica de una pomada combinada de neomicina y beclometasona (Menaderm Pomada®) sobre las zonas tratadas. Todos los animales fueron mantenidos con collar isabelino hasta la cicatrización completa de las heridas, con el fin de evitar el autotraumatismo.

3.3.4.- Evaluación de la respuesta clínica y seguimiento

La respuesta al tratamiento fue evaluada mediante exploraciones clínicas seriadas en los días 7, 14 y 30 tras la intervención, y posteriormente a los 2, 3, 6 y 12 meses, siempre que fuera posible. En cada revisión se valoraron los siguientes parámetros:

- Reducción del tamaño tumoral
- Presencia de necrosis y/o costra
- Signos de recidiva local
- Curación completa de la lesión
- Aparición de efectos

Las lesiones se evaluaron en el momento de la congelación, hasta la cicatrización completa de la herida. Se decidía otro procedimiento de congelación cuando se verificaba recidiva tumoral o lesión residual. La confirmación de la recidiva tumoral o lesión residual se realizaba en base al aspecto clínico de las lesiones, y la confirmación mediante exámenes citopatológicos y/o histopatológicos.

En cada procedimiento, la respuesta clínica para la criocirugía sola o combinada, se consideró como:

- Respuesta completa (RC): desaparición completa del tumor con epitelización total de la herida.
- Respuesta parcial (RP): reducción del área tumoral superior o igual al 50%.
- Ausencia de respuesta (AR): reducción del área tumoral inferior al 50%.
- En los controles de los pacientes se valoraba si había recidivas, si la enfermedad se mantenía estable (EE), o había una progresión tumoral (EP).

Además de la evolución clínica tras la aplicación de crioterapia, se analizaron otras variables relevantes: edad y sexo de los pacientes, tamaño y localización anatómica de las lesiones, presencia o ausencia de ulceración, número de procedimientos necesarios, intervalo entre procedimientos, aparición de metástasis durante el seguimiento, tiempo de cicatrización de las heridas y la presencia de posibles complicaciones asociadas al procedimiento, tales como formación de costras, estenosis nasal, anosmia o pérdida de apetito.

3.4.- FASE II: Electroquimioterapia (EQT) con bleomicina

Este estudio prospectivo se desarrolló entre febrero de 2021 y abril de 2025, incluyendo un total de 93 gatos tratados con protocolo de EQT combinada con bleomicina. Los gatos fueron referidos por clínicas veterinarias privadas y asociaciones protectoras de animales ubicadas en las islas de Gran Canaria, Fuerteventura y Tenerife.

Para cada paciente se recopilaron datos clínicos relevantes, incluyendo raza, edad, sexo, localización anatómica de las lesiones, grado histopatológico del tumor y estadiaje clínico completo, con el fin de caracterizar adecuadamente cada caso y correlacionar estos factores con la respuesta al tratamiento recibido.

3.4.1. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión en esta fase fueron:

- Gatos con CCE de origen solar que no eran candidatos a cirugía o radioterapia, ya sea por limitaciones clínicas o porque sus tutores rechazaron dichas opciones terapéuticas.
- También se consideraron elegibles aquellos casos con recidiva tumoral tras tratamientos previos, como cirugía, crioterapia o terapia tópica con imiquimod.
- Gatos positivos FeLV/FIV, asintomáticos, clínicamente estables, y mayoritariamente si los tumores eran de bajo grado (susceptibles de tolerar este tratamiento local en estudios preliminares).

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes que, tras la realización de pruebas de diagnóstico por imagen (radiografías torácicas, ecografía abdominal, resonancia magnética y/o tomografía computarizada), presentaban sospechas fundadas o evidencia clara de metástasis.
- Gatos con alteraciones en los análisis sanguíneos y/o comorbilidades (anemia, cardiopatías, insuficiencia renal, diabéticos).
- Gatos positivos FeLV/FIV con neoplasias de alto grado o infiltrativos.

Todos los tutores fueron informados de los objetivos y características del estudio, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito en cumplimiento con la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

3.4.2. Elaboración del grupo y subgrupos en el estudio de EQT/bleomicina

El **Grupo 2** estuvo conformado por un total de 93 gatos diagnosticados con carcinoma de células escamosas (CCE) de origen solar, tratados mediante electroquimioterapia (EQT) utilizando bleomicina como agente citotóxico.

Se decidió incluir en este grupo todos los pacientes diagnosticados con CCE, independientemente de su grado tumoral o de la presencia de infecciones subclínicas por FeLV y FIV. Esta elección se fundamenta en dos aspectos principales:

1. La necesidad de evaluar la eficacia de la EQT como modalidad terapéutica local de manera global en una cohorte amplia y representativa de pacientes, evitando sesgos de selección.
2. El interés clínico en determinar si factores como el grado tumoral o la presencia de retrovirus felinos ejercen un impacto pronóstico diferencial, lo que requiere disponer de todos los casos posibles para posteriores comparaciones.

Dentro de este grupo se establecieron subgrupos de análisis, con el fin de estudiar la influencia de variables clínicas y biológicas en la evolución de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y la supervivencia:

- **Subgrupo 1 (n = 54):** gatos con CCE de *bajo grado tumoral* (T1–T2). Estos casos se incluyeron para valorar la eficacia de la EQT en lesiones iniciales o más superficiales, donde el control local es potencialmente más favorable.
- **Subgrupo 2 (n = 39):** gatos con CCE de *alto grado tumoral* (T3–T4). Estos pacientes representan un desafío clínico por su mayor potencial invasivo y recurrencia, lo que permite contrastar los resultados con los obtenidos en estadios más tempranos.
- **Subgrupo 3 (n = 11):** gatos FeLV y/o FIV positivos, seleccionados dado el papel inmunomodulador de estos retrovirus y su potencial repercusión en la progresión tumoral y en la respuesta terapéutica. Este subgrupo resulta de especial interés para comparar la evolución frente a gatos con CCE negativos a FeLV/FIV.
- **Subgrupo 4 (n = 17):** gatos con CCE de alto grado que, tras el tratamiento inicial con EQT/bleomicina, recibieron además *toceranib* como terapia adyuvante. La inclusión de este subgrupo responde a la hipótesis de que la adición de un inhibidor de tirosina cinasa podría mejorar el control tumoral y la supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada, por lo que se contrastaron sus resultados con los obtenidos sin terapia adicional.

En esta fase, se evaluó las respuestas al tratamiento a los 30, 90 y 180 días.

Este diseño nos puede permitir, por un lado, evaluar la eficacia general de la EQT en una cohorte amplia de gatos con CCE solar, y por otro, identificar posibles factores pronósticos (grado tumoral, estatus retroviral, uso de toceranib) que pueden orientar hacia estrategias terapéuticas más personalizadas y efectivas.

3.4.3.- Electroporador y parámetros eléctricos

Para la aplicación de pulsos eléctricos se utilizó un electroporador automático de corriente alterna, modelo Electrovet EZ V3.0 (Leroy Biotech®, 35 Boulevard du Libre Échange, 31650, Francia). El dispositivo genera pulsos unipolares de onda cuadrada en trenes de 8 pulsos, con una intensidad de campo de 1000 V/cm, duración de 100 µs, corriente de 20 A y frecuencia de 10 kHz (Figura 4). El equipo cuenta con software integrado, interfaz de pantalla táctil para la selección de protocolos preconfigurados, y un sistema de activación manual mediante pulsador conectado al generador. La emisión de los impulsos eléctricos fue controlada a través de un pedal de activación (Figura 5) que consta de dos interruptores: uno para cargar los pulsos (amarillo) y otro para dispararlos (verde).

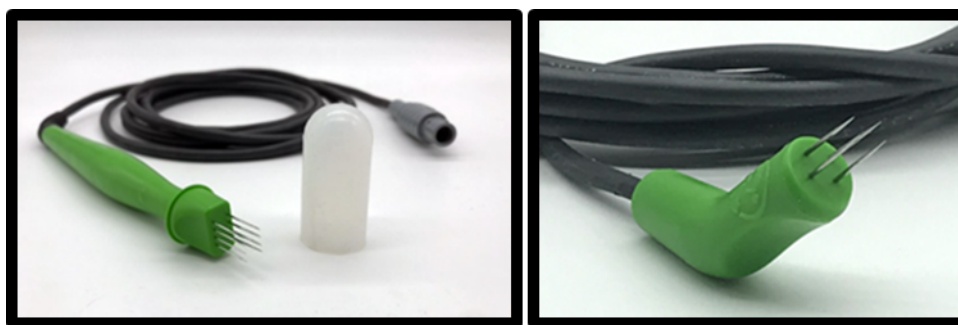


Figuras 4 y 5: Imágenes del generador (izquierda) y el interruptor (derecha) con los dos pedales.

El equipo cumple con las normativas de la Unión Europea: Directiva 2006/95/CE sobre seguridad de material eléctrico dentro de límites de tensión definidos, y Directiva 2004/108/CE sobre compatibilidad electromagnética.

3.4.4.- Selección de electrodos

Para la aplicación de la electroporación se emplearon exclusivamente electrodos de tipo aguja. La elección del tipo de electrodo se realizó en función del tamaño, profundidad y localización anatómica de la lesión. En tumores con un espesor superior a 1 cm se utilizaron electrodos de 8 agujas paralelas, con una longitud de 15 mm y una separación entre las agujas de 8 mm (Figura 6). Para lesiones de menor tamaño o localizadas en regiones anatómicas más restringidas, se emplearon electrodos de 4 agujas paralelas, de 10 mm de longitud y separación de 4 mm entre agujas (Figura 7). En ambos casos, el diámetro de las agujas fue de 0,68 mm.



Figuras 6 y 7: Electrodo de agujas largas (izquierda) y de agujas cortas o para cavidad oral (derecha).

Los impulsos eléctricos fueron aplicados en ambas direcciones entre cada par de agujas, lo que garantizó una cobertura uniforme del campo eléctrico y una electroporación en toda el área tratada, de acuerdo con lo descrito por Spugnini *et al.* (2005) y Tozon *et al.* (2016).

3.4.5.- Selección y preparación del citostático

En todos los casos se utilizó bleomicina como agente citotóxico, a una concentración de 15.000 UI/mL. La dosis fue calculada individualmente según la superficie corporal del paciente, estimada mediante la fórmula: $\text{peso}^{2/3} \times 10/100$. Una vez obtenida dicha superficie (en m²), se determinó la dosis correspondiente (15.000 UI/m²) utilizando la calculadora de dosis disponible en el sitio web de Leroy Biotech® (<https://www.leroybiotech.com/indications/bleomycin-iv-calculator/>).

La bleomicina fue posteriormente diluida en suero fisiológico estéril en una proporción 1:3 o 1:2,5, dependiendo del volumen total requerido para asegurar una adecuada infiltración de la lesión.

3.4.6.- Protocolo anestésico

Previamente al procedimiento, todos los animales recibieron dexametasona por vía intramuscular a una dosis única de 0,15 mg/kg, con el objetivo de reducir la respuesta inflamatoria perioperatoria.

Los protocolos de sedación variaron ligeramente según el centro donde se realizó la intervención. Se utilizó dexmedetomidina (Sedadex®, 0,5 mg/mL; Dechra, Barcelona) a una dosis de 3 µg/kg combinada con metadona (Metasedin®, 10 mg/mL) a 0,3 mg/kg,

ambas por vía intramuscular; o bien combinada con midazolam (Midazolam®, 15 mg/mL) a 0,2 mg/kg y alfaxalona (Alfaxan® Multidosis, 10 mg/mL) a 0,5 mg/kg, administradas simultáneamente por vía intramuscular en la misma jeringa.

Posterior a la sedación, se canalizó un acceso venoso periférico en una de las extremidades para la administración de los fármacos intravenosos, incluyendo bleomicina, la inducción anestésica y la fluidoterapia. La inducción se realizó con propofol (Propofol Lipuro®, 10 mg/mL; B. Braun) a dosis de 0,25–2 mg/kg o con alfaxalona a 0,5–2 mg/kg, según el estado clínico del paciente. Todos los animales fueron intubados y mantenidos bajo anestesia general con isoflurano (Isoflo®, 1.000 mg/g, vapor para inhalación) en mezcla con oxígeno administrado mediante un concentrador.

Dos minutos antes de la aplicación del primer tren de pulsos eléctricos, se administró fentanilo (0,002 mg/kg) por vía intravenosa lenta, con el objetivo de prevenir el dolor agudo asociado al procedimiento y estabilizar los parámetros anestésicos, los cuales fueron monitorizados de forma continua mediante electrocardiografía, capnografía y pulsioximetría.

3.4.7.- *Procedimiento de electroquimioterapia*

Una vez alcanzado un plano anestésico adecuado y aplicadas las medidas de bioseguridad, se les administraba la bleomicina diluida en suero fisiológico en el transcurso aproximadamente de 2 minutos. Cuando se administra por vía intratumoral, el citostático se aplicaba lentamente para evitar fugas y secando con una gasa empapada en alcohol para limitar la liberación de vapores.

Tras completar la infiltración, se respetó un intervalo de espera de 8 minutos antes de iniciar la aplicación de pulsos eléctricos, lo que permitió una adecuada difusión del fármaco en el tejido tumoral (Mir *et al.*, 2006; Tozon *et al.*, 2014). Los electrodos de aguja se introdujeron en el espesor de la lesión, adaptando la profundidad según la consistencia tumoral; en algunos casos se aplicó gel ecográfico para mejorar la permeabilidad eléctrica. Se aplicaron trenes de pulsos con un margen lesional de 2–3 cm de tejido sano, evitando la reintroducción de las agujas en los mismos puntos para prevenir electroporación irreversible (IRE).

En lesiones que involucraban estructuras dentales, se realizó extracción dental para asegurar cobertura amplia de márgenes y permitir la electroporación de los alveolos. En lesiones palpebrales, se empleó gel lubricante ocular (Lubrithal®, Dechra) y se colocaron depresores linguales de madera recubiertos de látex con ayuda de un asistente; en estos casos se utilizaron electrodos de 4 agujas.

El tiempo total del procedimiento varió entre 10 y 15 minutos, dependiendo del número, localización y tamaño de las lesiones. Tras la aplicación de los pulsos, se suspendió el anestésico inhalatorio, manteniendo únicamente la suplementación con oxígeno vía tubo endotraqueal. Una vez finalizado el procedimiento, se administró atipamezol intravenoso (0,5 mL/kg) para revertir la sedación o se permitió el despertar espontáneo, y los animales fueron trasladados a jaulas de recuperación.

Durante el intraoperatorio se administró una única dosis de dexametasona (0,2 mg/kg IM o IV) para prevenir inflamación durante las primeras 48 horas. En pacientes positivos para FeLV o FIV, se empleó meloxicam (0,2 mg/kg SC) como antiinflamatorio.

3.4.8.- *Cuidados post-EQT*

Todos los pacientes iniciaron tratamiento antiinflamatorio con meloxicam (Meloxydil® 0,5 mg/ml, solución oral; Ceva, Barcelona, España), administrado por vía oral a una dosis de 0,1 ml/kg cada 24 horas. La duración del tratamiento fue de 2 semanas para tumores clasificados como T1-T2, entre 4 y 6 semanas en T3, y de forma indefinida en casos T4, siempre que no existiera alguna contraindicación evidente. Como analgesia, se utilizó buprenorfina (Bupredine® 0,3 mg/ml, solución inyectable; Dechra, Barcelona, España), administrada por vía oral o sublingual a una dosis de 0,015 mg/kg. El tiempo de administración se ajustó según el estadio tumoral.

Se recomendó a los tutores la limpieza de las heridas con solución salina al 0,9 % y clorhexidina diluida (10 mg/ml) dos veces al día. En casos de autotraumatismo o lesiones perioculares, se indicó el uso de collar isabelino. Se enfatizó la vigilancia de signos clínicos como anorexia o pérdida de apetito, especialmente en lesiones del plano nasal, debido a la posible anosmia secundaria a la formación de costras.

3.4.9.- *Tratamiento con toceranib*

En un subgrupo casos avanzados, correspondientes a tumores clasificados como T3 y T4 según el sistema de clasificación de la OMS, se incluyó el tratamiento con toceranib (Palladia®, Pfizer), además de la EQT. El fármaco se administró por vía oral a una dosis de 2,2 mg/kg, tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). En animales con un peso inferior al requerido para los comprimidos de 10 mg, se reformuló magistralmente en farmacia para permitir un ajuste preciso de la dosis según el peso corporal. El tratamiento se mantuvo durante un mínimo de tres meses en los pacientes que lo toleraron adecuadamente.

Durante el tratamiento, se monitorizó regularmente el estado general de los animales mediante análisis sanguíneos (perfil renal, hepático y hemograma), con el fin de detectar posibles efectos adversos. Los criterios de exclusión para la administración de toceranib incluyeron: (1) presencia de enfermedad renal, (2) anemia moderada o severa, y (3) intolerancia gastrointestinal manifestada por vómitos o diarrea tras la administración del fármaco.

La toxicidad se clasificó de acuerdo con los Common Terminology Criteria for Adverse Events del *Comparative Oncology Group*. La respuesta clínica fue evaluada en conjunto con los efectos de la EQT.

3.4.10.- *Seguimiento y evaluación de la respuesta*

Todos los pacientes fueron revisados a las 24–48 horas posteriores al tratamiento. Aquellos de mayor edad, con signos clínicos como hiporexia, fueron monitorizados más estrechamente durante los primeros días. Se realizó una revisión presencial en la primera semana posterior a la aplicación del tratamiento, y posteriormente se llevaron a cabo controles clínicos a los 30, 90 y 180 días. En los casos que sobrevivieron o no se perdieron al seguimiento, se continuaron controles a largo plazo entre 1 y 3 años. Se facilitó la comunicación con los tutores mediante teléfono y correo electrónico, quienes aportaron fotografías y actualizaciones del estado general del paciente.

Durante el seguimiento se documentó la duración del tratamiento con toceranib, aparición de toxicidades, causas de su interrupción, presencia de comorbilidades, medicación concomitante y, en su caso, fecha y causa de la eutanasia, independientemente de su relación directa con el tumor.

3.4.10.1.- Evaluación de la respuesta clínica

La evaluación de la respuesta se realizó siguiendo los criterios RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors), adaptados a veterinaria (Nguyen *et al.*, 2015). Todas las mediciones tumorales iniciales se efectuaron dentro de las dos semanas previas al inicio del tratamiento. El tamaño tumoral se midió con un calibrador Vernier en al menos una dimensión, registrándose los valores en unidades métricas.

3.4.10.2.- Definiciones de respuesta al tratamiento

- Remisión completa (RC): desaparición total de la lesión sin evidencia clínica del tumor primario.
- Remisión parcial (RP): reducción del tamaño tumoral en al menos un 30 %.
- Enfermedad estable (EE): sin incremento ni reducción significativa del tumor (reducción menor del 30 % o aumento menor del 20 %).
- Enfermedad progresiva (EP): crecimiento del tumor mayor al 20 % o aparición de nuevas lesiones.

3.4.11.- Toxicidad local y efectos adversos

3.4.11.1.- Evaluación de la toxicidad local

La toxicidad local se evaluó tras la primera sesión de EQT mediante una escala de puntuación de 6 puntos descrita previamente por Lowe *et al.* (2017). Se definió como cualquier alteración patológica (eritema, inflamación de tejidos blandos, necrosis, entre otros) ocurrida como resultado de los efectos locales del tratamiento dentro del campo de aplicación de los pulsos eléctricos. La valoración se realizó mediante observación clínica directa en los días posteriores a la sesión terapéutica. Los criterios utilizados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios toxicidad local

Signos clínicos	
0	Sin toxicidad
1	Inflamación leve
2	Hinchazón/necrosis
3	Hinchazón grave
4	Necrosis profunda
5	Hinchazón grave y pérdida de tejido

3.4.11.2.- Evaluación de efectos adversos

Los efectos adversos se clasificaron de acuerdo con los criterios del Grupo de Oncología Comparada Veterinaria - Criterios Terminológicos Comunes para Efectos Adversos (VCOG-CTCAE) (LeBlanc *et al.*, 2021). La evaluación se realizó tras cada ciclo de tratamiento, siguiendo una escala de gravedad del grado 1 al 5, basada en la sintomatología clínica observada y el impacto funcional en el paciente (Tabla 3). La descripción de cada grado es la siguiente:

- Grado 1: Leve; síntomas mínimos o asintomáticos; seguimiento clínico sin necesidad de tratamiento específico.
- Grado 2: Moderado; requiere tratamiento ambulatorio o no invasivo; hay una limitación moderada de las actividades de la vida diaria.
- Grado 3: Grave o clínicamente significativo; sin amenaza vital inmediata, pero con indicación de hospitalización o prolongación de la misma; incapacidad funcional.
- Grado 4: Potencialmente mortal; requiere intervención médica urgente.
- Grado 5: Muerte relacionada con el efecto adverso.

Previamente al inicio del tratamiento, todos los pacientes fueron sometidos a evaluación hematológica y bioquímica. Aquellos que presentaban alteraciones significativas en estos parámetros o signos clínicos de relevancia fueron excluidos del estudio.

Tabla 3. Efectos adversos del GOCV-CTCAE

Efecto Adverso	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Hematocito	25%-<LIN	20-<25%	15-<20%; indicar transfusión	<15%, intervención médica urgente	Muerte
Neutropenia	1500μl-LIN	1000μl-1499μl	500μl-999μl	1500μl-LIN	Muerte
ALP	LSN-1.25 × LSN	1.25-1.5 × LSN	1.5-2 × LSN	>2 × LSN	
ALT	LSN-1.25 × LSN	1.25-1.5 × LSN	1.5-2 × LSN	>2 × LSN	—
Urea	LSN-1.5 × LSN	1.5-2 × LSN	2-3 × LSN	>3 × LSN	—
Creatinina	LSN-1.5 × LSN	1.5-2 × LSN	2-3 × LSN	>3 × LSN	—
Vómito	< 3 episodios/24h Sin tratamiento	3-10 episodios/día Fluidoterapia y/o tratamiento	Múltiples episodios >48h Fluidoterapia y/o NPP/NPT	Riesgo de muerte (p. ej, Colapso hemodinámico)	Muerte
Diarrea	> dos deposiciones por día; < consistencia	> 3-6 deposiciones por día; tratam. sintomático, no interfiere con la AVD	>6 heces/día; Incontinencia; fluidoterapia; hospitalización; interferencia con la AVD	Riesgo de muerte (p. ej, Colapso hemodinámico)	Muerte
Alopecia	Hipotricosis; parches, transitoria <48h	Hipotricosis difusa, transitoria 2-3 días	Permanente o generalizada	—	—
Anorexia	<48h	2-3 días	3-5 días, pérdida peso >10%; fluidoterapia, alimentación forzada	>5 días, peligro de muerte	Muerte

ALT= alanino aminotransferasa; LIN= límite inferior normal; LSN= límite superior normal; NPP= nutrición parenteral parcial; NPT= nutrición parenteral total; AVD=actividades de vida diaria

3.5.- Estudio estadístico

Los datos fueron recopilados y analizados utilizando el programa IBM SPSS Statistics, versión 26.0. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

3.5.1.- *Análisis Fase I: Crioterapia (grupo 1).*

Las variables cuantitativas, como la edad de los pacientes, el tamaño tumoral y el tiempo de cicatrización, se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE) o mediana e intervalo intercuartílico (IQR), según la distribución de los datos. Para evaluar la normalidad se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las variables cualitativas, como el sexo, localización anatómica, grado tumoral y respuesta clínica (remisión completa, enfermedad estable o progresión), se describieron mediante frecuencias absolutas y porcentajes.

Para comparar diferencias en el tiempo de cicatrización entre pacientes con y sin ulceración, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U, debido al tamaño muestral reducido. Las asociaciones entre variables categóricas (grado tumoral/tipo de respuesta, o técnica empleada/presencia de recidiva) se evaluaron mediante la prueba de *Chi-cuadrado* (χ^2) de Pearson o el *test exacto de Fisher*.

3.5.2.- *Análisis Fase II: Electroquimioterapia/bleomicina (Grupo 2 y subgrupos 1, 2, 3 y 4).*

Se realizó un análisis estadístico descriptivo e inferencial. Las variables continuas no paramétricas, como la edad, el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la supervivencia libre de progresión (SLP), se analizaron mediante medidas de tendencia central y dispersión, presentándose como medianas junto con sus rangos.

Las variables categóricas, como el sexo, la raza, el número de tratamientos, el grado tumoral y la presencia de metástasis, así como variables ordinales como la respuesta al tratamiento y la puntuación de toxicidad, se expresaron mediante frecuencias absolutas y relativas (%).

La respuesta local al tratamiento se categorizó según los criterios RECIST modificados, en cuatro grupos: remisión completa (RC), remisión parcial (RP), enfermedad estable (EE) y enfermedad progresiva (EP).

La puntuación de toxicidad se clasificó en dos grupos: toxicidad leve (puntuación ≤ 2) y toxicidad moderada a grave (puntuación > 2), según la escala propuesta por Lowe *et al.* (2017).

Tablas de contingencia

Para el estudio de la asociación entre variables cualitativas, como la respuesta al tratamiento (respuesta completa, parcial, estable o progresión); la presencia o ausencia de infección por FeLV/FIV, o el grado tumoral (T1–T4); el tipo de protocolo terapéutico empleado (EQT, EQT + toceranib), relación entre variables categóricas (metástasis/grado del tumor; grado del tumor/respuestas al tratamiento) se utilizaron *tablas de contingencia*.

Para analizar las diferencias entre los grupos, se aplicó la *prueba de Chi-cuadrado* (χ^2). En aquellas situaciones donde alguna de las celdas de la tabla de contingencia presentaba frecuencias esperadas menores a 5, se optó por la *prueba exacta de Fisher*, a fin de mantener la validez del análisis estadístico.

Análisis de supervivencia: método Kaplan-Meier

Con el propósito de estimar la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo, se empleó el método no paramétrico de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958), adecuado

para evaluar la duración hasta que ocurre un evento de interés, como la recidiva o el fallecimiento. Este enfoque permite incluir datos censurados, es decir, aquellos casos en los que el evento no se presenta durante el periodo de seguimiento.

Se consideró como evento final la reaparición del tumor, definiéndose el tiempo hasta la recidiva como el intervalo transcurrido entre la desaparición inicial de la masa tumoral y su posterior retorno. A través de este análisis fue posible estimar la mediana de supervivencia y calcular los intervalos de confianza al 95 %. Se elaboraron curvas de Kaplan-Meier para comparar la evolución de los distintos grupos de tratamiento (EQT/bleomicina sola frente a EQT /bleomicina combinada con toceranib), así como entre los grados tumorales clasificados de T1 a T4.

La comparación entre las curvas de supervivencia se llevó a cabo mediante la *prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox (log-rank test)*, un método estadístico no paramétrico apropiado para evaluar diferencias significativas entre grupos.

La hipótesis nula asumió la igualdad entre las curvas; un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Parámetros de análisis clínico

Se calcularon las siguientes variables para evaluar la efectividad del tratamiento:

- Tiempo de supervivencia (TS): intervalo desde la primera sesión de tratamiento hasta la fecha de fallecimiento o del último control clínico.
- Tiempo medio de supervivencia (TMS): media aritmética del TS para todos los pacientes.
- Tasa de recidiva (TR): proporción de gatos que presentaron RC inicial y recidiva posterior.
- Intervalo libre de enfermedad (ILE): tiempo transcurrido desde el primer tratamiento hasta la aparición de recidiva local o metástasis.
- Supervivencia libre de progresión (SLP): en los casos con RP o EE, intervalo entre el inicio del tratamiento y la progresión clínica o aparición de metástasis.

Finalmente, se registró el estado clínico de cada paciente al cierre del estudio, clasificándolos en: vivo sin tumor, vivo con tumor, fallecido sin tumor o fallecido con tumor.

3.6.- FASE III: Casos clínicos tratados con EQT/bleomicina

A partir del estudio principal realizado sobre una amplia población felina afectada por carcinoma de células escamosas (CCE) de origen solar, empleado como modelo experimental de referencia para evaluar la eficacia de la EQT combinada con bleomicina, se planteó la posibilidad de extrapolar esta modalidad terapéutica a otros tipos tumorales y especies animales.

Esta fase del estudio incluyó la aplicación de EQT pacientes con neoplasias cuya localización anatómica o tipo histológico comprometía potencialmente la funcionalidad o la conservación de órganos a largo plazo.

Los casos incluidos fueron:

3.6.1.- CCE en halcón peregrino

Se atendió un halcón peregrino (*Falco peregrinus*) con lesiones cutáneas bilaterales en la región axilar izquierda y en la zona torácica lateral e inguinal derecha. Se realizaron

análisis sanguíneos, cultivos bacterianos y fúngicos. Posteriormente, se tomaron biopsias incisionales que fueron procesadas mediante inclusión en parafina y tinción de hematoxilina-eosina para estudio histopatológico. El análisis realizado en un laboratorio de referencia en Anatomía Patológica Veterinaria (UAB) confirmó el diagnóstico de carcinoma de células escamosas (CCE). Se realizaron radiografías torácicas para descartar metástasis.

Dada la extensión y localización de las lesiones, la resección quirúrgica no se consideró viable, ya que habría comprometido la funcionalidad del ala y, por ende, la capacidad de vuelo del ave. Por este motivo se optó por la electroquimioterapia (EQT), con el objetivo de lograr control local de la enfermedad mediante un procedimiento mínimamente invasivo y preservando la integridad funcional.

El tratamiento consistió en la aplicación de EQT en dos sesiones separadas por 90 días. Para los procedimientos se utilizó anestesia inhalatoria con isoflurano y analgesia con meloxicam y buprenorfina. Se administró bleomicina intratumoral (1.500 UI/cm³) seguida de la aplicación de secuencias de pulsos eléctricos bipolares (1000 V/cm) mediante electrodos de pinza y de agujas largas en las distintas sesiones, empleando electroporadores ONKODISRUPTOR EXP-VET® y ELECTROVET EZ®.

El manejo posoperatorio incluyó curas locales con solución salina, aplicación tópica de imiquimod y ácido fusídico, y control analgésico-antiinflamatorio. Se realizó un seguimiento clínico y radiografías de control, hasta la muerte accidental del animal.

3.6.2.- *Condroma mandibular canino*

Se evaluó una perra Bull Terrier de 10 años, hembra esterilizada, con una masa mandibular de crecimiento lento y evolución de dos años. Tras la exploración física y oral, se realizaron pruebas diagnósticas complementarias: hemograma completo, perfil bioquímico, urianálisis, radiografías torácicas y craneofaciales, electrocardiograma, ecocardiograma, ecografía abdominal y tomografía computarizada (TC). Posteriormente, se llevó a cabo toma de biopsia; el análisis histopatológico (Histolab-Veterinaria), confirmó la presencia de un condroma, caracterizado por proliferación mesenquimal con diferenciación hacia tejido cartilaginoso maduro.

El tratamiento quirúrgico convencional, que habría requerido una mandibulectomía parcial, fue rechazado por el propietario debido a las secuelas funcionales y estéticas que conlleva. Como alternativa, se optó por la electroquimioterapia.

Para el procedimiento se utilizó un electroporador automático (Electrovet EZ V3.0®, Leroy Biotech, Francia) capaz de emitir trenes de 8 pulsos unipolares de onda cuadrada (1000 V/cm, 100 µs, 20 A, 10 kHz). El citostático empleado fue bleomicina a una concentración de 1.500 UI/ml, administrada por vía intravenosa diluida en solución salina estéril (proporción 1:3–1:2,5). La dosis se calculó en función de la superficie corporal, estimada mediante la fórmula: $\text{peso}^{(2/3)} \times 10/100$.

El procedimiento se realizó bajo anestesia general. Ocho minutos después de la infusión intravenosa de bleomicina, se aplicaron los pulsos eléctricos mediante electrodos de agujas (8 agujas paralelas, 15 mm de longitud, separación de 8 mm, diámetro 0,68 mm), introducidos en el espesor de la masa tumoral. Se realizaron controles clínicos, análisis sanguíneos y estudios radiológicos tras el procedimiento por un periodo de 6 meses.

3.6.3.- CCE del tercer párpado felino

En colaboración con dos Centros Oftalmológicos de referencia en Gran Canaria (Oftalvet y Dioftalmo), se atendieron dos gatos domésticos Común Europeos de 8 y 10 años de edad respectivamente, diagnosticados con carcinoma de células escamosas (CCE) en el tercer párpado. La estadificación clínica incluyó hemograma, bioquímica sérica, estudios histopatológicos, ecografías, radiografías torácicas y tomografía computarizada craneal, clasificándose ambos casos como T₁N₀M₀.

Dado que los propietarios rechazaron la opción quirúrgica (que implicaba la enucleación del globo ocular), se optó por la electroquimioterapia (EQT) como única modalidad terapéutica. El protocolo de EQT consistió en la administración de bleomicina, combinando la vía sistémica (dosis intravenosa calculada en función de la superficie corporal) con la infiltración intratumoral (1.000–1.500 UI/cm³ de lesión). Transcurridos 8 minutos desde la administración, se aplicaron pulsos eléctricos bipolares utilizando electrodos de aguja insertados en la masa tumoral. Se administraron trenes de 8 pulsos de onda cuadrada, con una duración de 100 µs, a una intensidad de 1.000 V/cm. Para proteger estructuras adyacentes, el globo ocular fue cubierto con dispositivos aislantes no conductores durante la aplicación de los pulsos.

Los procedimientos se realizaron bajo anestesia general con un protocolo multimodal adaptado a cada paciente. En el postoperatorio se instauró tratamiento analgésico y antiinflamatorio según las necesidades clínicas. El seguimiento incluyó revisiones periódicas hasta dos años y tres años, después del inicio del tratamiento, con exploración clínica, analíticas sanguíneas y radiografías torácicas en intervalos programados (semanal y posteriormente cada 3 y 6 meses).

3.6.4.- Plasmocitomas extramedulares en pacientes caninos

Se incluyeron dos perros geriátricos: un mestizo de 15 años y un Yorkshire Terrier de 12 años, ambos con diagnóstico de plasmocitoma extramedular localizado en cavidad oral/labios. Las masas habían sido previamente extirpadas de manera incompleta, con márgenes quirúrgicos infiltrados según los resultados de los estudios histopatológicos tras la cirugía. En la evaluación clínica y en las radiografías torácicas no se evidenció enfermedad metastásica, y ambos pacientes se encontraban en buen estado general.

Ante la imposibilidad o el rechazo de realizar una cirugía radical (hemimandibulectomía o maxilectomía), se optó por la electroquimioterapia (EQT) como tratamiento adyuvante, aplicada en el lecho quirúrgico tras la completa cicatrización (4–6 semanas postoperatorio). El protocolo consistió en la administración intravenosa de bleomicina (15.000 UI/m²), seguida de la aplicación de pulsos eléctricos mediante electrodos de agujas paralelas conectados al equipo ELECTROVET EZ®. La anestesia incluyó premedicación con medetomidina, metadona y midazolam, inducción con propofol y mantenimiento con isoflurano en oxígeno. El manejo postoperatorio contempló analgesia multimodal, antiinflamatorios y cuidados locales en la zona tratada. Y se les hizo un seguimiento por un periodo de 3, 6 y 12 meses.

4.- RESULTADOS

4.1.- Fase I

4.1.1 Crioterapia en CCE (grupo 1).

En este estudio retrospectivo se incluyeron gatos diagnosticados con carcinoma de células escamosas (CCE) de origen solar, atendidos en nuestra práctica clínica entre 2015 y 2020. Los pacientes recibieron tratamiento mediante crioterapia (CRT) o crioterapia combinada con cirugía (CX). Se recopilaron las tasas de respuesta terapéutica categorizadas como: remisión completa (RC), enfermedad estable (EE) y enfermedad progresiva (EP).

Se incluyeron 17 gatos con CCE, 10 machos (58,8 %) y 7 hembras (41,2 %), con una edad media de $11,2 \pm 2,3$ años. La localización más frecuente de las lesiones fue el plano nasal ($n = 12$; 70,6 %), seguida de mejillas ($n = 2$), párpados ($n = 2$) y labios ($n = 1$). El tamaño medio de las lesiones fue de $1,8 \pm 0,5$ cm.

La ulceración estuvo presente en 10 pacientes (58,8 %), y se observó una diferencia significativa en el tiempo de cicatrización entre los pacientes con y sin ulceración (mediana: 21 días vs. 14 días; $p = 0,032$).

El número medio de sesiones de crioterapia fue de $1,5 \pm 0,6$, con un intervalo promedio de 28 días entre sesiones en los casos que requirieron más de una. No se observaron metástasis durante el período de seguimiento (12 meses) en ninguno de los casos.

La información detallada sobre localización anatómica de las lesiones, grado tumoral, número de sesiones de crioterapia, duración del tratamiento y respuesta clínica se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

Pacientes	Localización	Grado tumor	Técnica/sesiones	Tratam. (días)	Respuesta
Caso 1	plano nasal	Tis	1 CRT	35	RC
Caso 2	barbilla	Tis	1 CRT	48	RC
Caso 3	plano nasal	T1	3CRT	82	RC
Caso 4	plano nasal	T1	3CRT	68	RC
Caso 5	Plano nasal	T1	3CRT	56	RC
Caso 6	nariz/orejas	T1/T3	1CRT+CX	55	RC
Caso 7	plano nasal	T2	2CRT+CX	72	RC
Caso 8	plano nasal	T2	3CRT	96	EE
Caso 9	punto nasal	T2	3CRT	87	EE
Caso 10	plano nasal	T2	3CRT	76	EE
Caso 11	Nasal/párpado	T2	3CRT+CX	270	RC
Caso 12	plano nasal	T3	3CRT	110	EP
Caso 13	nasal/párpados	T3	2CRT+CX	93	EE
Caso 14	nasal/mejilla	T3	3CRT	240	EP
Caso 15	labio/mandíbula	T4	2CRT+CX	160	EP
Caso 16	nasal/mejilla	T4	3CRT+CX	250	EP
Caso 17	plano nasal/labio	T4	3CRT+CX	270	EP

RC (recuperación completa); EE (enfermedad estable) EP (enfermedad progresiva)

La respuesta a la crioterapia como tratamiento único o adyuvante de cirugía fue de remisión completa (RC) en el 47% de los casos ($n=8$; Figura 1), enfermedad estable (EE) en el 23,5% ($n=4$; Figura 2), y progresión de la enfermedad (EP) en el 29,5% ($n=5$).

El número de sesiones de crioterapia se ajustó según el grado tumoral, la respuesta clínica y la combinación terapéutica utilizada. En los carcinomas *in situ* (Tis), una única sesión fue suficiente. En casos más avanzados, se aplicaron de 1 a 3 sesiones, especialmente cuando se utilizó crioterapia como técnica complementaria para asegurar márgenes quirúrgicos limpios. En los casos tratados exclusivamente con crioterapia, el número medio de sesiones fue de 3. Las remisiones completas obtenidas con crioterapia como única técnica se observaron principalmente en tumores *in situ* o de grado T1 (5 de 10 casos), con una media de tiempo hasta la respuesta de 57,8 días.



Figura 1. Paciente con CCE en puente y plano nasal en grado T1 con una recuperación completa tras una sesión de crioterapia a las 4 semanas



Figura 2. Paciente con CCE en puente y plano nasal en estadio T2 con un control de enfermedad estable tras 2 sesiones de crioterapia a las 4 semanas.

Se documentó recidiva tumoral en el 76,4% de los casos (13/17). En función del tamaño y evolución de la lesión, se optó por repetir la crioterapia o combinarla con otra modalidad terapéutica. En siete casos se combinó crioterapia con cirugía, obteniéndose remisión completa en tres, enfermedad estable en uno y progresión en tres.

4.1.1.1.- Cicatrización y evolución de las lesiones

Respecto a las complicaciones asociadas al procedimiento, se reportaron costras en 13 animales (76,5 %), pérdida transitoria del apetito en 4 (23,5 %), estenosis nasal en 2 (11,8 %) y anosmia en 1 (5,9 %).

En las lesiones pequeñas (Tis, T1), hubo un leve edema y/o eritema que se resolvió en pocos días (3-5 días), y en las lesiones mayores, el edema o eritema permaneció entre una a dos semanas. A continuación, la granulación y epitelización fueron evidentes hasta que se formó un fino tejido cicatricial.

La técnica evaluada demostró ser eficaz principalmente en lesiones de pequeño tamaño o en tumores de bajo grado, en los cuales se observó una adecuada respuesta terapéutica. Sin embargo, en lesiones de mayor tamaño o con características invasivas, fue necesario complementar con otra modalidad terapéutica, debido a la limitada efectividad observada en estos casos.

4.2.- Fase II

4.2.1 Gatos tratados con electroquimioterapia/bleomicina (grupo 2)

4.2.1.1.- Población de estudio

Se incluyeron 93 gatos (grupo 2) diagnosticados con carcinoma de células escamosas (CCE) en la región craneofacial, confirmados mediante citología y/o biopsia. Los casos abarcaban todos los estadios tumorales, desde T1 hasta T4, conforme a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). La distribución de los casos por tamaño tumoral se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Casos/Grado tumor según OMS

		Frecuencia	Porcentaje
Válido	Tumor < 2cm	25	26,9
	Tumor entre 2-5cm	31	33,3
	Tumor > 5cm	29	31,2
	Tumor invasivo	8	8,6
	Total	93	100,0

En la Figura 3, se ilustran ejemplos representativos del aspecto macroscópico de las lesiones neoplásicas de diferentes tamaños y grados de invasión, localizadas en la región craneofacial.

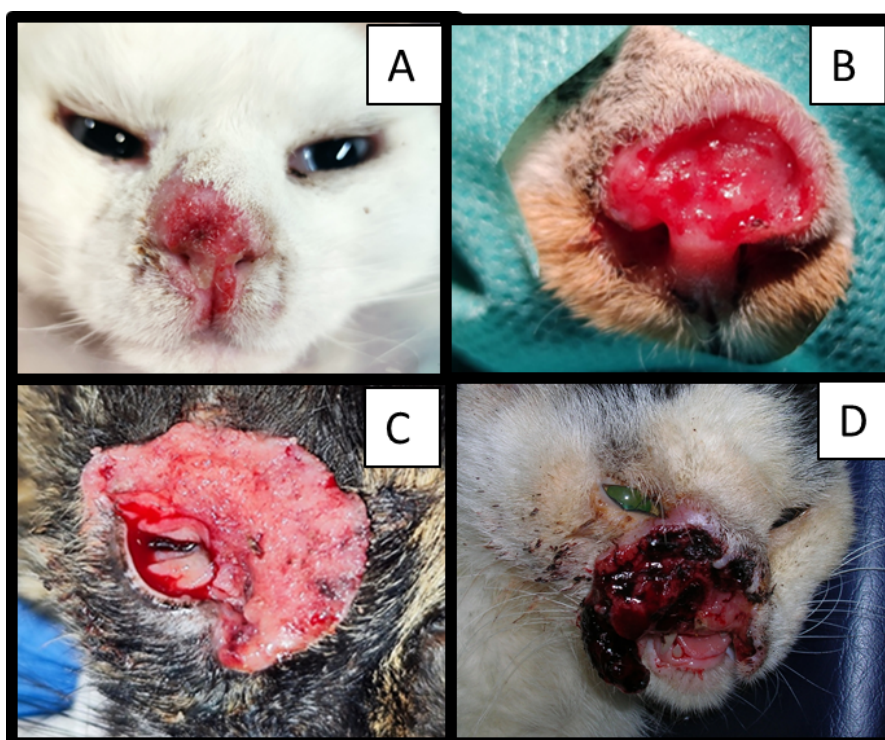
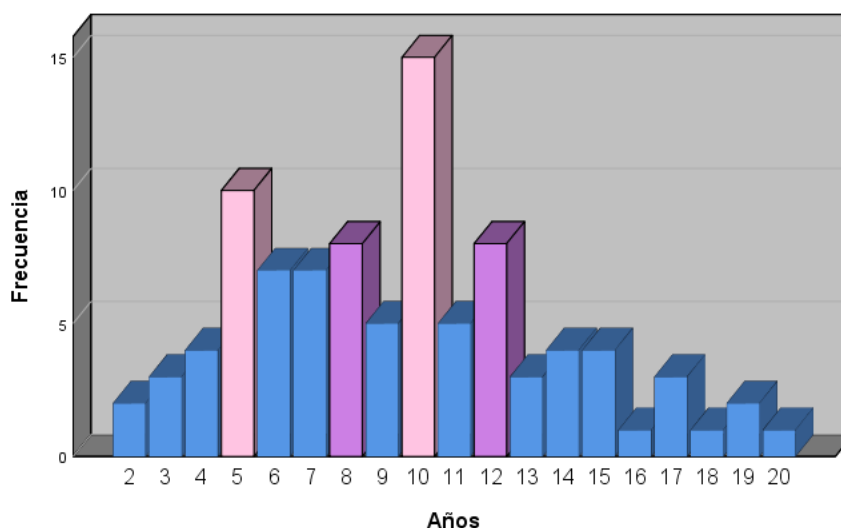


Figura 3: Representación macroscópica de CCE en diferentes localizaciones y grados de progresión en la región craneofacial felina. (A) Lesión grado T1 localizada en el plano nasal; (B) Lesión grado T2 que afecta el plano nasal y parte del puente nasal; (C) Lesión grado T3 en la región palpebral superior del ojo derecho (D) Lesión grado T4, de tipo invasivo, con compromiso extenso de nariz, labios y estructuras adyacentes.

4.2.1.2.- Reseña y procedencia de los pacientes

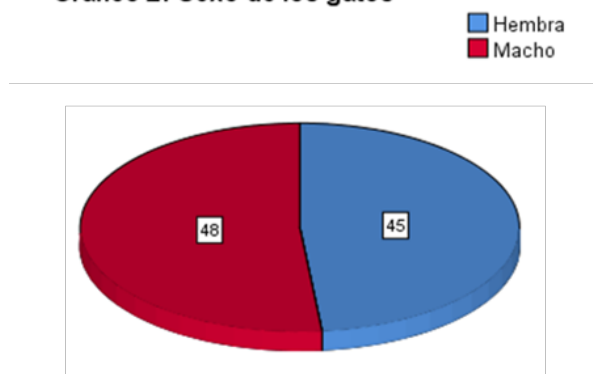
Los datos demográficos completos de los pacientes se presentan en el Anexo I (Tablas 1–4). La edad media de los gatos incluidos fue de 9,4 años (rango: 2–20 años), siendo la edad más frecuente 10 años ($n = 15$; 16,1 %). El segundo grupo etario más común correspondió a gatos de 5 años ($n = 10$; 10,8 %) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Frecuencia edad de los gatos



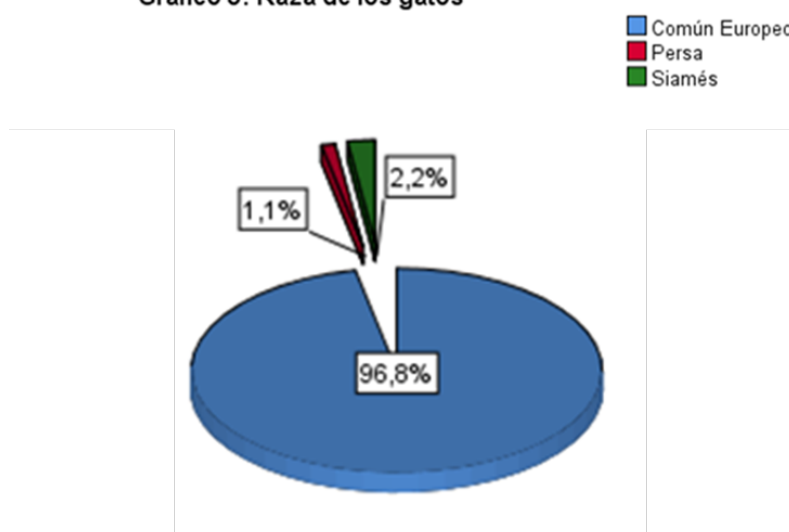
En relación con el sexo, todos los animales estaban esterilizados, con una distribución equitativa entre machos ($n = 48$; 51,6 %) y hembras ($n = 45$; 48,4 %), sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Sexo de los gatos



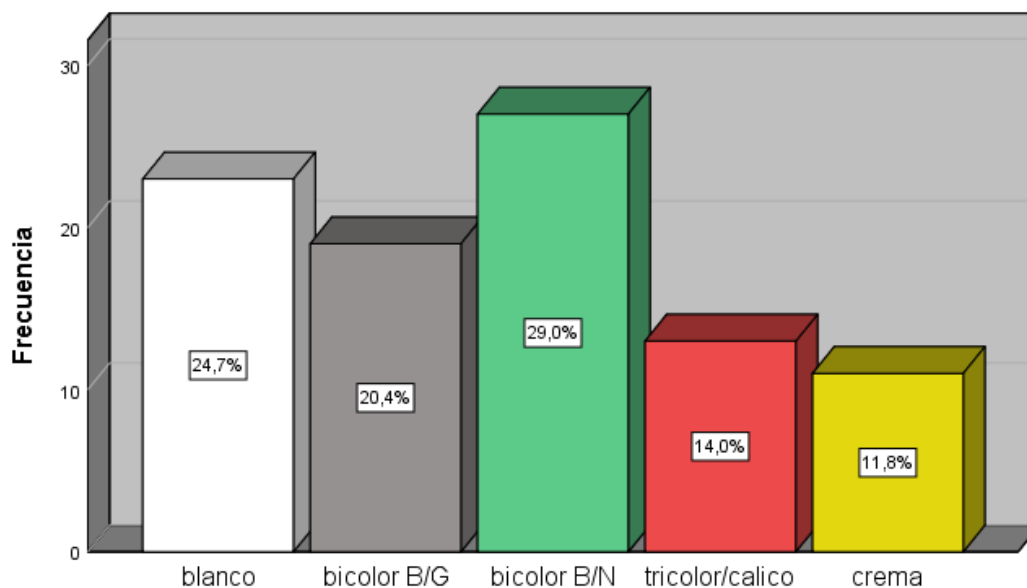
Respecto a la raza, la gran mayoría de los pacientes correspondían a gatos de raza Común Europeo ($n = 90$; 96,8 %), observándose solo tres casos en otras razas: Persa ($n = 1$; 1,1 %) y Siamés ($n = 2$; 2,2 %) (Gráfico 3).

Gráfico 3: Raza de los gatos



La coloración del pelaje se distribuyó en cinco variantes principales: patrón sólido blanco ($n = 23$; 24,7 %), bicolor blanco con gris ($n = 19$; 20,4 %), bicolor blanco con negro ($n = 27$; 29 %), tricolor/calico ($n = 13$; 14 %) y color crema ($n = 11$; 11,8 %) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Capa de los gatos



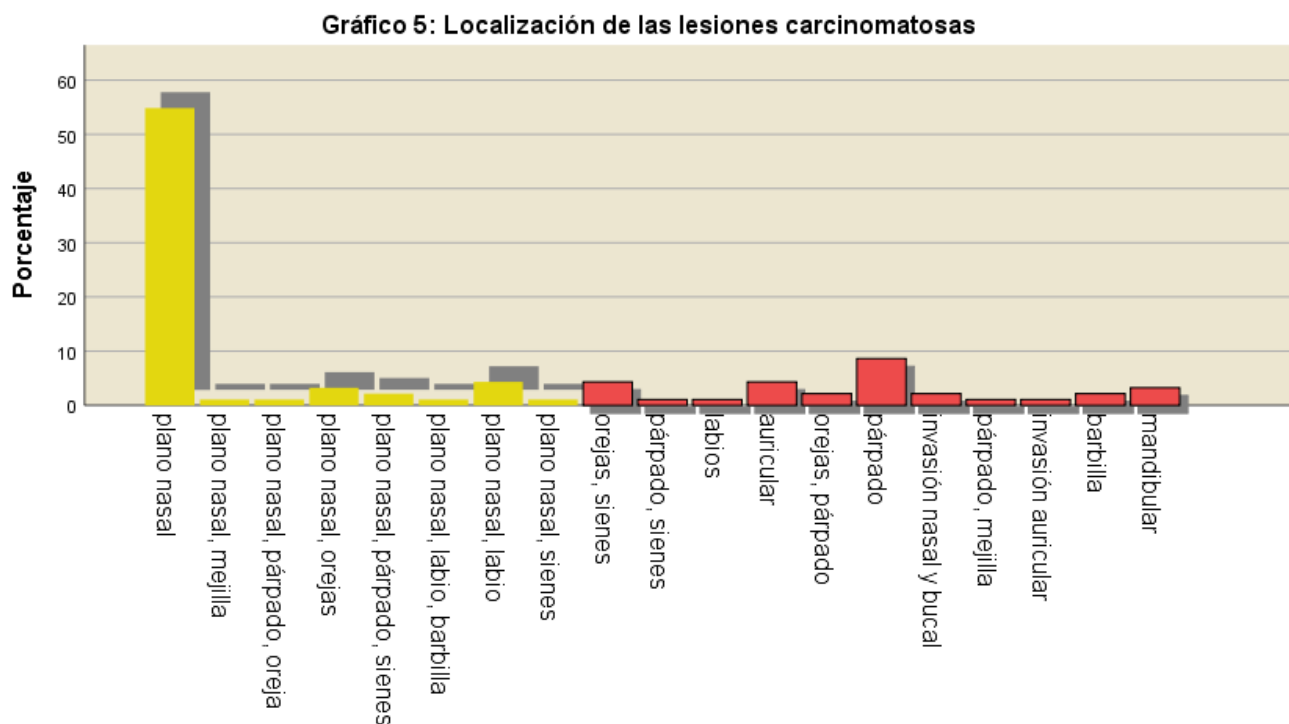
En cuanto a la procedencia geográfica, los pacientes fueron remitidos desde clínicas veterinarias y protectoras de animales, donde posteriormente fueron sometidos a procesos de adopción tras completar el tratamiento. La distribución por islas fue la siguiente: Gran Canaria (n = 50), Tenerife (n = 23) y Fuerteventura (n = 20) (Figura 4).



Figura 4. Mapa de la procedencia de los casos clínicos en las islas Canarias

4.2.1.3.- Presentación clínica y localización de las lesiones

Las lesiones carcinomatosas se localizaron exclusivamente en la región craneofacial, identificándose un total de 19 variantes topográficas distintas (Gráfico 5). No se observaron casos con afectación extracraneal.



La localización más frecuente fue el plano nasal, que se presentó como única región afectada en el 54,8 % de los casos. Cuando el plano nasal se combinó con otras regiones (como mejillas, párpados, pabellones auriculares, sienes, labios o mentón), se alcanzó una implicación total del 68,8 % de los pacientes (Figura 5 y 6).

En los casos en los que no se observó afectación del plano nasal, las lesiones se localizaron en otras áreas de la cabeza, con frecuencias variables: orejas, sienes, párpados, labios, mejillas, mandíbula y mentón, con una distribución comprendida entre el 1,1 % y el 8,6 %. Entre estas, los párpados constituyeron la segunda localización más frecuente como presentación única (Anexo: Tabla 5).

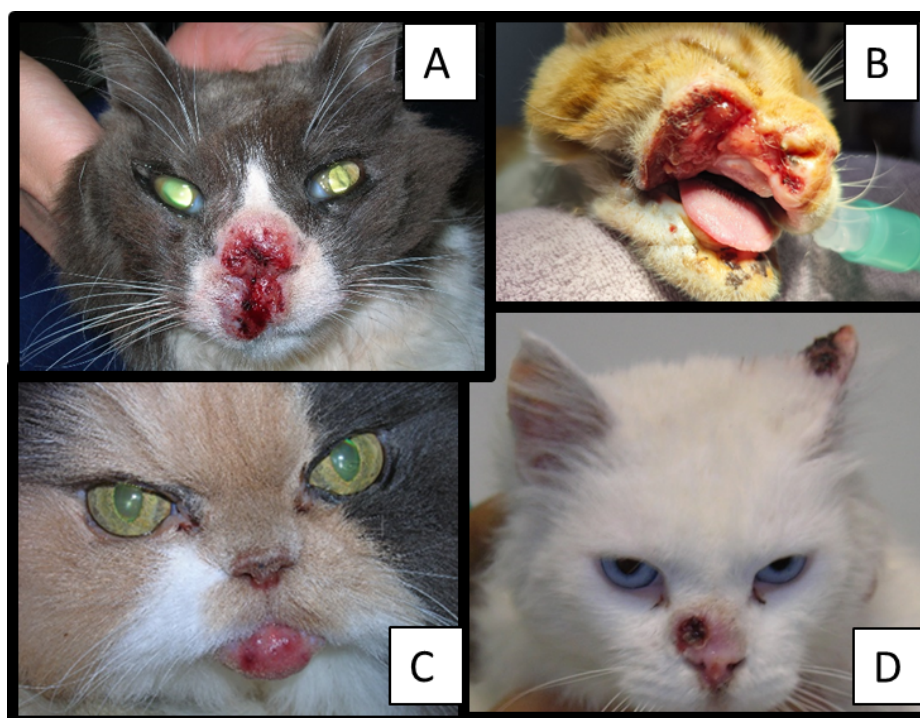


Figura 5. Imágenes clínicas de pacientes con CCE en diferentes combinaciones anatómicas de la región craneofacial: **(A)** Afectación del plano nasal y región labial; **(B)** Lesión en zona labial con invasión mandibular; **(C)** Lesión en mentón de un gato tricolor; **(D)** Afectación simultánea de pabellón auricular izquierdo y plano nasal en un gato de capa blanca.

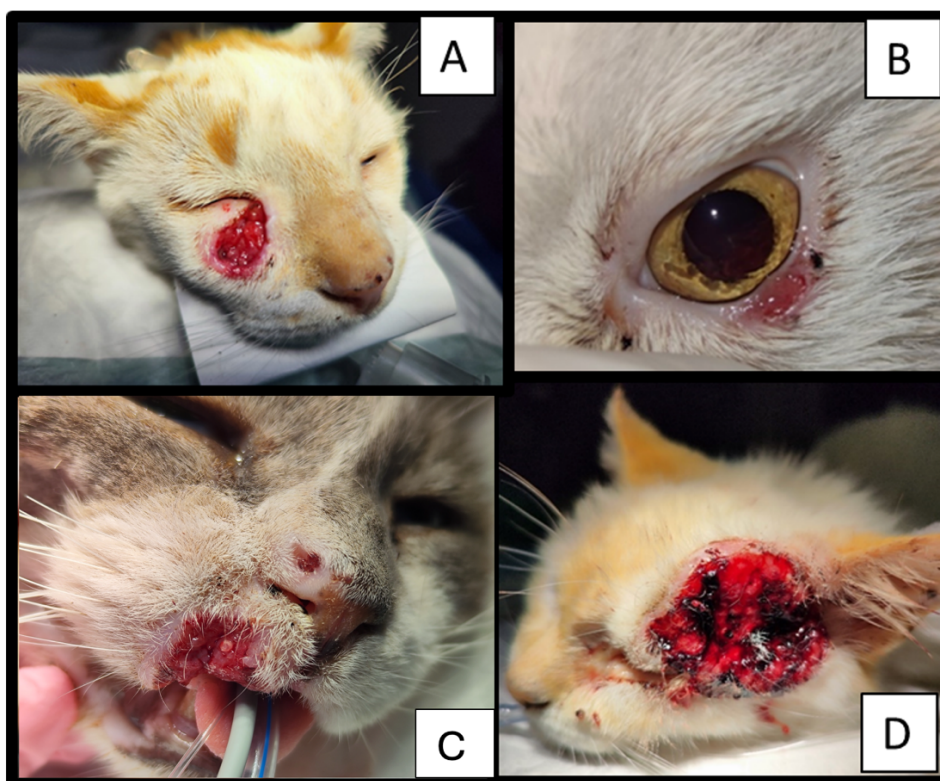


Figura 6. Variantes menos frecuentes de localización tumoral: **(A)** Lesión en la región cigomática rostral infraocular derecha; **(B)** Afectación del borde palpebral inferior; **(C)** Infiltración del labio superior/belfo derecho; **(D)** Lesión en la zona parietal izquierda.

4.2.1.4.- Diagnóstico y estadificación de los pacientes

Todos los pacientes fueron sometidos a una evaluación diagnóstica integral que incluyó examen físico general, palpación de linfonodos, análisis hematológicos, estudios citológicos y/o histopatológicos, así como pruebas de diagnóstico por imagen (radiografías, ecografías y, en casos seleccionados, tomografía computarizada –TC–) (Figuras 7, 8 y 9). La estadificación tumoral se realizó conforme a los hallazgos clínicos, diagnósticos por imagen e histopatológicos. Adicionalmente, se efectuaron pruebas serológicas para detección de virus de leucemia felina (FeLV) y virus de inmunodeficiencia felina (FIV), identificándose 11 animales positivos (11,8 %) de un total de 93 pacientes evaluados.



Figura 7. Imagen de TC (corte sagital) que muestra un CCE intranasal sin evidencia de destrucción ósea.

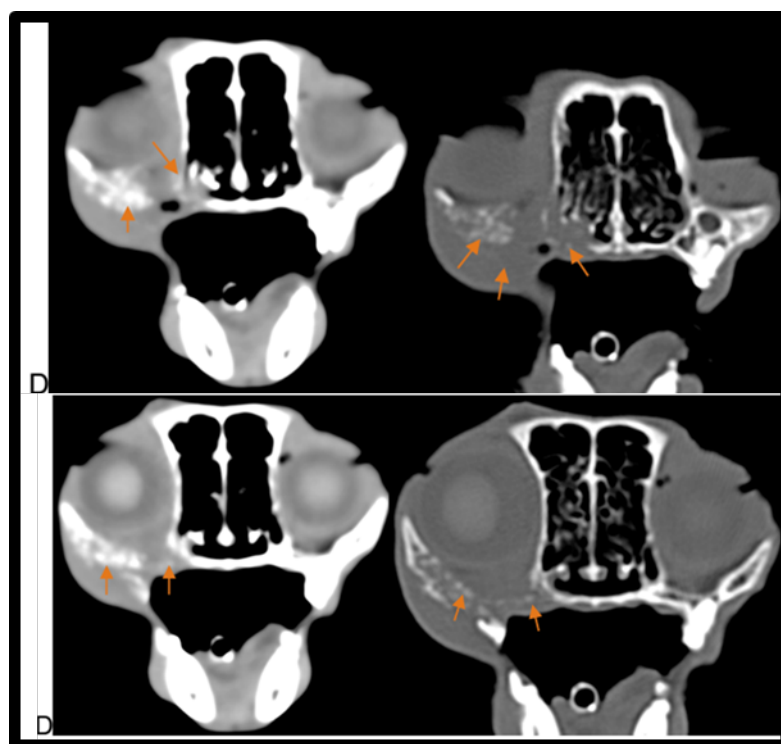


Figura 8. TC craneal en paciente con lesión carcinomatosa en paladar, con lisis del hueso nasal derecho, paladar duro ipsilateral y aspecto rostral del arco cigomático.

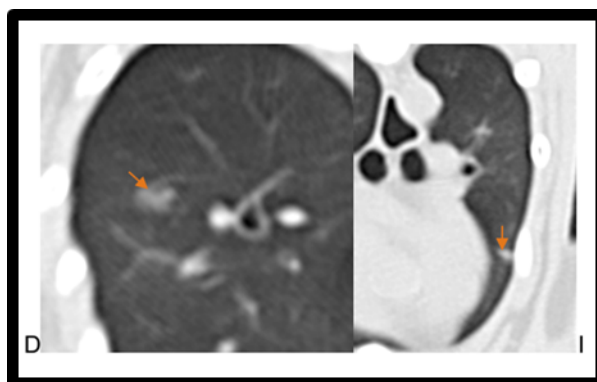


Figura 9. Imagen de TC torácico que evidencia lesiones opacas pulmonares compatibles con metástasis en un paciente con enfermedad avanzada.

El diagnóstico definitivo se obtuvo mediante estudio histopatológico en 73 casos (78,5 %), y mediante citología exclusiva en 20 casos (21,5 %) (Anexo: Tabla 6). La citología reveló características típicas de neoplasias epiteliales malignas, como anisocitosis, anisocariosis, multinucleación, vacuolización perinuclear y cromatina granular (Figuras 10 y 11).

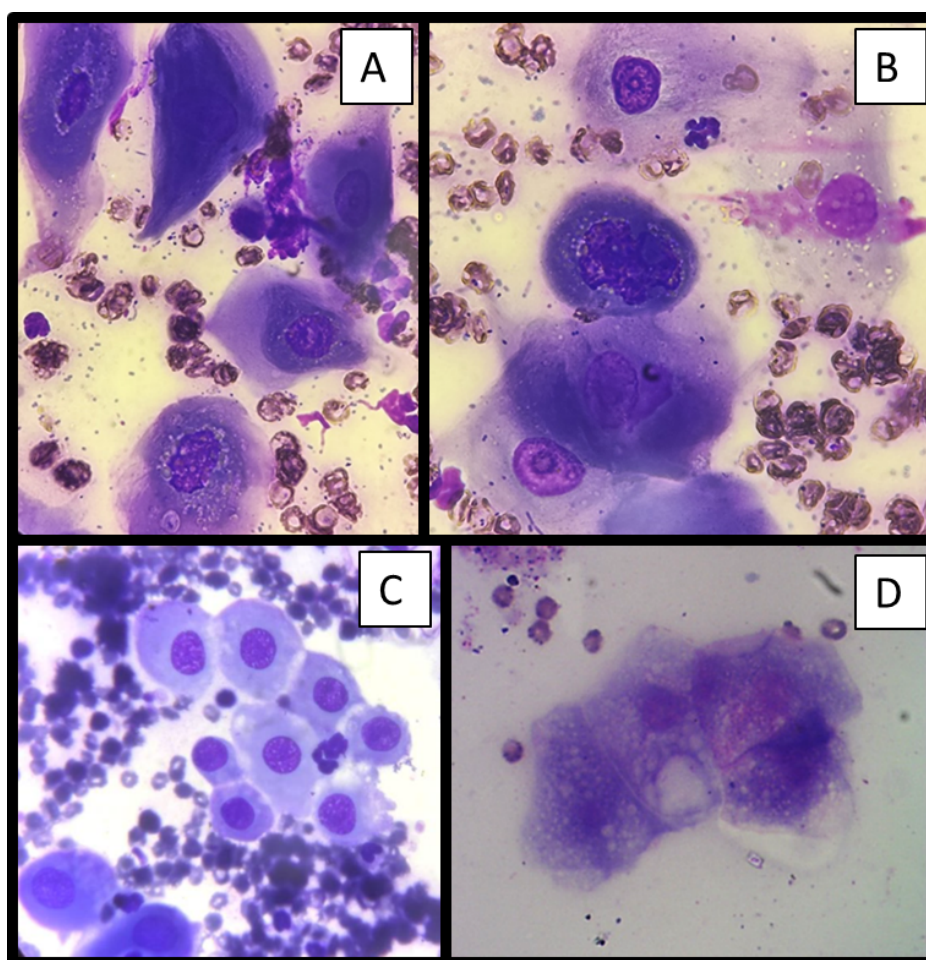


Figura 10. (A-D) Imágenes de microscopía óptica de citologías de lesiones carcinomatosas con diferentes grados de anisocitosis, anisocariosis, multinucleación, presencia de vacuolas perinucleares y cromatina granular.

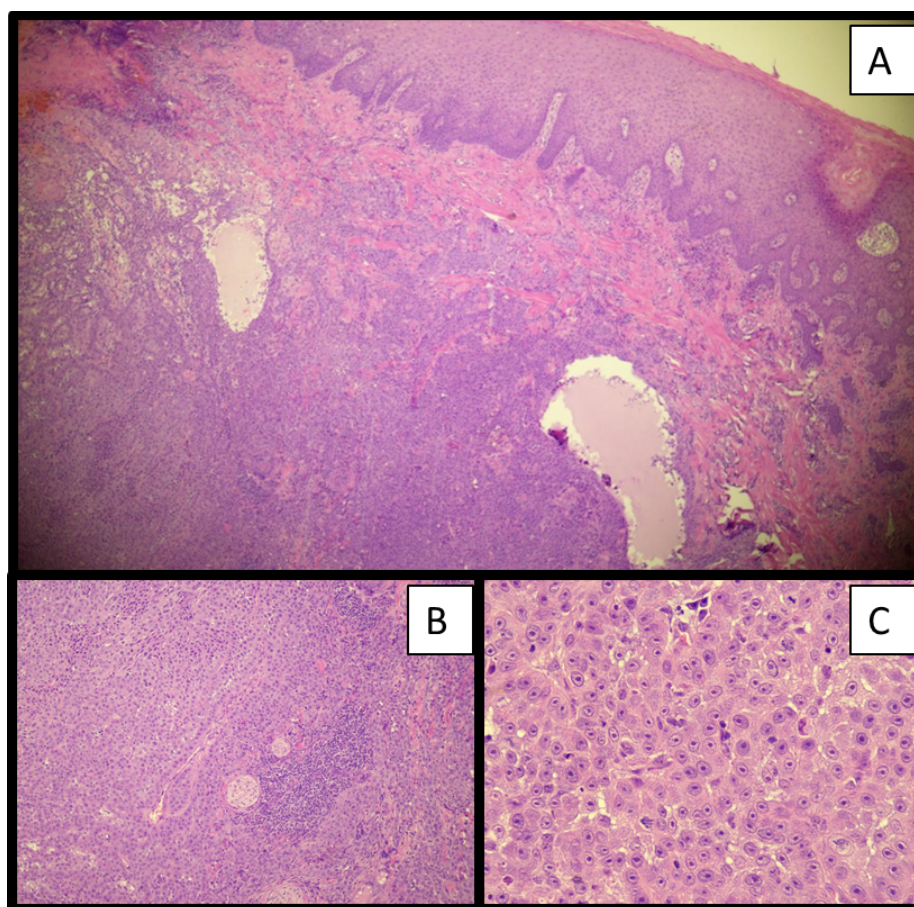


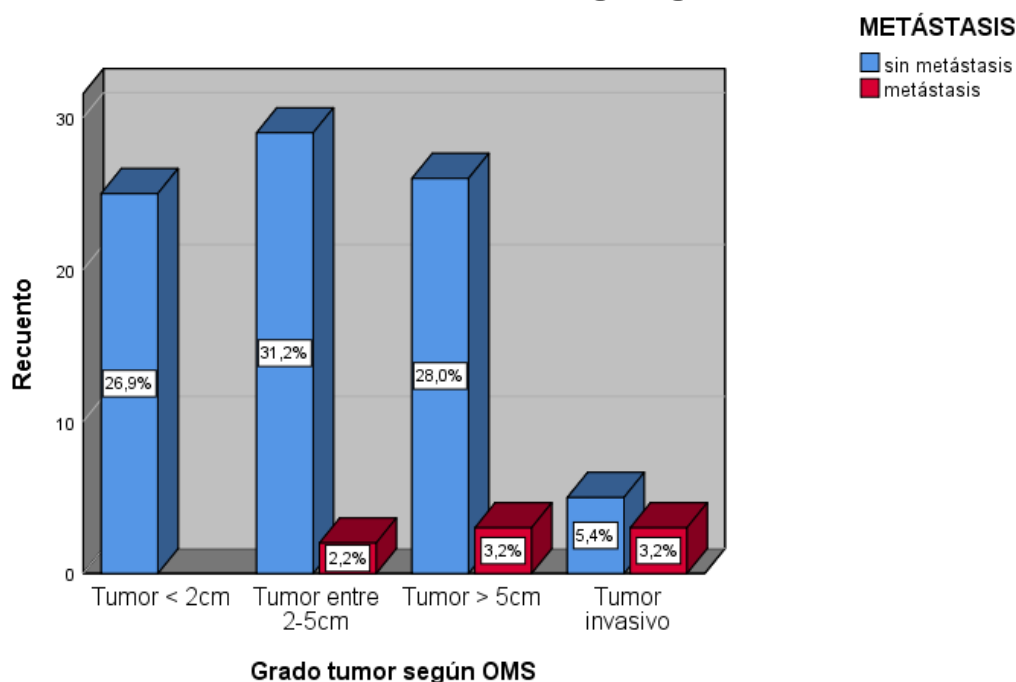
Figura 11. (A-C) Imágenes histopatológicas de CCE que muestran infiltración y proliferación de queratinocitos con morfología poliédrica, redondeada o fusiforme, atipias moderadas, mitosis activas y estructuras pseudoglandulares (patrón acantolítico). Se observa diferenciación escamosa superficial, ruptura de la membrana basal, necrosis, desmoplasia, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y piogranulomatoso, así como invasión de tejido conectivo y fibras musculares estriadas.

4.2.1.5.- Evaluación de metástasis.

A lo largo del estudio, se constató que 8 gatos (8,6 %) desarrollaron metástasis. En el resto de los casos ($n = 85$; 91,4 %), no se evidenciaron signos de diseminación metastásica. Al analizar la relación entre la presencia de metástasis y el grado tumoral, se observaron los siguientes resultados:

- En gatos con tumores de grado T1 ($n = 25$), no se identificaron metástasis (0 %).
- En el grupo T2 ($n = 29$), se registraron 2 casos (6,9 %).
- En los pacientes con tumores de grado T3 ($n = 26$), se observaron 3 casos (11,5 %).
- En el grupo con tumores invasivos T4 ($n = 13$), 3 pacientes (23,1 %) presentaron metástasis (Gráfico 6).

Gráfico 6: Presencia metástasis según el grado del tumor



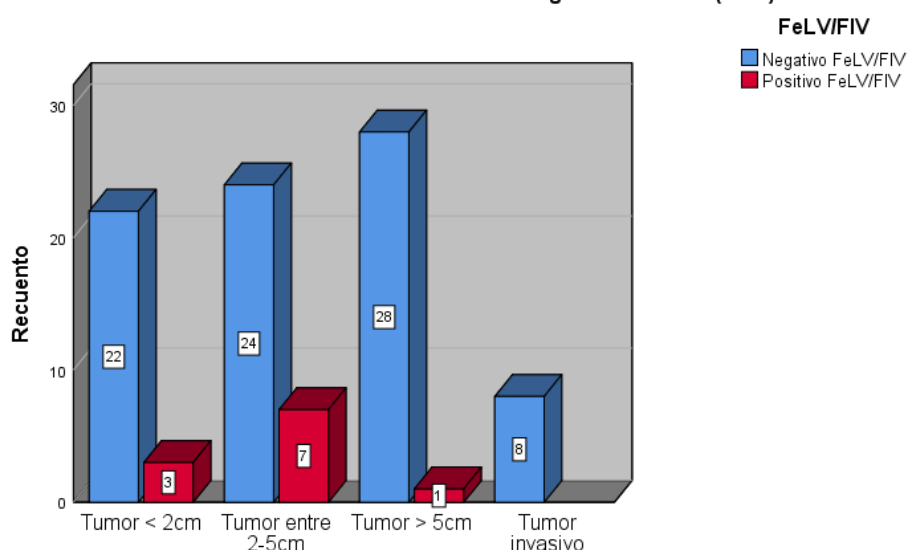
El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre el grado tumoral y la aparición de metástasis ($p < 0,05$), lo que sugiere que a mayor extensión e invasividad del tumor, mayor probabilidad de diseminación metastásica.

Además, se exploró la relación entre el estatus retroviral (FeLV/FIV) y la presencia de metástasis (Tabla 3). Todos los pacientes que desarrollaron metástasis fueron seronegativos para ambas infecciones. En cuanto a los gatos positivos ($n = 11$), todos eran clínicamente estables, y la mayoría de ellos ($n = 7$; 63,6 %) presentaban tumores de grado T2 (Gráfico 7).

Tabla 3. Valoración de metástasis en testados FeLV/FIV

		FeLV/FIV		Total
		Negativo FEL/FIV	Positivo FEL/FIV	
METÁSTASIS	sin metástasis	74	11	85
	metástasis	8	0	8
Total		82	11	93

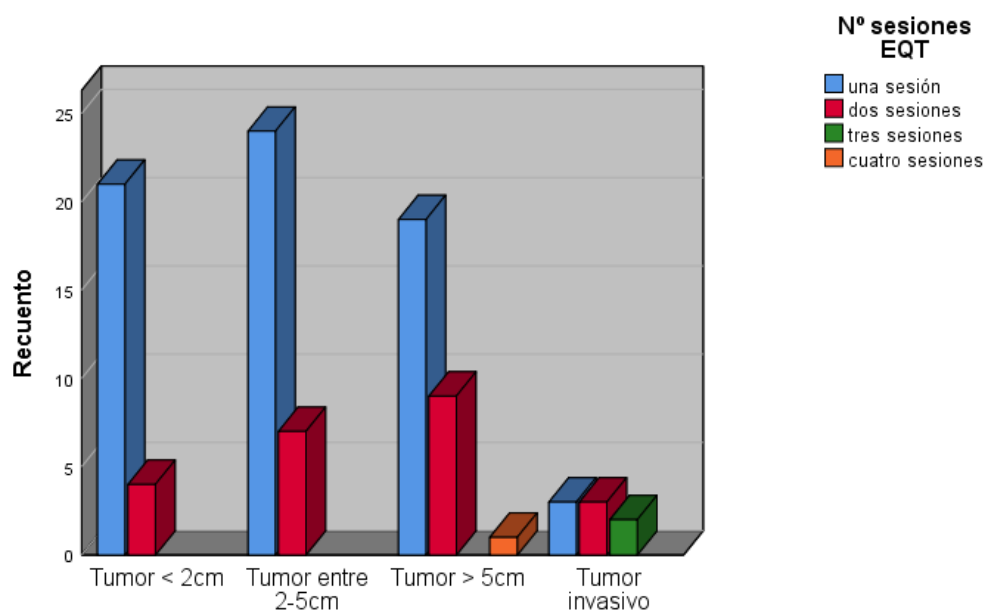
Gráfico 7: Casos FeLV/FIV en relación al grado del tumor (OMS)



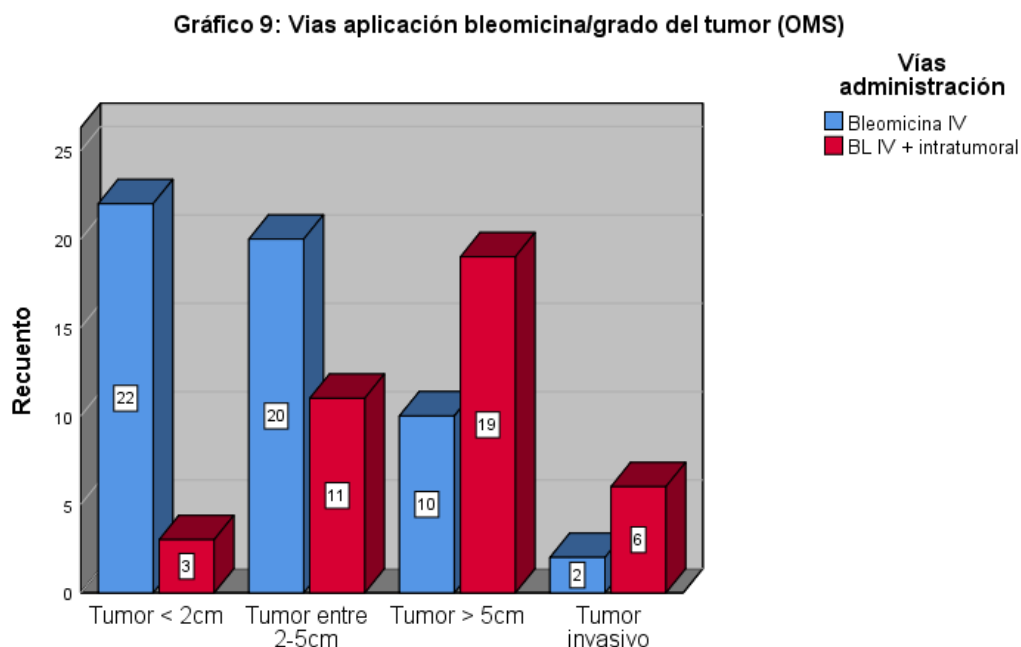
4.2.1.6.- Aplicación electroquimioterapia con bleomicina

En la totalidad de los casos del grupo 2 (n=93), se aplicó inicialmente una sesión de electroquimioterapia (EQT) combinada con bleomicina, administrada por vía intravenosa. En aquellos pacientes en los que no se obtuvo una resolución completa de la lesión o se evidenció progresión durante el seguimiento, se programaron sesiones adicionales. En el 72 % de los casos (n=67) fue suficiente una única sesión de EQT. El 24,7 % de los gatos (n=23) requirió dos aplicaciones, mientras que un pequeño número de pacientes con lesiones más extensas o recidivantes recibió tres (2,2 %, n=2) o incluso cuatro sesiones (1,1 %, n=1). Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el número de sesiones requeridas y el grado tumoral ($p < 0,05$), siendo los tumores de mayor grado (T3–T4) los que necesitaron múltiples intervenciones para lograr un control adecuado de la masa neoplásica (Gráfico 8).

Gráfico 8: Número sesiones EQT/Grado del tumor



En los casos en que se sospechaba una invasión tumoral más profunda o se observaban características clínico-patológicas que sugerían una mayor agresividad, se optó por complementar la administración intravenosa de bleomicina con la aplicación intralesional. Esta modalidad de tratamiento se implementó con el objetivo de potenciar la eficacia terapéutica local. La distribución de pacientes según la vía de administración empleada se resume en el Gráfico 9 (Anexo: Tabla 7).



4.2.1.6.1.- Evaluación de la respuesta tumoral

La evaluación de la respuesta tumoral se realizó mediante medición directa de las lesiones y seguimiento fotográfico seriado, tanto antes del tratamiento como a lo largo del seguimiento post-terapéutico. Esta documentación permitió identificar la evolución clínica de las lesiones. Para la clasificación de la respuesta local al tratamiento se utilizaron los siguientes criterios estandarizados: remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva.

Abreviaturas

Remisión completa	RC
Remisión parcial	RP
Enfermedad progresiva	EP
Enfermedad estable	EE

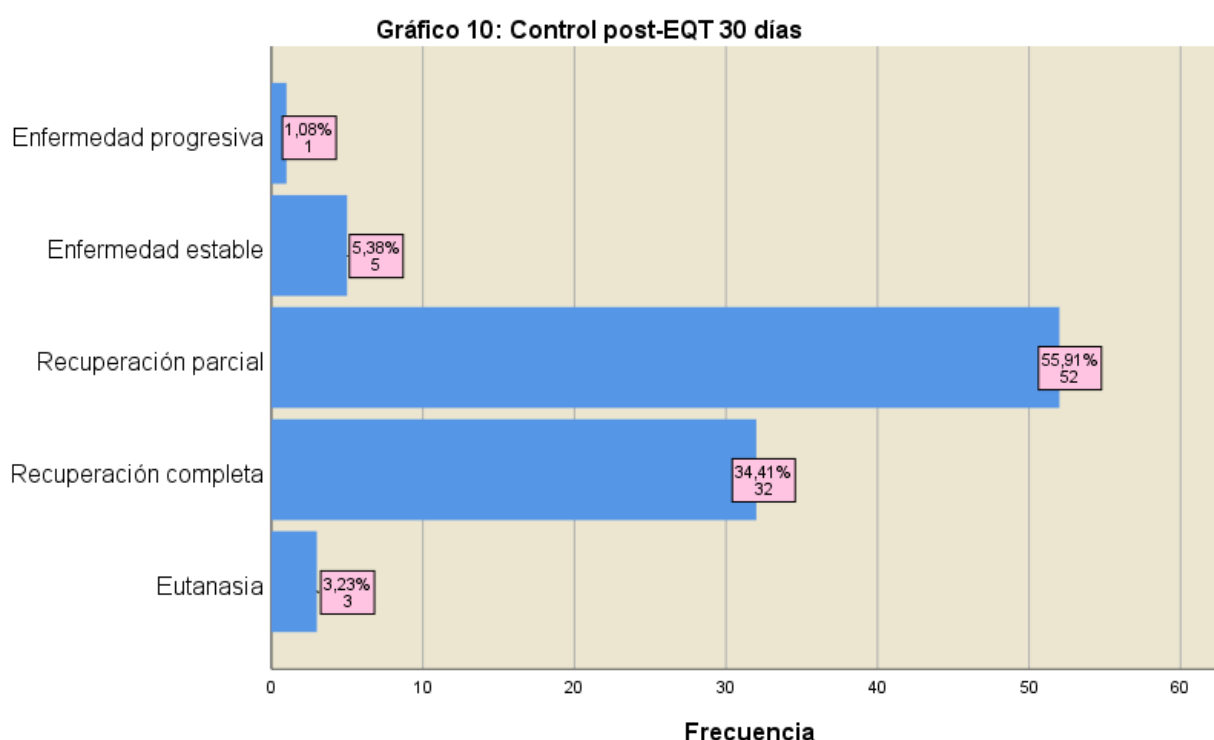
4.2.1.6.2.- Respuesta a la EQT a los 30, 90 y 180 días del tratamiento

Se realizaron controles clínicos intensivos durante las primeras semanas tras la aplicación de la EQT con bleomicina, con el objetivo de detectar efectos adversos locales o sistémicos, así como complicaciones en la cicatrización. Posteriormente, el seguimiento se estableció a los 30, 90 y 180 días post-tratamiento. En un subgrupo de pacientes, se extendió el seguimiento hasta 1–3 años. Asimismo, se documentaron los casos perdidos por eutanasia, fallecimiento por otras causas, fuga o adopción sin posterior acceso al control clínico.

Cabe destacar que tres pacientes (dos con tumores T3 y uno con tumor T4) fueron eutanasiados antes de cumplir el primer mes de seguimiento, debido a la gravedad de las lesiones y al deterioro clínico severo.

4.2.1.6.2.1.- Resultados a los 30 días

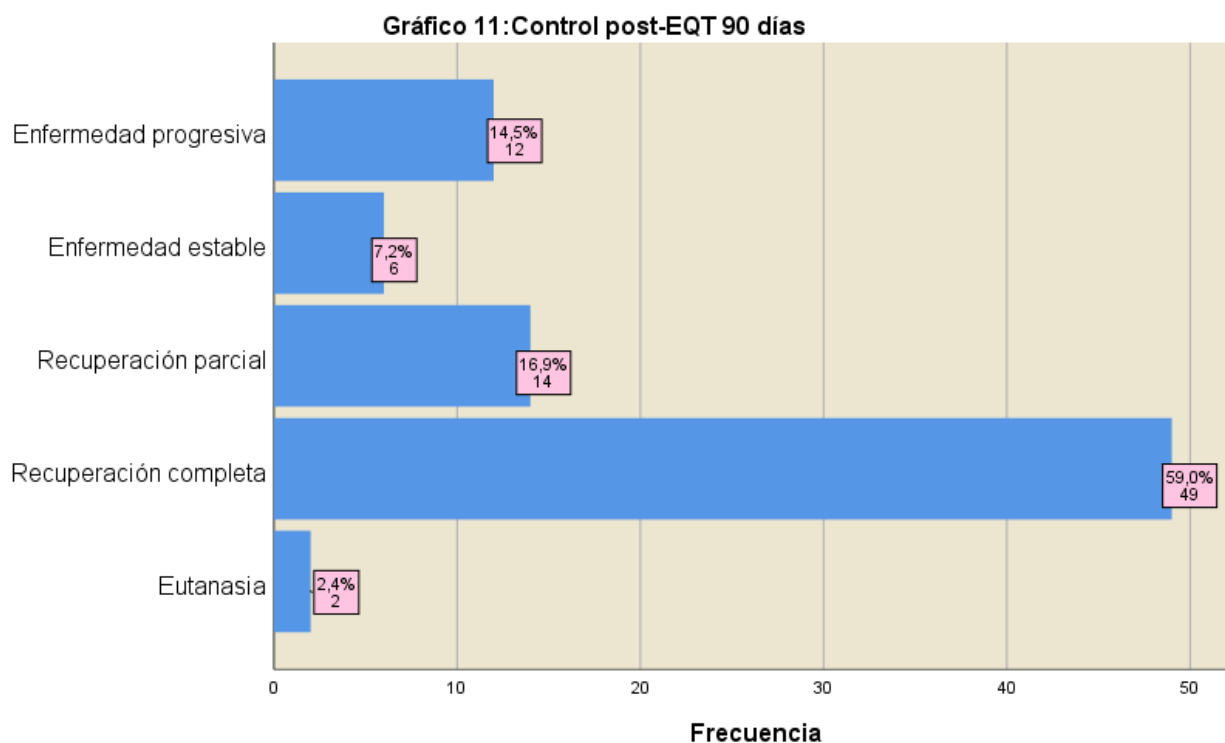
A los 30 días post-EQT, el 90,3% de los gatos presentó una respuesta favorable: 34,4% con remisión completa (RC) y 55,9% con remisión parcial (RP). La enfermedad se mantuvo estable (EE) en el 5,4% de los casos, mientras que se observó progresión (EP) en un 1,1% (Gráfico 10).



4.2.1.6.2.2.- Resultados a los 90 días

En el control realizado a los 90 días tras la aplicación de la EQT con bleomicina, se observó una respuesta terapéutica positiva en el 75,9% de los pacientes (RC en el 59% y RP en el 16,9%). En un 7,2% de los casos, la enfermedad se mantuvo estable, mientras que se detectó progresión tumoral en el 14,5% de los animales tratados (Gráfico 11). En esta etapa del seguimiento, fue necesaria la eutanasia de dos pacientes (2,4%) debido al agravamiento de la enfermedad.

RESULTADOS



En los casos en los que se observó una respuesta parcial o se detectaron recidivas locales, se valoró la posibilidad de realizar una segunda intervención terapéutica con EQT, con el objetivo de mejorar el control local del tumor y, en su caso, alcanzar una remisión completa (Figuras 12 y 13).

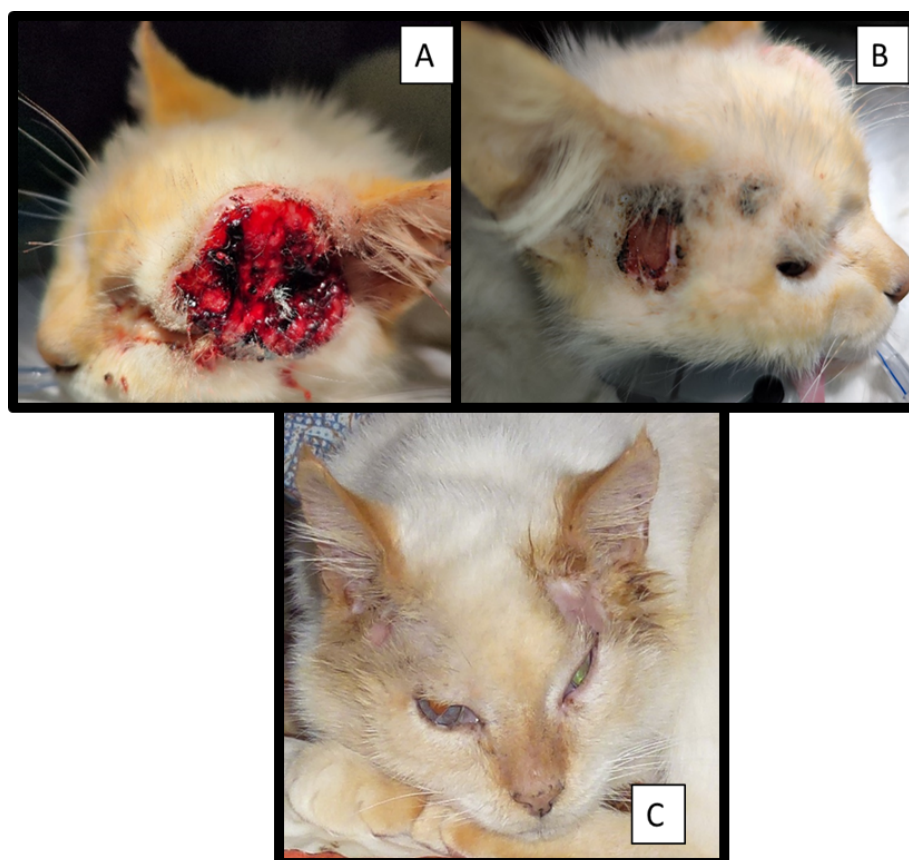


Figura 12. (A-B) Paciente felino con CCE de grado alto bilateral en ambos parietales. (C) Tras dos sesiones de EQT se consigue una recuperación completa de la enfermedad (semana 12).



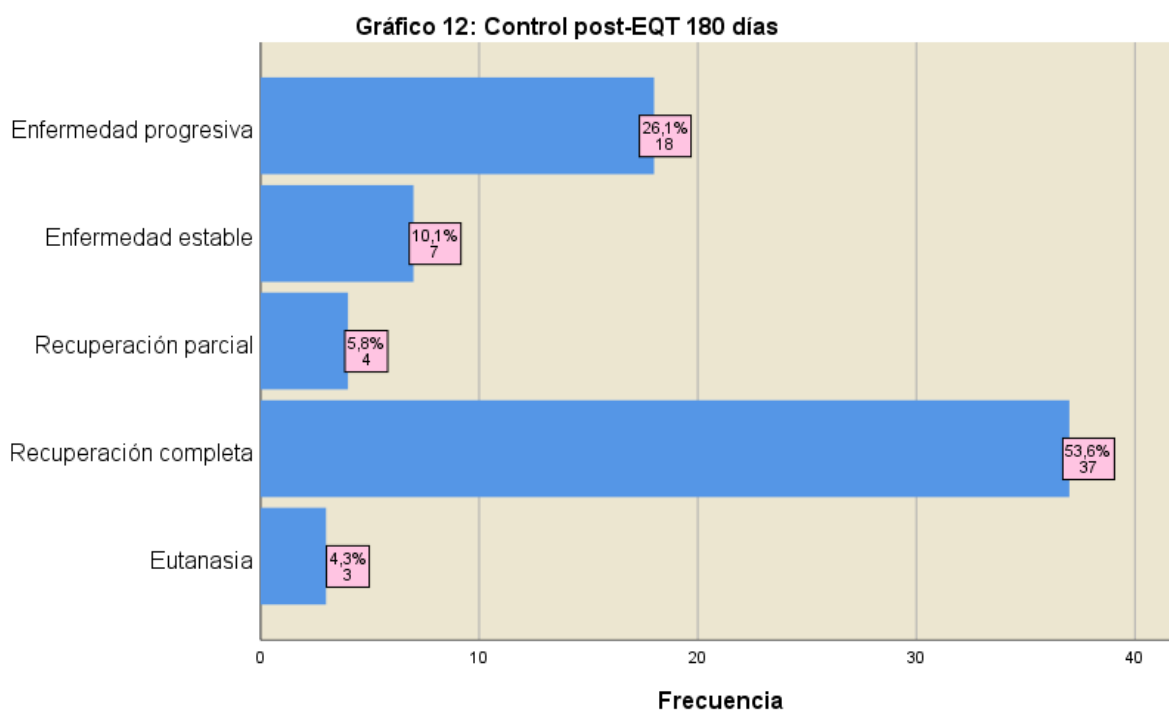
Figura 13. (A) Paciente felino con CCE en el plano nasal antes del tratamiento; (B) Mismo paciente a las 8 semanas tras una sola sesión de EQT.

Adicionalmente, se documentaron 9 casos en los que no fue posible completar el seguimiento clínico.

4.2.1.6.2.3.- Resultados a los 180 días

En la evaluación realizada a los 180 días post-EQT, se observó una recuperación clínica en el 59,4% de los pacientes (RC 53,6% + 5,8 RP) (Gráfico 12; Figura 14). Asimismo, el 10,1% de los animales presentaron enfermedad estable (Figura 15), mientras que se registró progresión tumoral en el 26,1% de los casos.

En esta fase del estudio, correspondiente al sexto mes post-tratamiento, fue posible evaluar clínicamente a 69 de los 93 pacientes inicialmente incluidos. Durante este periodo, tres gatos fueron eutanasiados debido al agravamiento del proceso tumoral, mientras que 12 casos no pudieron ser valorados por pérdida de seguimiento, atribuible a adopciones, accidentes u otras circunstancias que impidieron la comunicación con los responsables de los animales.



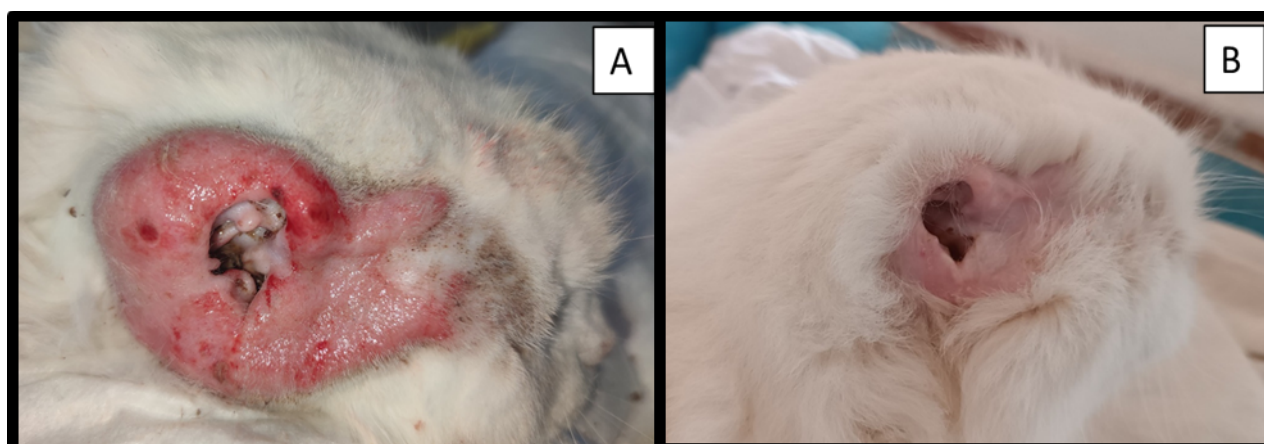


Figura 14: (A) Imagen anterior a sesión de EQT en paciente con cirugía previa por CCE auricular, con recidiva en inflamación asociada con prurito. (B) El mismo paciente tras recuperación completa con una sesión de EQT (semana 20).

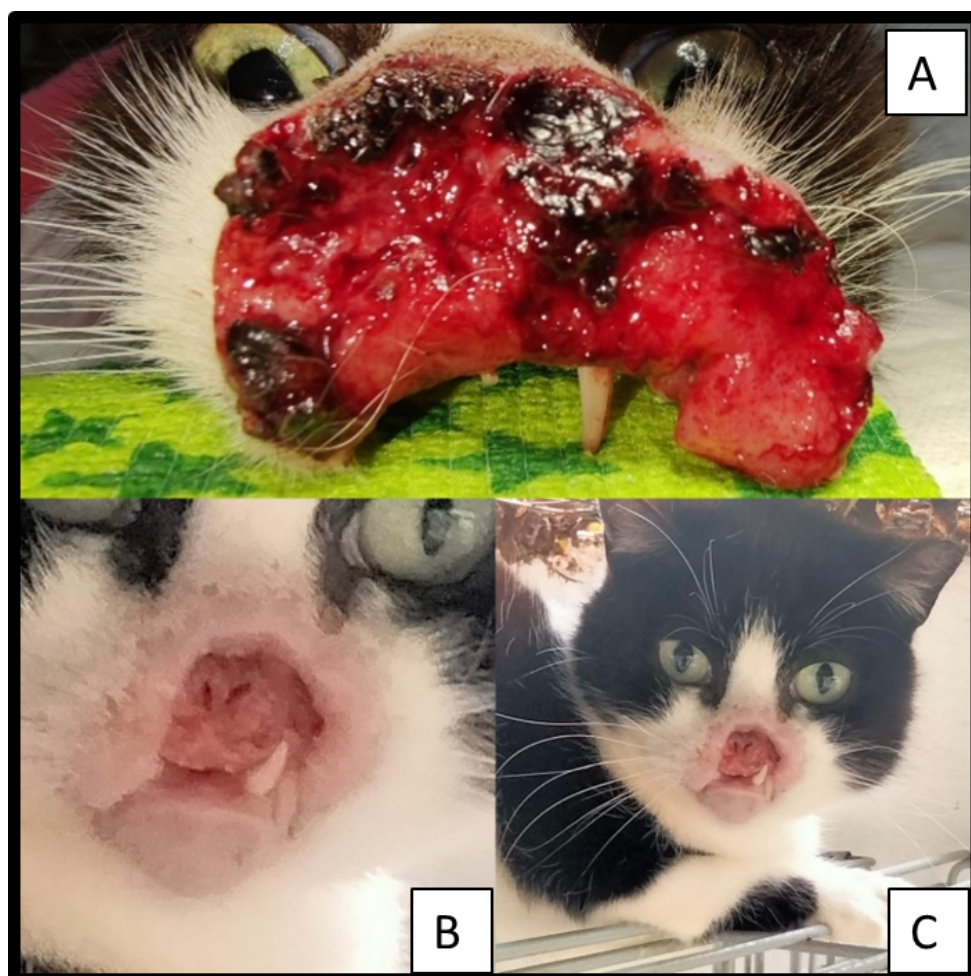


Figura 15: Imágenes de lesión carcinomatosa en el plano nasal de un paciente felino, en grado invasivo avanzado (A) tratado con EQT como terapia paliativa. Se puede apreciar su evolución a las 12 semanas (B y C).

La evolución de la respuesta clínica a los 90 y 180 días mostró tendencias similares. El análisis comparativo entre tiempos evidenció una tendencia significativa a la mejora o mantenimiento de la respuesta en pacientes con remisión parcial inicial, así como estabilidad en aquellos que alcanzaron remisión completa precozmente.

4.2.1.6.3.- Respuesta clínica según el grado tumoral (subgrupo 1 y subgrupo 2)

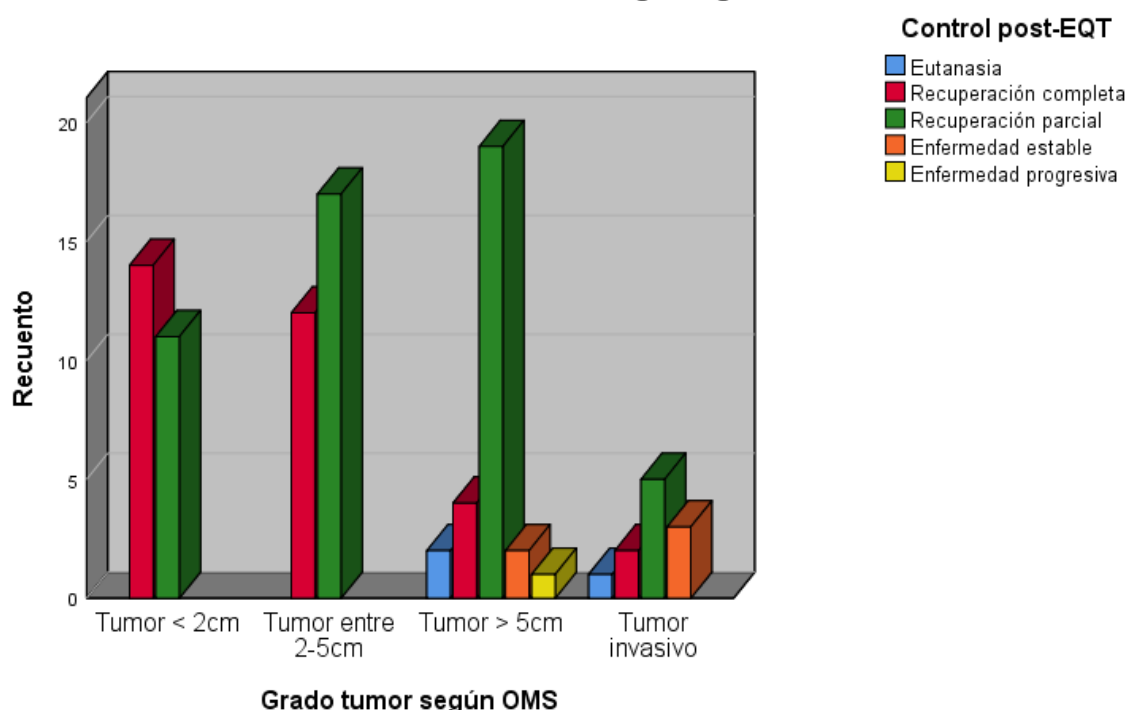
Los datos previamente presentados corresponden a la respuesta clínica global de los pacientes sin considerar el grado tumoral. Dado que este factor representa un parámetro fundamental tanto para la selección de estrategias terapéuticas como para el pronóstico en oncología, se analizó la respuesta al tratamiento estratificada por grado tumoral.

4.2.1.6.3.1.- Resultados a los 30 días

A los 30 días tras la aplicación de EQT con bleomicina, se observó una respuesta favorable en el 100% de los pacientes con tumores de grado T1 y T2 (subgrupo 1, n=54), distribuyéndose en 48% (n=26) de remisión completa (RC) y 52% (n=28) de remisión parcial (RP). En contraste, en los pacientes con tumores de mayor grado, T3 y T4 (subgrupo 2, n=39), la tasa global de respuesta fue del 77%; de estos, 15% (n=6) alcanzó RC y 62% (n=24) presentó RP; 3 de ellos tuvieron que ser eutanasiados. En el subgrupo 2 (tumores de mayor grado), predominó la respuesta parcial sobre la completa (Gráfico 13; Anexo Tabla 8).

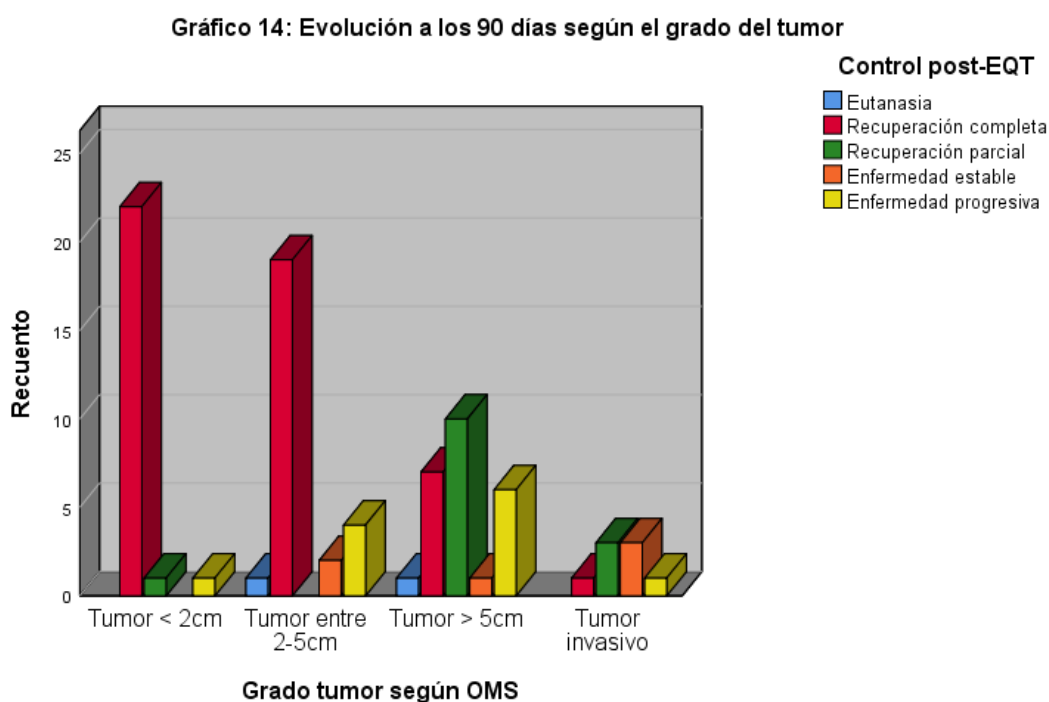
El análisis comparativo reveló una asociación estadísticamente significativa entre el grado tumoral y la respuesta clínica observada 30 días después del tratamiento ($p < 0,05$). Este resultado sugiere que, a medida que aumenta el grado del tumor, disminuye la probabilidad de alcanzar una remisión completa.

Gráfico 13: Evolución a los 30 días según el grado del tumor



4.2.1.6.3.2.- Resultados a los 90 días

A los 90 días post-tratamiento, los gatos con tumores de bajo grado T1-T2 (subgrupo 1, n=50), alcanzaron una tasa de recuperación del 84%, compuesta por un 82% (n=41) de remisiones completas (RC) y un 2% (n=1) de remisiones parciales (RP). Por otro lado, los pacientes con tumores de mayor grado T3-T4 (subgrupo 2, n=30), mostraron una tasa de respuesta total del 63%, de ellos RC 24% (n=8) y RP 39% (n=13) (Gráfico 14; anexo Tabla 9).

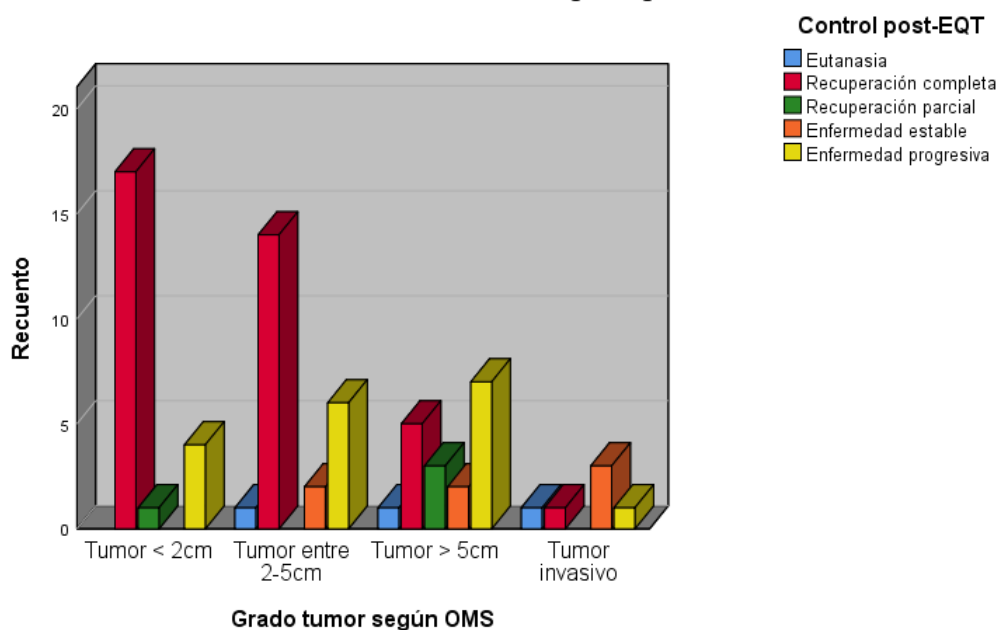


Respecto a la evolución no favorable, se reportó enfermedad estable (EE) en el 4% (n=2) de los casos T1-T2 y en el 12% (n=4) de los casos T3-T4. La progresión de la enfermedad (EP) fue más frecuente en fases más avanzadas del seguimiento, se detectó progresión en el 10% (n=5) de los casos T1-T2 y en el 21% (n=7) de los T3-T4. En esta fase del control, 2 gatos fueron eutanasiados.

4.2.1.6.3.3.- Resultados a los 180 días

En el control a los 180 días, la respuesta clínica se mantuvo en el 71% de los gatos del subgrupo 1 con tumores T1-T2, con RC 69% (n=31) + RP 2% (n=1), mientras que en el subgrupo 2, con tumores T3-T4 se observó una respuesta del 38% , con RC 25% (n=6) + RP 13% (n=3). Enfermedad estable (EE) fue registrada en el 10% (n=2) de los tumores de bajo grado y en el 21% (n=5) de los tumores de alto grado. La progresión de la enfermedad (EP) fue más frecuente en fases más avanzadas del seguimiento. Esta proporción aumentó, afectando al 42% (n=10) de los casos T1-T2 y al 33% (n=8) de los T3-T4 (Gráfico 15; Anexo: Tabla 10). Durante esta fase de seguimiento, 3 gatos fueron eutanasiados por empeoramiento del estado clínico relacionado con la progresión tumoral.

Gráfico 15: Evolución a los 180 días según el grado del tumor



En resumen, el análisis comparativo por grado tumoral confirma una mayor tasa de respuesta sostenida en los tumores menos agresivos (T1-T2), con una respuesta global del 71% (n=32) a los seis meses. No obstante, se logró también un control clínico parcial o completo en el 38% (n=9) de los gatos con tumores avanzados (T3-T4), lo que indica que incluso en estadios más avanzados la EQT puede ofrecer beneficios clínicos relevantes.

4.2.1.6.4.- Respuesta clínica a la EQT en gatos positivos a FeLV/FIV (subgrupo 3)

Del total de pacientes incluidos en el estudio (n=93), once gatos (11,8%) resultaron positivos a FeLV y/o FIV tras la realización de pruebas serológicas. La evolución clínica de estos pacientes fue comparada con la de los gatos negativos al test, a fin de evaluar si la presencia de estas virosis influía en la respuesta al tratamiento con EQT combinada con bleomicina.

4.2.1.6.4.1.- Resultados a los 30 días

A los 30 días post-tratamiento, los gatos positivos a FeLV/FIV mostraron una respuesta clínica favorable en el 100% de los casos (n=11). En este grupo, se observó un 36,4% de remisiones completas (RC) y un 63,6% de remisiones parciales (RP). No se registraron casos de enfermedad estable (EE), progresiva (EP), ni eutanasia en este subgrupo (Tabla 4).

Tabla 4. Control post-EQT 30 días

		FELV/FIV		Total
		Negativo FELV/FIV	Positivo FELV/FIV	
CONTROL EQT 30 días	Eutanasia	3	0	3
	Recuperación completa	28	4	32
	Recuperación parcial	45	7	52
	Enfermedad estable	5	0	5
	Enfermedad progresiva	1	0	1
Total		82	11	93

4.2.1.6.4.2.- Resultados a los 90 días

A los 90 días, de los 9 gatos FeLV/FIV positivos que continuaron en seguimiento, 7 (77,8%) presentaron remisión completa, mientras que 1 paciente presentó enfermedad estable y otro desarrolló progresión tumoral. No se registraron eutanasias en este grupo (Tabla 5).

En el grupo de gatos negativos (n=74), la tasa de remisión completa fue del 56,8% (n=42), con 14 remisiones parciales (18,9%), 5 enfermedades estables (6,8%), 11 progresiones (14,9%), y 2 eutanasias (2,7%).

Tabla 5. Control post-EQT 90 días

		FELV/FIV		Total
		Negativo FEL/FIV	Positivo FEL/FIV	
CONTROL EQT90 días	Eutanasia	2	0	2
	Recuperación completa	42	7	49
	Recuperación parcial	14	0	14
	Enfermedad estable	5	1	6
	Enfermedad progresiva	11	1	12
Total		74	9	83

4.2.1.6.4.3.- Resultados a los 180 días

A los 180 días del tratamiento (Tabla 6), el número de gatos positivos evaluables fue de 7. De ellos, 4 (57,1%) presentaron remisión completa, 2 (28,6%) progresión de la enfermedad y 1 gato (14,3%) fue eutanasiado. No se reportaron remisiones parciales ni enfermedad estable en este subgrupo. Entre los 62 gatos negativos al test, se observó una remisión completa en 33 casos (53,2%), remisión parcial en 4 (6,5%), enfermedad estable en 7 (11,3%), progresión tumoral en 16 (25,8%) y eutanasia en 2 casos (3,2%).

Tabla 6 Control post-EQT 180 días

		FELV/FIV		Total
		Negativo FEL/FIV	Positivo FEL/FIV	
CONTROL EN 180 DÍAS	Eutanasia	2	1	3
	Recuperación completa	33	4	37
	Recuperación parcial	4	0	4
	Enfermedad estable	7	0	7
	Enfermedad progresiva	16	2	18
Total		62	7	69

Los resultados obtenidos permiten señalar que los gatos positivos a FeLV/FIV presentaron tasas de respuesta clínica comparables, e incluso ligeramente superiores, a corto y medio plazo en comparación con los pacientes negativos, particularmente en los controles realizados a los 30 y 90 días posteriores a la aplicación de la EQT. Dentro del subgrupo positivo, la mayoría de los casos correspondían a tumores de bajo grado, seleccionados intencionalmente para evaluar la viabilidad del tratamiento en

RESULTADOS

animales con infecciones retrovirales subclínicas. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los distintos puntos de control.

4.2.1.6.5.- Respuesta en gatos que recibieron terapia combinada EQT-bleomicina/Toceranib (subgrupo 4)

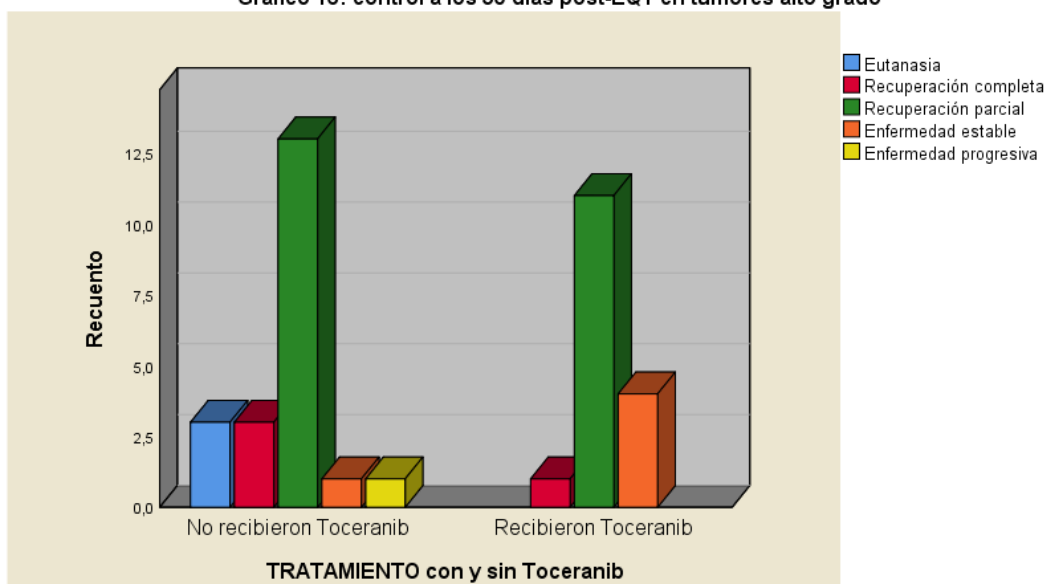
Del total de 93 gatos incluidos en el estudio, 17 animales recibieron tratamiento complementario con toceranib (Palladia®) por vía oral, además del protocolo estándar de EQT con bleomicina. La mayoría de los pacientes que recibieron esta terapia combinada presentaban tumores de mayor grado, clasificados como T3 y T4. La distribución de los tratamientos según el grado tumoral se resume en la Tabla 7.

Tabla 7: Distribución de gatos tratados con y sin toceranib según el grado tumoral

		TRATAMIENTO con y sin Toceranib		Total
		No recibieron Toceranib	Recibieron Toceranib	
Grado tumor según OMS	Tumor < 2cm	25	0	25
	Tumor entre 2-5cm	28	1	29
	Tumor > 5cm	16	12	28
	Tumor invasivo	7	4	11
Total		76	17	93

La evaluación de la respuesta clínica a los 30 días post-tratamiento en el subgrupo de pacientes que recibió toceranib adicional mostró resultados similares a los observados en el grupo tratado únicamente con EQT/bleomicina. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en este punto de control (Gráfico 16; Anexo: Tabla 11).

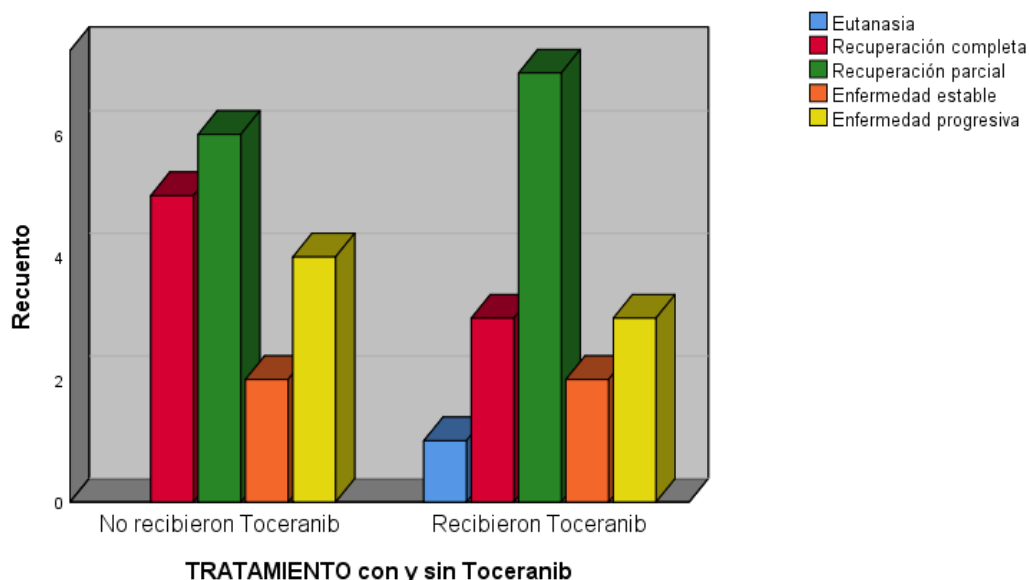
Gráfico 16: control a los 30 días post-EQT en tumores alto grado



RESULTADOS

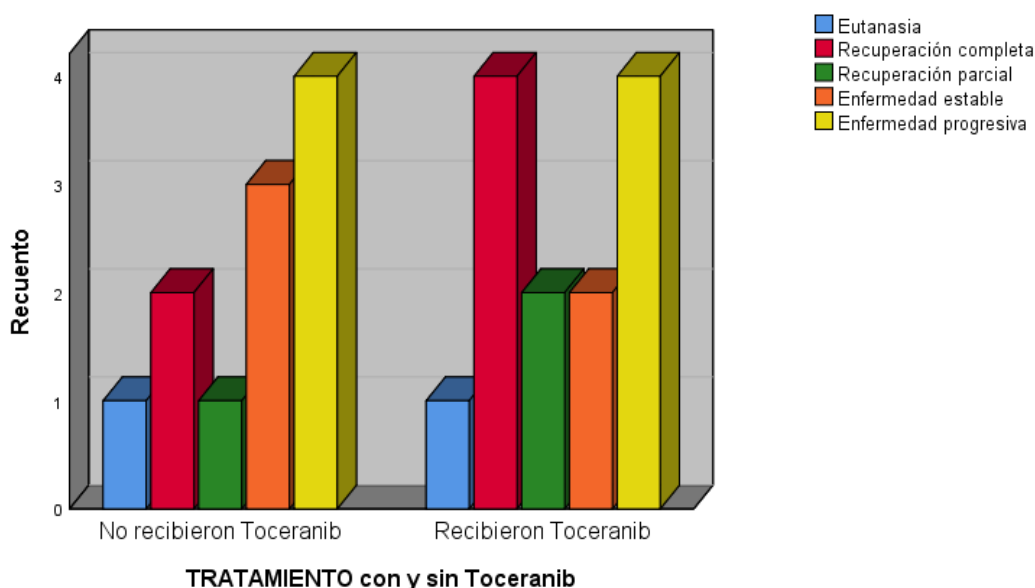
En el control realizado a los 90 días posteriores al tratamiento (Gráfico 17; Anexo: Tabla 12), se observaron respuestas clínicas comparables entre los pacientes tratados únicamente con EQT/bleomicina y aquellos que además recibieron toceranib. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Gráfico 17: control a los 90 días post-EQT en tumores de alto grado



A los 180 días del tratamiento (Gráfico 18; Anexo: Tabla 13), se evaluó la evolución clínica en un subgrupo de 24 gatos con tumores de alto grado (T3 y T4), en los que fue posible mantener el seguimiento. Aunque el tamaño de la muestra no permite establecer conclusiones definitivas, se observó una mayor proporción de recuperación clínica en el grupo tratado con la combinación de EQT/bleomicina y toceranib, en comparación con aquellos que no recibieron esta terapia adicional. Sin embargo, en lo que respecta a los casos con progresión tumoral, los porcentajes se mantuvieron similares entre ambos grupos.

Gráfico 18: control a los 180 días post-EQT en tumores de alto grado

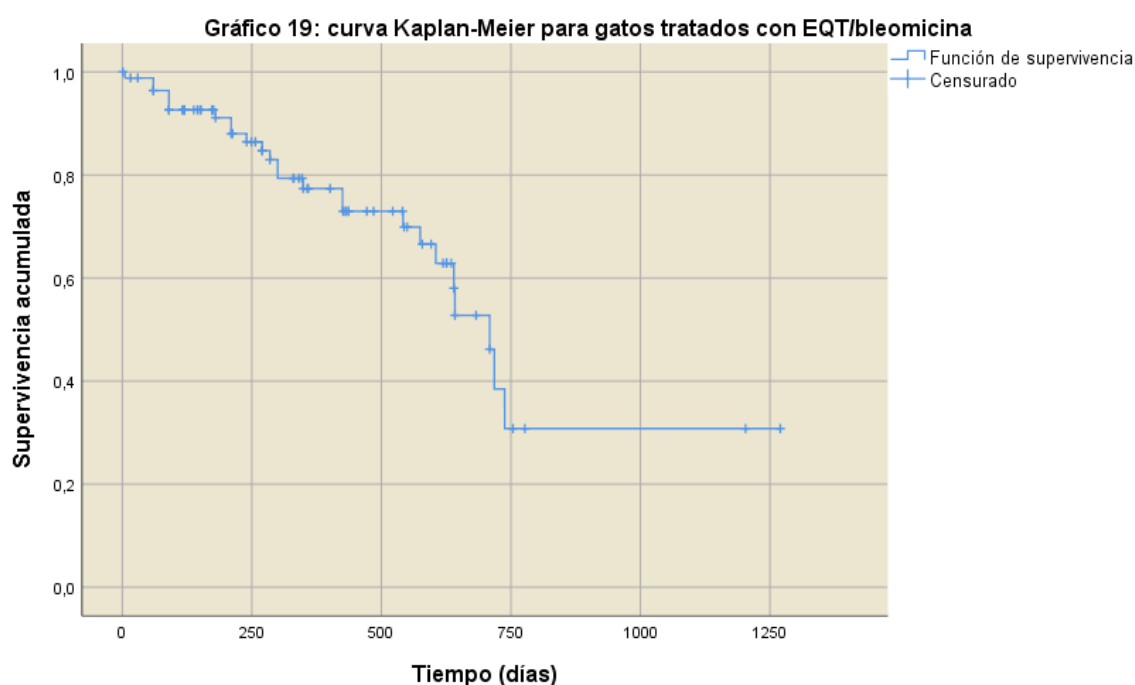


4.2.1.6.6- *Análisis de supervivencia en la población de estudio*

4.2.1.6.6.1- **Análisis de supervivencia en el grupo global (grupo 2)**

Para valorar el tiempo transcurrido hasta la aparición de un evento clínico relevante, se realizó un análisis de supervivencia considerando como variable principal el tiempo libre de evento (supervivencia), definido como el intervalo entre la administración inicial del tratamiento y la aparición de recidiva, fallecimiento o pérdida del paciente durante el seguimiento.

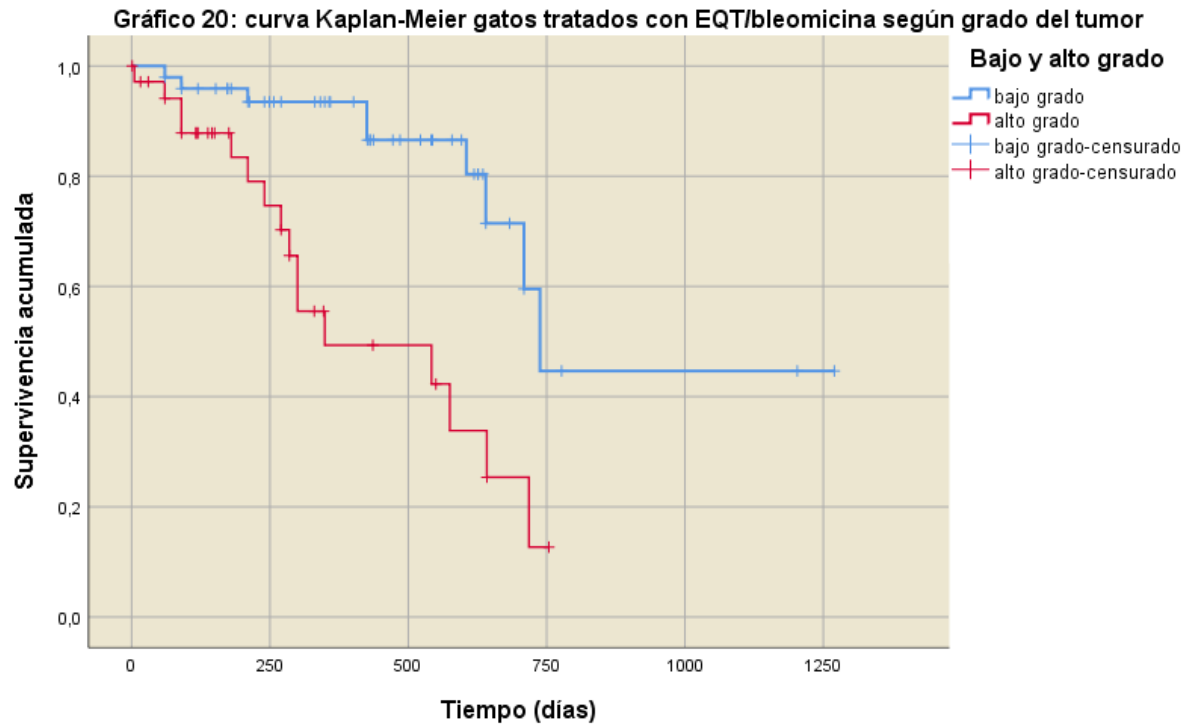
En primer lugar, se construyó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para la totalidad de los gatos tratados con EQT combinada con bleomicina, sin estratificación por variables como el grado tumoral o la administración adicional de otras terapias (Gráfico 19). En esta cohorte, el 70,6% de los gatos fueron censurados, es decir, permanecían vivos y sin evento al cierre del período de seguimiento. La estimación media de supervivencia fue de 736,6 días ($\pm 74,6$).



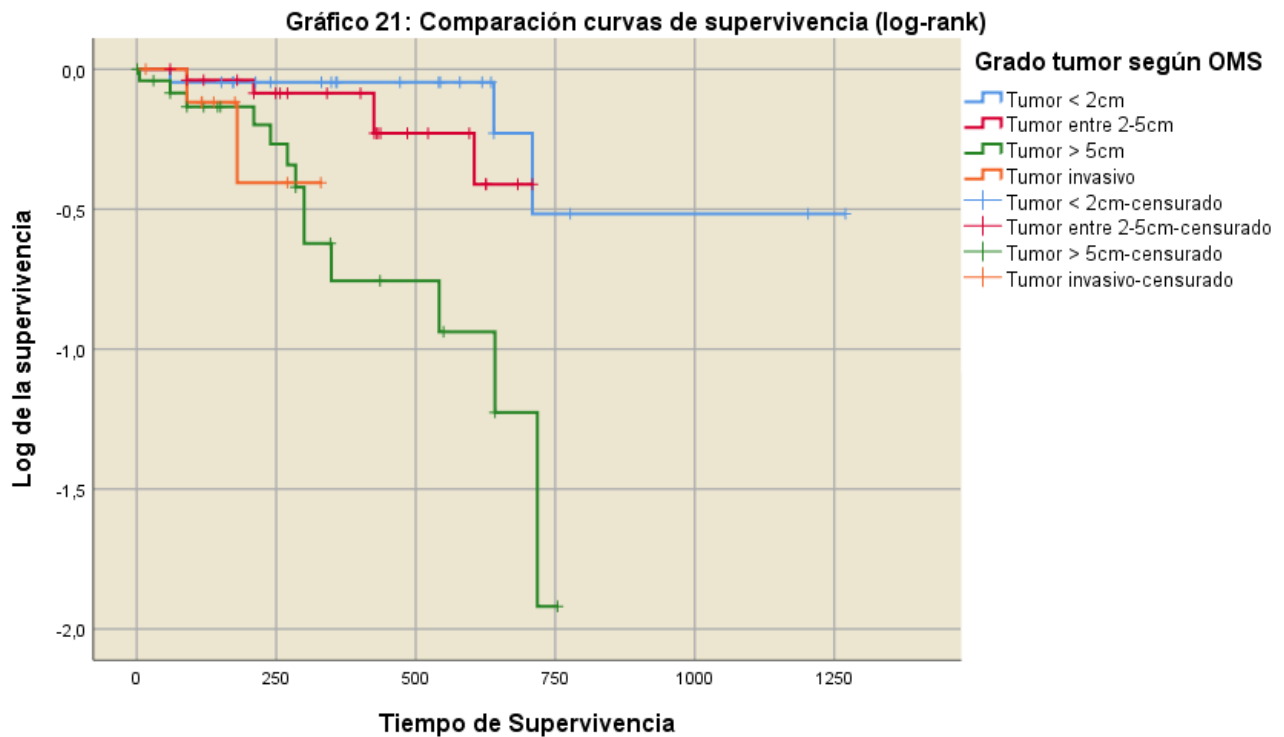
4.2.1.6.6.2.- **Análisis de supervivencia según el grado del tumor (subgrupos 1 y 2)**

Con el objetivo de evaluar el impacto del grado tumoral sobre el tiempo de supervivencia, los casos fueron clasificados en dos subgrupos: subgrupo 1 de grado bajo (tumores T1 y T2; <5 cm) y subgrupo 2 de grado alto (tumores T3 y T4; >5 cm o con invasión local), según la clasificación de la OMS. La distribución de los eventos, pacientes censurados y totales por grupo se presenta en el Anexo: Tablas 14 y 15. El análisis de Kaplan-Meier evidenció diferencias claras entre ambos grupos (Gráfico 20). En el grupo de bajo grado ($n=49$), se registraron 9 eventos y un 81,6% de casos censurados, mientras que en el grupo de alto grado ($n=36$) se observaron 16 eventos, con un 55,6% de censura. Los tiempos medios de supervivencia estimados para cada grupo fueron los siguientes: los gatos con tumores de bajo grado presentaron una media de supervivencia de 893,4 días (IC 95%: 693,9 – 1092,9), mientras que en el grupo de alto grado, la media fue de 440,1 días (IC 95%: 341,4 – 538,8). Estas diferencias entre

los grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), lo que indica una asociación entre el grado tumoral y la supervivencia post-tratamiento con EQT/bleomicina.



La representación gráfica de las curvas de supervivencia por cada grado individual (T1-T4), queda reflejado en el Gráfico 21. La diferencia entre estos grupos, también fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



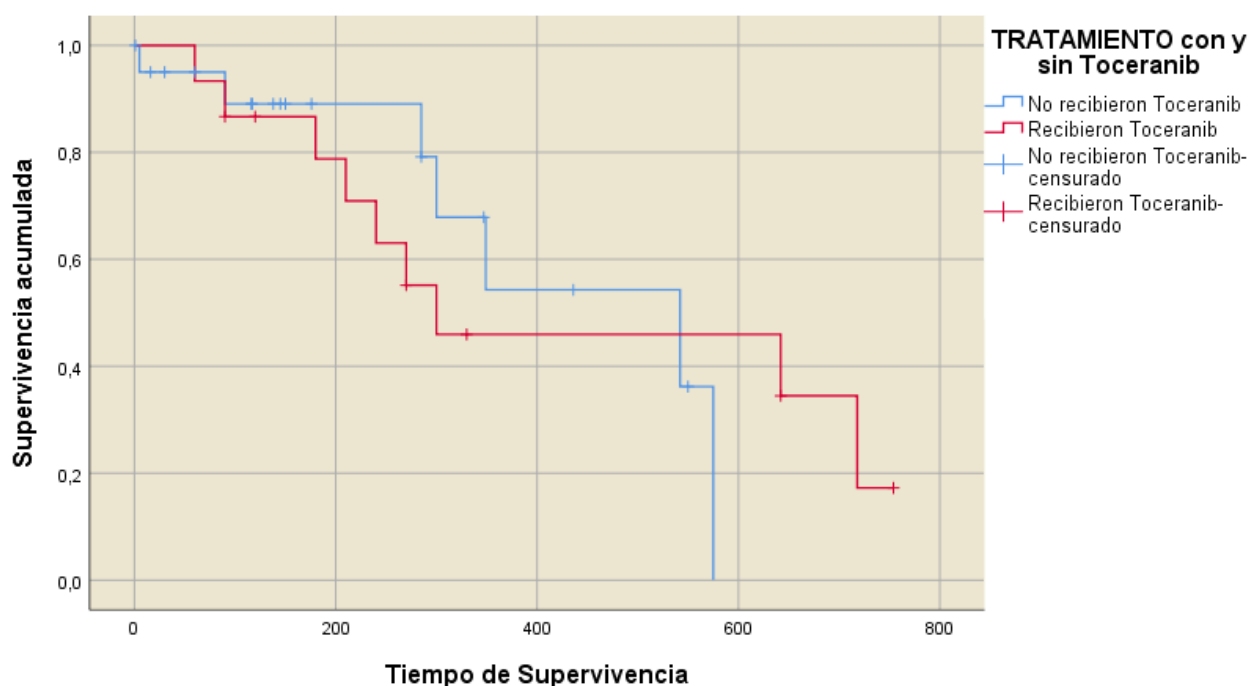
4.2.1.6.6.3.- Análisis de supervivencia en animales tratados con EQT/ bleomicina con y sin toceranib (subgrupo 4)

La administración de toceranib (Palladia®) se llevó a cabo principalmente en gatos con tumores de alto grado (T3 y T4). En el Anexo Tablas 16 y 17, se resume el procesamiento de los casos según grado tumoral y tipo de tratamiento. Dado que únicamente un paciente con tumor de bajo grado recibió toceranib, el análisis comparativo de supervivencia se centró exclusivamente en el subgrupo de alto grado.

En este subgrupo, la supervivencia media estimada fue de 421,3 días (IC 95%: 314,8–527,7) en los gatos que no recibieron toceranib, y de 435,9 días (IC 95%: 291,4–580,5) en aquellos que sí lo recibieron. Las diferencias entre ambos grupos no alcanzaron significación estadística.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier (Gráfico 22) muestra trayectorias similares entre los dos grupos de tratamiento en tumores de alto grado. Si bien algunos pacientes que recibieron toceranib presentaron tiempos de supervivencia más prolongados, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

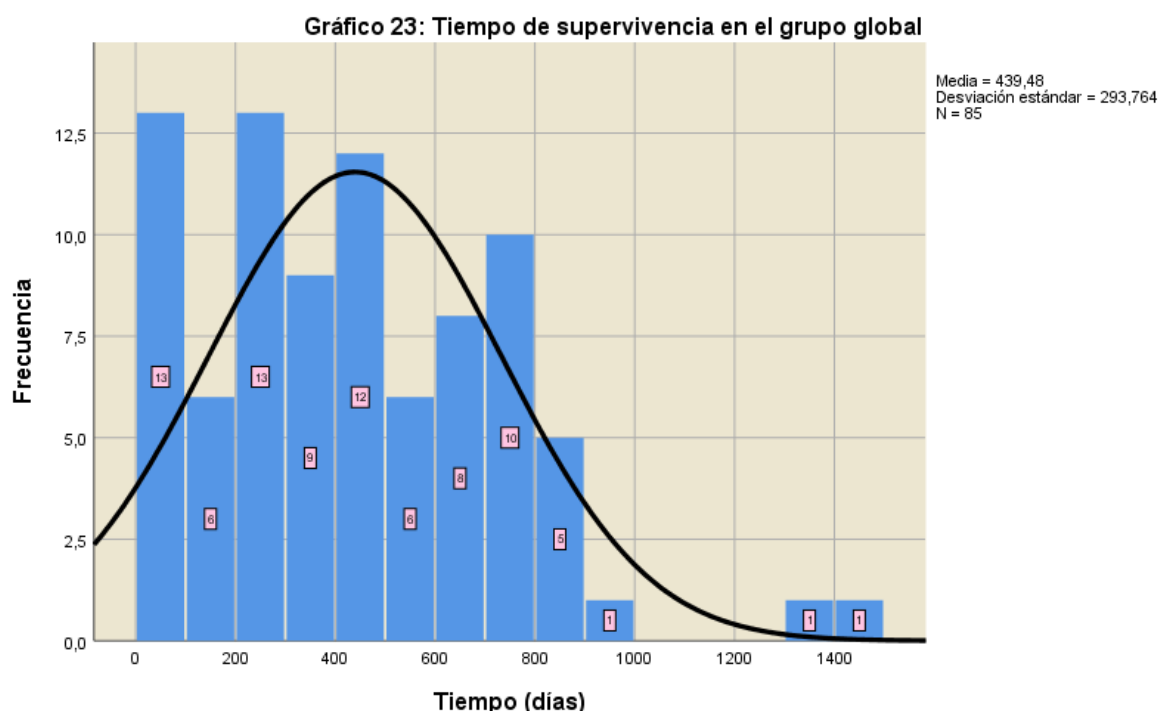
Gráfico 22: curva Kaplan-Meier alto grado con y sin toceranib



4.2.1.6.7.- Tasas de respuestas al tratamiento

4.2.1.6.7.1.- Tiempo de supervivencia

El **tiempo de supervivencia** (TS), definido como el intervalo comprendido entre el primer tratamiento con EQT y la fecha del último control clínico o fallecimiento del paciente, osciló en la población total entre 1 y 1.402 días. El **tiempo medio de supervivencia** (TMS) fue de 439 días (Gráfico 23).



En el subgrupo 3 de gatos positivos a FeLV/FIV, compuesto mayoritariamente por pacientes con tumores de bajo grado, el TMS observado fue de 417 días.

Al clasificar los casos según el grado tumoral, se obtuvieron diferencias claras en los tiempos medios de supervivencia. Para los gatos con carcinomas de bajo grado (subgrupo 1), el TMS fue de 523 días, mientras que, en el grupo con tumores de alto grado (subgrupo 2), el TMS se redujo a 326 días, lo que confirma la influencia negativa del tamaño y la agresividad tumoral sobre la duración de la supervivencia.

Estos resultados indican que los pacientes con tumores menos invasivos tienden a presentar una supervivencia más prolongada tras el tratamiento con EQT, mientras que los tumores de mayor grado se asocian con tiempos de supervivencia significativamente más cortos.

4.2.1.6.7.2.- Tasa de recidiva

La **tasa de recidiva** (TR), definida como la proporción de gatos que presentaron una recuperación clínica completa tras el tratamiento y posteriormente desarrollaron una recidiva local, fue del 32,2% en el análisis global de la población (Tabla 8). De los 87 gatos evaluados, 28 presentaron recidiva, mientras que 59 no mostraron recurrencia de la enfermedad.

Tabla 8: Frecuencias de recidivas

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No Recidiva	59	67,8	67,8	67,8
Recidiva	28	32,2	32,2	100,0
Total	87	100,0	100,0	

Al estratificar los casos según el grado tumoral, se evidenciaron diferencias significativas en la frecuencia de recidivas ($p < 0,05$). En el grupo con tumores de bajo grado (subgrupo 1), la tasa de recidiva fue del 17,6% (9 de 51 casos) (Tabla 9). En contraste, en el grupo con tumores de alto grado (subgrupo 2), la recidiva se observó en el 52,8% de los casos (19 de 36 gatos) (Tabla 10).

Tabla 9: Frecuencia recidivas grupo Bajo grado

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No Recidiva	42	82,4	82,4	82,4
Recidiva	9	17,6	17,6	100,0
Total	51	100,0	100,0	

Tabla 10: Frecuencia recidivas grupo Alto grado

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No Recidiva	17	47,2	47,2	47,2
Recidiva	19	52,8	52,8	100,0
Total	36	100,0	100,0	

Estos resultados indican que el grado del tumor influye de manera directa sobre el riesgo de recidiva local tras la recuperación clínica inicial, siendo significativamente mayor en los tumores más agresivos o extensos. Esta diferencia es consistente con la evolución biológica esperada del carcinoma escamoso en función de su estadificación.

4.2.1.6.7.3.- Intervalo libre de enfermedad

El **intervalo libre de enfermedad (ILE)**, definido como el tiempo transcurrido desde el primer tratamiento hasta el día de la recidiva local o evidencia de metástasis fue de 297 días (0-1402) en el grupo 2 (Tabla 11).

**Tabla 11: Frecuencias ILE
grupo global**

Intervalo Libre Enfermedad		
N	Válido	86
	Perdidos	7
Media		297,24
Mediana		200,00
Desv. Desviación		318,013
Mínimo		0
Máximo		1402

El **ILE medio** en los gatos con **carcinomas de bajo grado** (subgrupo 1) fue de 345 días (Tabla 12), mientras que en los gatos con **carcinomas de alto grado** (subgrupo 2) fue de 152 días (Tabla 13), observándose una diferencia relevante en la duración del control clínico entre ambos grupos.

**Tabla 12: Frecuencias ILE
en bajo grado**

Intervalo Libre Enfermedad		
N	Válido	49
	Perdidos	5
Media		345,31
Mediana		270,00
Desv. Desviación		277,517
Mínimo		0
Máximo		1203

**Tabla 13: Frecuencias ILE
en grupo de alto grado**

Intervalo Libre Enfermedad		
N	Válido	37
	Perdidos	2
Media		151,95
Mediana		,00
Desv. Desviación		240,330
Mínimo		0
Máximo		886

4.2.1.6.7.4.- Supervivencia libre de progresión

La **supervivencia libre de progresión (SLP)**, definida como el tiempo transcurrido desde el primer tratamiento en gatos que presentaron **respuesta parcial (RP)** o **enfermedad estable (EE)**, hasta la progresión local de la enfermedad o la aparición de metástasis, fue de 312 días en el grupo.

Al analizar los datos según el **grado del tumor**, se observaron diferencias en los tiempos medios de SLP: en el subgrupo 1 de **bajo grado**, el valor medio fue de 381 días, mientras que, en el subgrupo 2 de **alto grado**, la SLP media fue de 218 días.

4.2.1.6.8.- Estado final de los animales del estudio

Al término del período de seguimiento, se recopiló el estado clínico final de los 93 gatos incluidos en el estudio, distribuidos según su condición serológica frente a FeLV/FIV (Tabla 14).

Tabla 14. ESTADO FINAL PACIENTE

		FeLV/FIV		Total
		Negativo FeL/FIV	Positivo FeL/FIV	
ESTADO FINAL PACIENTE	Perdidos	12	2	14
	Muerto con tumor	24	2	26
	Muerto sin tumor	6	2	8
	Vivo con tumor	17	2	19
	Vivo sin tumor	23	3	26
Total		82	11	93

De los pacientes evaluados, 26 gatos (27,9%) fallecieron debido a progresión tumoral atribuida al CCE, mientras que 8 gatos (8,6%) murieron por causas no relacionadas directamente con el tumor, incluyendo comorbilidades como enfermedad renal crónica, patologías cardíacas o accidentes.

Catorce animales (15,1%) fueron clasificados como perdidos durante el seguimiento al no disponer de datos posteriores al tratamiento. Del total de pacientes que permanecían vivos al cierre del estudio (n=40; 43%), 26 gatos (28%) presentaron recuperación completa (incluidos tres positivos a FeLV/FIV), mientras que 19 animales (20,4%) mostraban signos persistentes de enfermedad. Dentro de este último grupo, dos eran positivos a FeLV/FIV. La enfermedad se consideró estable en aquellos casos sin evidencia de progresión, y progresiva cuando existía un crecimiento tumoral activo o invasión local.

Estos datos reflejan una proporción relevante de animales con buena respuesta clínica a medio y largo plazo, especialmente en los casos en que se alcanzó la recuperación completa. No se identificaron diferencias destacables en cuanto al estado final entre gatos positivos y negativos a FeLV/FIV, aunque el número reducido de positivos limita la interpretación de estos resultados.

4.2.1.6.9.- Evaluación de la seguridad

4.2.1.6.9.1.- Toxicidad local

Tras la aplicación del tratamiento con EQT combinada con bleomicina, se observaron efectos adversos locales principalmente leves a moderados. Las manifestaciones más frecuentes incluyeron inflamación de los tejidos tratados y circundantes, generalmente evidentes dentro de las primeras 24 horas posteriores a la sesión de tratamiento. Esta inflamación, en muchos casos, persistía durante días o semanas, dependiendo del tejido afectado.

RESULTADOS

Entre los signos clínicos registrados se encontraron úlceras, edema (incluyendo obstrucción nasal y palpebral), estornudos, formación de costras hemáticas adherentes, así como infecciones locales leves en zonas de mucosa con tejido desvitalizado o necrótico, el cual tendía a desprenderse entre la cuarta y sexta semana post-tratamiento.

Con el fin de monitorizar la evolución de estas reacciones adversas, se realizó un seguimiento estandarizado a los 15, 30 y 45 días posteriores al tratamiento, cuyos resultados se detallan a continuación:

A los 15 días, el 86,0% de los pacientes presentó inflamación leve, mientras que un 9,7% desarrolló hinchazón con necrosis localizada. Solo el 3,2% no mostró signos de toxicidad local y un 1,1% evidenció hinchazón grave (Tabla 15).

Tabla 15: Toxicidad local a los 15 días

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Sin toxicidad	3	3,2	3,2	3,2
	Inflamación leve	80	86,0	86,0	89,2
	Hinchazón/necrosis	9	9,7	9,7	98,9
	Hinchazón grave	1	1,1	1,1	100,0
	Total	93	100,0	100,0	

A los 30 días, se observó una mejoría significativa en la mayoría de los casos: el 84,6% de los pacientes no presentó signos de toxicidad local, mientras que un 8,8% mantuvo inflamación leve y un 6,6% continuaba con signos de hinchazón/necrosis (Tabla 16). Dos pacientes se perdieron en el seguimiento.

Tabla 16: Toxicidad local a los 30 días

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Sin toxicidad	77	82,8	84,6	84,6
	Inflamación leve	8	8,6	8,8	93,4
	Hinchazón/Necrosis	6	6,5	6,6	100,0
	Total	91	97,8	100,0	
Perdidos	Sistema	2	2,2		
Total		93	100,0		

A los 45 días, el 88,9% de los gatos ya no mostraba toxicidad local, y solo el 6,7% mantenía inflamación leve. La proporción de animales con hinchazón/necrosis se redujo al 4,4% (Tabla 17). Tres pacientes no fueron evaluables en este punto.

Tabla 17: Toxicidad local a los 45 días

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Sin toxicidad	80	86,0	88,9	88,9
	Inflamación leve	6	6,5	6,7	95,6
	Hinchazón/Necrosis	4	4,3	4,4	100,0
	Total	90	96,8	100,0	
Perdidos	Sistema	3	3,2		
Total		93	100,0		

4.2.1.6.9.2.- Efectos adversos sistémicos

4.2.1.6.9.2.1.- Efectos adversos grupo tratado EQT/bleomicina

En relación con los análisis sanguíneos realizados durante el seguimiento, los pacientes no presentaron alteraciones hematológicas significativas. En aquellos animales positivos al virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) que presentaban anemia leve, se trató de una alteración secundaria esperable, sin cambios relevantes atribuibles al tratamiento.

En cuanto a los efectos sistémicos, no se observaron eventos clínicamente significativos en el grupo tratado con EQT/bleomicina en monoterapia. Los efectos adversos más comunes fueron leves y autolimitados, incluyendo vómitos esporádicos, diarrea leve y alopecia incipiente.

En lo que respecta a la anorexia o hiporexia, ésta se presentó mayoritariamente en gatos con lesiones localizadas en el plano nasal, donde la inflamación post-tratamiento producía obstrucción de las narinas y anosmia transitoria, afectando negativamente al apetito. En estos casos, se establecieron medidas de soporte como alimentación suave o forzada, y en cuatro pacientes fue necesario colocar un tubo esofágico de alimentación durante un período de 7 a 14 días. En contraste, en gatos con localizaciones tumorales diferentes (periocular, auricular, peripalpebral o labial), no se observó pérdida del apetito.

En conjunto, la toxicidad sistémica asociada al tratamiento fue baja, sin que se registraran efectos secundarios graves que comprometieran la vida de los pacientes o que obligaran a suspender el tratamiento de forma definitiva.

4.2.1.6.9.2.2.- Efectos adversos asociados a toceranib

Un total de 17 gatos recibió tratamiento complementario con toceranib (Palladia®), en su mayoría pertenecientes al grupo con tumores de alto grado (T3 y T4). Durante el seguimiento, se documentaron algunos efectos secundarios sistémicos atribuibles a la administración de este inhibidor de tirosina quinasa. Entre los signos observados se incluyeron:

- Trastornos gastrointestinales leves: pérdida transitoria de apetito, vómitos ocasionales y diarrea leve autolimitada en algunos pacientes.
- Alteraciones hematológicas leves: disminución moderada de neutrófilos o plaquetas, sin requerir interrupción del tratamiento.

- Letargia o disminución del nivel de actividad, en especial en los primeros días tras la administración.

En ningún caso fue necesaria la suspensión definitiva del tratamiento con toceranib debido a toxicidades graves. Los efectos secundarios fueron manejables y generalmente reversibles tras ajustes en la pauta o medidas de soporte.

En conjunto, tanto el tratamiento local con EQT/bleomicina como el sistémico con toceranib mostraron un perfil de seguridad aceptable, con efectos adversos controlables y sin evidencia de toxicidades limitantes en esta población felina.

4.3.- Fase III

4.3.1.- Casos clínicos tratado con EQT/bleomicina en otras neoplasias y/o especies.

La elección de la especie felina como modelo principal para la evaluación de la eficacia de la EQT, se fundamenta en la elevada prevalencia de CCE en gatos, especialmente en regiones anatómicas expuestas a radiación solar como la nariz, los párpados y las orejas. Esta neoplasia representa una de las formas más frecuentes de lesiones malignas cutáneas en gatos, lo que permite trabajar con una muestra representativa y con suficiente tamaño poblacional para extraer conclusiones significativas.

Complementariamente, en este apartado del estudio se ha incluido una serie de casos clínicos correspondientes a otras especies animales (como caninos y aves), así como a neoplasias localizadas en regiones anatómicas complejas o con otros tipos histológicos distintos al CCE. En todos estos casos, la aplicación de EQT con bleomicina se consideró como una opción terapéutica viable, ya sea como tratamiento único o adyuvante, dado que la cirugía radical no era factible, o bien porque su realización podía conllevar secuelas funcionales graves o limitaciones estéticas inaceptables.

La recopilación y análisis de estos casos permiten ampliar la perspectiva sobre las posibles indicaciones de la EQT en medicina veterinaria, evaluando su versatilidad, tolerancia y eficacia más allá del modelo felino y del CCE, y sentando las bases para su aplicación en otros contextos clínicos.

4.3.1.1.- Carcinoma de células escamosas en halcón peregrino (*Falco peregrinus*)

Tras el diagnóstico de carcinoma de células escamosas y la exclusión de la cirugía (dado que una de las lesiones comprometía estructuras funcionales vitales del ala, lo que habría impedido el vuelo), se decidió emplear electroquimioterapia (EQT) con bleomicina como alternativa terapéutica.

Después de la primera sesión, la lesión del lado derecho (pared lateral de la cavidad celómica) presentó una reducción aproximada del 90 % en la profundidad, con desaparición de la exposición muscular y formación de tejido de granulación, lo que contribuyó al control de infecciones secundarias. En contraste, la lesión izquierda (región axilar) mostró progresión local, manifestada por la aparición de una nueva úlcera.

Noventa días más tarde se efectuó una segunda sesión siguiendo el mismo protocolo. La lesión derecha evidenció una mejora adicional en la profundidad, aunque con un discreto aumento en la superficie afectada. No se registraron signos de dolor, pérdida de apetito ni efectos adversos sistémicos durante el tratamiento.

A lo largo del seguimiento, el ave mantuvo buen estado general, apetito conservado, comportamiento normal y plena capacidad de vuelo. La supervivencia alcanzó los 455 días desde el inicio de la terapia. No se detectaron metástasis ni en las evaluaciones radiológicas de control ni en la necropsia practicada tras su muerte, ocurrida por accidente y no relacionada con el proceso neoplásico.

La EQT fue bien tolerada y demostró eficacia en el control local de la lesión más invasiva, prolongando la supervivencia y preservando la calidad de vida del paciente.

4.3.1.2.- Condroma en mandíbula canina

Se diagnosticó un condroma osteolítico en una perra Bull Terrier de 10 años, localizado en la mandíbula rostral, con una evolución clínica de más de dos años caracterizada por crecimiento lento. La masa tumoral provocaba ulceración de la mucosa oral, sangrado recurrente y dificultad en la masticación, con desviación del bolo alimenticio. Los estudios de diagnóstico por imagen evidenciaron destrucción ósea moderada.

Tras la aplicación de electroquimioterapia (EQT) con bleomicina, se estableció un protocolo de seguimiento clínico que consistió en controles semanales durante el primer mes, posteriormente cada 15 días, y una radiografía de control a las ocho semanas. Además, se realizaron seguimientos telefónicos con el propietario a los tres y seis meses posteriores al tratamiento.

La evolución clínica fue favorable. Desde la primera semana se observó una reducción marcada del sangrado, menor edema y recuperación del apetito. En los días siguientes se produjo necrosis superficial del tejido tumoral, con una disminución progresiva del volumen de la masa. A los 2,5 meses se alcanzó una restauración casi completa del contorno mandibular. A los seis meses de seguimiento no se detectaron signos de recidiva clínica ni alteraciones funcionales, y tanto los controles radiográficos como los análisis hematológicos permanecieron dentro de los parámetros fisiológicos.

El tratamiento fue bien tolerado, sin efectos adversos locales ni sistémicos relevantes. La EQT permitió preservar la función masticatoria y evitar procedimientos quirúrgicos invasivos en una paciente geriátrica, con una recuperación satisfactoria y buena calidad de vida tras el tratamiento.

4.3.1.3.-Carcinoma de células escamosas del tercer párpado felino

En el seguimiento clínico de ambos gatos tratados con una única sesión de electroquimioterapia (EQT) con bleomicina, se observó una respuesta completa, con desaparición macroscópica de las lesiones y preservación de la funcionalidad del globo ocular. La remisión se mantuvo entre 540 y 930 días, sin evidencia de recidiva local ni de metástasis en los controles realizados.

Los efectos adversos fueron mínimos, limitándose a una inflamación periocular leve y transitoria durante la primera semana posterior al procedimiento. No se registraron complicaciones oftálmicas, toxicidad sistémica ni alteraciones en el estado general, apetito o peso corporal.

La EQT constituyó una alternativa terapéutica eficaz, mínimamente invasiva y no mutilante, que permitió mantener la integridad anatómica del globo ocular y preservar la función visual a largo plazo.

4.3.1.4.- Plasmocitomas extramedulares en 2 pacientes caninos.

Ambos pacientes recibieron una única sesión de electroquimioterapia (EQT). Se observó una reacción local leve caracterizada por edema y presencia de tejido desvitalizado transitorio, que se resolvió sin complicaciones. En uno de los casos se registró una ligera dificultad para la ingesta de alimentos

sólidos durante los primeros días, por lo que se indicó una dieta blanda temporal. No se produjeron secuelas funcionales relevantes.

A las dos semanas del tratamiento se evidenció una inflamación moderada con áreas de necrosis superficial autolimitante, que remitieron de forma completa en un plazo de ocho semanas.

El seguimiento a largo plazo reveló ausencia de recidiva local y de metástasis durante 703 días en el primer paciente y 575 días en el segundo. En ambos casos se mantuvo un estado general adecuado, con apetito conservado, comportamiento normal acorde a la edad, y sin alteraciones hematológicas ni radiológicas en los controles periódicos. Los dos animales mantuvieron buena calidad de vida durante todo el periodo de observación.

5.- DISCUSIÓN

El carcinoma de células escamosas (CCE) felino es una neoplasia epitelial maligna de comportamiento localmente invasivo, que afecta con frecuencia a áreas poco pigmentadas o con escasa cobertura pilosa. Aunque la exposición crónica a radiación ultravioleta constituye un factor predisponente bien reconocido, no es el único determinante, ya que también intervienen variables individuales como la edad, el fenotipo y la respuesta inmunológica (Parreira y Keglevich, 2005; Bellei *et al.*, 2006; Daleck *et al.*, 2008).

En este contexto, la identificación temprana de lesiones cutáneas compatibles con cambios actínicos, queratosis o lesiones erosivo-costrosas persistentes resulta fundamental para establecer diagnósticos precoces y ofrecer opciones terapéuticas con mayor potencial curativo. Sin embargo, en la práctica clínica habitual, dichas lesiones suelen pasar inadvertidas o son subestimadas, tanto en medicina humana como veterinaria, lo que retrasa el abordaje y facilita la progresión hacia formas invasivas (Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2016).

El tratamiento estándar del CCE en gatos continúa siendo la resección quirúrgica amplia, pero no siempre es factible debido a la localización anatómica, el tamaño tumoral o la negativa del propietario a aceptar procedimientos mutilantes como la nosectomía o la enucleación ocular. En este sentido, la electroquimioterapia (EQT) se perfila como una alternativa terapéutica prometedora, capaz de inducir respuestas locales significativas con un perfil de seguridad favorable, incluso cuando se emplea como monoterapia. Diversos estudios en medicina veterinaria avalan su eficacia en neoplasias cutáneas y orales, tanto benignas como malignas, con tasas variables de respuesta completa y parcial, y escasos efectos secundarios (Cemazar *et al.*, 2008; Tozon *et al.*, 2021). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han realizado en grupos reducidos de pacientes, lo que limita la extrapolación de los resultados.

5.1.- Datos demográficos

En el grupo 2 donde se evaluó el mayor número de gatos (n=93) diagnosticados con CCE de origen solar, la edad media fue de 9,4 años, con predominio de individuos geriátricos, lo cual coincide con la literatura, que indica una mayor incidencia de CCE en gatos de edad avanzada debido a la acumulación de daño actínico a lo largo del tiempo (Ruslander *et al.*, 1997; Vail *et al.*, 1998; Simčič *et al.*, 2021). No se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo, lo que sugiere que el riesgo de desarrollo de CCE en felinos no parece estar influido por esta variable, resultado que concuerda con estudios previos (Murphy, 2013). La predominancia de gatos de raza Común Europeo (96,8 %) refleja tanto la composición de la población felina general como la mayor exposición de estos animales a ambientes exteriores, lo que incrementa el riesgo de exposición crónica a radiación UV (Vail, y Withrow, 2007). Asimismo, los patrones de pelaje más frecuentes, especialmente el blanco sólido y el bicolor con blanco, han sido ampliamente relacionados con una mayor fotosensibilidad. Los gatos de pelo blanco y áreas de escasa densidad pilosa, tienen 13.4 veces más riesgo de desarrollar CCE que otros de color (Dorn y Taylor, 1971). Aunque en principio los gatos de cualquier raza y sexo podrían verse afectados, las razas de pelo largo como los Persas, están más protegidos, ya que tienen una mejor cobertura (Murphy, 2013).

En cuanto a la distribución geográfica, los casos procedieron mayoritariamente de Gran Canaria, seguida de Tenerife y Fuerteventura, ello está relacionado con la accesibilidad a centros de referencia veterinaria. La inclusión de animales procedentes de protectoras y su posterior adopción sugiere un potencial beneficio social del tratamiento, al mejorar la adoptabilidad de animales que previamente se considerarían no viables por razones oncológicas.

5.2.- Localización de los CCE y características histológicas

Los CCE de origen solar en los gatos se presentan casi exclusivamente en la región de la cabeza (Murphy, 2013; Prado *et al.*, 2017), no así en otras especies, como la canina, cuya presentación más frecuente es región de los flancos, abdomen y/o extremidades (Thomson, 2007; Wilcox *et al.*, 2019; de Castro *et al.*, 2023). Otros tipos de carcinomas descritos en gatos, como el CCE cutáneo multicéntrico, presenta diversas localizaciones, como en el tronco, extremidades, dígitos y/o cabeza (Baer y Helton, 1993). El pelo hace de barrera a las radiaciones UV, por ello, en los gatos, el CCE de origen solar, tiene como localización más frecuente el plano nasal, párpados y orejas (Dorn *et al.*, 1971; Tozon *et al.*, 2014; Spugnini *et al.*, 2015). En nuestro estudio, observamos en el 54,8% de los gatos tuvieron como única presentación el plano nasal, siendo ésta la localización más frecuente; la combinación de plano nasal junto con otras zonas, como labios, sienes, párpados, orejas, mejilla, labio y/o filtrum, en un 14% más, es decir, el plano nasal estuvo afectado en el 68,8% de los casos. Así mismo, se observó en un 8,6% casos la presencia de lesiones en los párpados, siendo la segunda localización única más observada. Estos hallazgos de presentación, en especial la referida al plano nasal, es la presentación habitual más frecuente recogida en la literatura veterinaria (Ruslander *et al.*, 1997; Vail y Withrow, 2007; Spugnini *et al.*, 2009).

Aunque el estudio histopatológico es considerado el *gold standard* para el diagnóstico de CCE, en este trabajo se admitieron algunos casos diagnosticados por citología. Esta decisión se basó en criterios clínicos y diagnósticos fundamentados, las citologías resultaron altamente sugestivas de CCE, concordantes con la localización y presentación clínica, y existían limitaciones prácticas. Las células neoplásicas pueden mostrar una amplia variedad de características morfológicas indicativas de malignidad, como pleomorfismo celular, cariomegalia y figuras mitóticas, que suelen ser más prominentes en las neoplasias poco diferenciadas. En el estudio histopatológico de los CCE bien diferenciados es posible identificar fenómenos de queratinización característicos, como las denominadas “*perlas de queratina*” (Goldschmidt, 2016), hallazgo que no se observa en las muestras citológicas. Si bien el estudio histopatológico constituye el método diagnóstico definitivo, la citología ha demostrado ser una herramienta útil en numerosos trabajos, especialmente como apoyo en la toma de decisiones terapéuticas en casos con alta sospecha clínica (MacNeill, 2011; Simčič *et al.*, 2021). Sus ventajas radican en la rapidez, menor invasividad y bajo coste, lo que la convierte en una opción viable en contextos donde se requiere iniciar el tratamiento sin demora o cuando existen limitaciones económicas. Sin embargo, la presencia de inflamación secundaria y la imposibilidad de evaluar márgenes quirúrgicos limitan su fiabilidad como único criterio diagnóstico.

5.3.- Metástasis

El CCE puede aparecer como una lesión proliferativa o erosiva. Estos tumores son generalmente invasivos a nivel local durante un largo periodo de tiempo, de meses a años, con lo que habitualmente tardan en producir metástasis (Ruslander *et al.*, 1997; Murphy, 2013). Excepcionalmente, se han reconocido casos con lesiones más agresivas en gatos que crecen rápidamente, que se asocian a un subtipo histológico más agresivo, caracterizado por contar con un potencial de invasión linfática estromal (Rodríguez-Guisado *et al.*, 2021). Las metástasis a linfonodos locales y pulmonares puede ocurrir en tumores poco diferenciados o avanzados. Prácticamente, es una máxima que tiene lugar en la mayoría de los procesos oncológicos, y que también pudimos constatar en aquellos casos más graves o invasivos como los pacientes con grados T3 y T4, que desarrollaron metástasis, mientras que este proceso estuvo ausente en los casos categorizados dentro del grado más leve (T1). En su conjunto, la metástasis se presentó en un 8,5% de los casos, a pesar de que se considera un tumor que raramente produce una diseminación de células tumorales (Lana *et al.*, 1997), confirmando la mayor incidencia de este fenómeno en Canarias, que ya apuntaban estudios previos (Rodríguez-Guisado *et al.*, 2021).

Los resultados obtenidos destacan la relevancia de una estadificación precoz acompañada de un control clínico estricto, fundamental para identificar de manera oportuna eventuales procesos de diseminación, en particular en pacientes con neoplasias extensas o de comportamiento invasivo. Por otro lado, la falta de asociación significativa entre la positividad retroviral y la presencia de metástasis sugiere que las infecciones por FeLV y FIV no actuarían como factores predisponentes directos en la progresión metastásica, al menos dentro de los parámetros de esta cohorte evaluada.

5.4.- Tratamientos

Los CCE que afectan la región facial de los gatos pueden ser muy invasivos localmente. La respuesta al tratamiento va a depender del grado de invasión, y es más favorable para las lesiones en estadios bajos que para los tumores más avanzados (Vail y Withrow, 2007; Tozon *et al.*, 2014).

5.4.1.- Crioterapia/Criocirugía

La crioterapia ha sido una herramienta terapéutica utilizada durante años en el manejo del CCE de origen actínico en gatos, especialmente cuando las lesiones se ubican en el plano nasal. Su aplicación fue inicialmente bien recibida debido a su bajo costo, accesibilidad y sencillez técnica, aspectos particularmente valorados en entornos con recursos limitados.

En una investigación realizada por Clarke (1991), se trataron 90 gatos con lesiones nasales mediante criocirugía, logrando tasas de remisión del 84 % al año y del 81 % a los tres años. Sin embargo, muchos de los casos requirieron varias intervenciones para alcanzar estos resultados. A pesar de estos hallazgos iniciales prometedores, estudios posteriores, como el de Lana *et al.* (1997), reportaron una elevada frecuencia de recurrencias locales, con hasta un 73 % de recaídas, lo que ha generado que se cuestione la eficacia sostenida de este tratamiento a largo plazo.

En consonancia con estos estudios, nuestros resultados mostraron también una alta tasa de recidiva (76,4 %) en los pacientes tratados con crioterapia, siendo ésta aplicada como

única modalidad terapéutica. La remisión completa (RC) se logró únicamente en el 47 % de los casos, la mayoría de ellos clasificados como T1. El intervalo medio de respuesta fue de apenas 57,8 días, lo que sugiere un control local de corta duración. Además, un 23,5 % de los animales permanecieron en enfermedad estable (EE), mientras que un 29,5 % evolucionaron a enfermedad progresiva (EP), lo cual limita notablemente la utilidad de esta técnica en lesiones de mayor tamaño o grado.

Estos datos refuerzan la idea de que la criocirugía puede ser eficaz en lesiones pequeñas y poco invasivas, pero su éxito está fuertemente condicionado por una adecuada selección del paciente, considerando variables como el tamaño tumoral, la profundidad de infiltración y la localización anatómica. Como señalan Prado *et al.* (2017), el control adecuado del tiempo de congelación, el número de ciclos aplicados y los cuidados postoperatorios son determinantes en la evolución clínica del paciente.

Pese a sus limitaciones, la crioterapia continúa siendo una opción válida en ciertos escenarios clínicos, especialmente cuando el acceso a recursos tecnológicos es limitado. Esta técnica se beneficia de requerir equipamiento básico y de poder aplicarse sin necesidad de anestesia general prolongada, lo que la hace accesible en muchas clínicas veterinarias. Sin embargo, su principal inconveniente es la elevada tasa de recurrencias, observada sobre todo en lesiones con un diámetro superior a 4 mm o márgenes imprecisos (Thomson, 2007). Por ello, su utilización debería enfocarse principalmente como un abordaje paliativo o complementario, más que como un tratamiento definitivo en casos de CCE en etapas avanzadas.

5.4.2.- Cirugía

La escisión quirúrgica ha sido tradicionalmente considerada una de las modalidades terapéuticas más eficaces para el control local del carcinoma de células escamosas (CCE) en gatos, especialmente cuando se logra una resección completa con márgenes limpios. Diversos estudios han demostrado que tanto la cirugía radical como la radioterapia ofrecen mejores tasas de control y supervivencia, siempre que se respeten márgenes oncológicos adecuados (Withrow y Straw, 1990; Schmidt *et al.*, 2001; Melzer *et al.*, 2006).

No obstante, la eficacia teórica de la cirugía contrasta frecuentemente con su viabilidad clínica. La ubicación anatómica de la mayoría de estos tumores (plano nasal, región maxilar, párpados y otras áreas faciales), implica procedimientos quirúrgicos que pueden resultar en deformaciones estéticas importantes, secuelas funcionales considerables y una potencial disminución de la calidad de vida del paciente. Este impacto, tanto físico como emocional, contribuye a que muchos tutores rechacen esta opción, pese a su potencial curativo (Hendrick *et al.*, 1995; Moore y Ogilvie, 2001; Vail y Withrow, 2007; Hauck, 2013).

Tradicionalmente, la nosectomía (resección completa del plano nasal) fue considerada el estándar terapéutico en tumores bien delimitados de esa región. Sin embargo, en la actualidad se cuestiona su papel como primera línea de tratamiento, no sólo por sus secuelas estéticas y funcionales, sino también porque existen alternativas menos invasivas. En este contexto, la toma de decisiones terapéuticas debería considerar no solo la extensión y el grado tumoral, sino también factores como el tipo de paciente, la

posibilidad de manejo postquirúrgico, el impacto emocional en los tutores y, muy especialmente, el efecto global sobre la calidad de vida del animal (Murphy, 2013; Simčič *et al.*, 2021; Tellado *et al.*, 2022).

5.4.3.- Quimioterapia

Se ha descrito la posibilidad de la utilización de quimioterapia intralesional con carboplatino, con una tasa de respuesta completa de aproximadamente del 70%, y recurrencia local en aproximadamente el 30% de los casos (Theon *et al.*, 1996). La bleomicina aplicada como único agente, ha mostrado ser poco efectiva en este tipo de tumores, pero en aquellos casos que se ha investigado su combinación con otras técnicas como la electroquimioterapia (EQT), ha mostrado un control prometedor en muchos casos (Spugnini *et al.*, 2015).

Aún son escasos los estudios dirigidos hacia las tirosin-kinasas en gatos con CCE. En los ensayos clínicos que han probado inhibidores de esta enzima en el CCE felino, como el imatinib y/o el toceranib, los resultados han sido contradictorios (Žagar y Schmidt, 2023); e incluso en algunos casos no se ha observado efectividad, como en el uso de masitinib en el CCE oral felino (Lachowicz *et al.*, 2005). Por el contrario, en un estudio retrospectivo aplicando toceranib con y sin antiinflamatorios no esteroideos, se observó una tasa de respuesta biológica del 56,5% en un grupo de 23 gatos. Además, los gatos que recibieron toceranib mostraron una mayor supervivencia (123 días) comparado con los gatos que no recibieron la terapia. Sin embargo, los resultados a largo plazo (un año), fueron decepcionantes, ya que solamente sobrevivieron sólo el 6,5% de los animales (Wiles *et al.*, 2017). En otro ensayo clínico, en el que se utilizó una terapia multimodal que incluía resección quirúrgica, radioterapia adyuvante y toceranib para el CCE del saco anal, se logró una supervivencia libre de progresión de 236 días (Kopke *et al.*, 2021).

En esta línea de investigación, algunos estudios han demostrado los efectos inhibidores que desarrollan EGFR y HER2 (expresión de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano) en líneas celulares de CCE felino (Gray *et al.*, 2017), si bien se necesita más investigación para evaluar la eficacia de estos inhibidores en modelos in vivo y en el entorno clínico.

5.4.4.- Electroquimioterapia (EQT)

La EQT ha emergido en los últimos años como una alternativa terapéutica prometedora, especialmente indicada en aquellos casos en los que la cirugía no es viable o resulta inaceptable para los tutores del paciente. Esta técnica ha ganado un creciente interés en medicina veterinaria durante la última década, dado que numerosos estudios han comenzado a documentar resultados alentadores en el control local y la resolución de diversos tipos tumorales. Los datos publicados hasta la fecha sugieren que la EQT puede representar una herramienta eficaz, mínimamente invasiva y bien tolerada para el manejo de ciertos tumores sólidos en animales de compañía (Tozon *et al.*, 2014; Spugnini *et al.*, 2015; Simčič *et al.*, 2021; De Castro Cunha *et al.*, 2023; Diop *et al.*, 2024).

5.4.4.1.- Bleomicina combinada con EQT

La bleomicina es un agente quimioterapéutico cuya acción citotóxica se relaciona principalmente con su capacidad para provocar rupturas en el ADN, lo que interfiere con

la replicación celular y desencadena apoptosis en células tumorales. Este mecanismo de daño genético guarda similitudes con el efecto inducido por la radioterapia (Pinard *et al.*, 2012; Spugnini *et al.*, 2016; Spugnini *et al.*, 2019; Tounekti *et al.*, 1993). En los protocolos convencionales de EQT, la bleomicina se administra antes de aplicar los pulsos eléctricos, los cuales generan una permeabilización transitoria de la membrana celular, facilitando la entrada del fármaco al interior de las células (Spugnini *et al.*, 2015; Simčič *et al.*, 2021). Este procedimiento ha demostrado mejorar el control local del tumor, aunque su impacto sobre la enfermedad metastásica sigue siendo limitado.

En el presente estudio, evaluamos la eficacia y seguridad de la EQT en el tratamiento del CCE felino, así como en otros tipos tumorales, utilizando bleomicina como agente quimioterápico. La EQT se aplicó en combinación con este fármaco, con el objetivo de valorar si la administración simultánea potenciaba su eficacia en comparación con su uso aislado, tal como sugieren estudios previos (Spugnini *et al.*, 2015).

Este enfoque se basa en la premisa de que la aplicación de campos eléctricos genera una permeabilización transitoria y reversible de la membrana celular, fenómeno conocido como electroporación, que facilita la entrada de moléculas hidrofílicas como la bleomicina al interior de las células tumorales. Se ha estimado que esta técnica puede aumentar la captación intracelular de determinados fármacos en hasta 1000 veces (Probst *et al.*, 2018), lo cual podría traducirse en una mayor eficacia citotóxica y, en consecuencia, un mejor control local del tumor.

Dado que tanto estudios preclínicos como clínicos han demostrado que la aplicación de pulsos eléctricos sin quimioterapia no tiene un efecto antitumoral significativo (Spugnini *et al.*, 2015), no se consideró incluir en este estudio un grupo control tratado únicamente mediante electroporación, ya que ello no aportaría valor clínico ni ético en el contexto del diseño propuesto.

La dosis de bleomicina administrada es uno de los elementos determinantes en la efectividad del tratamiento. En una investigación que evaluó dos concentraciones distintas, Dos Anjos *et al.* (2020) reportaron una tasa de respuesta global del 72%, que incluía tanto respuestas completas como parciales. Además, se observó enfermedad estable en el 18,6% de los casos y progresión en el 9,3%. Los tiempos libres de enfermedad fueron similares entre ambas dosis (210 y 240 días), lo que sugiere que concentraciones más bajas podrían mantener una eficacia comparable, reduciendo al mismo tiempo el riesgo de toxicidad.

En la mayoría de los estudios realizados en gatos con CCE cutáneo, las dosis empleadas de bleomicina oscilan entre 15 y 30 mg/m² (Spugnini *et al.*, 2012; Tozon *et al.*, 2014; Spugnini *et al.*, 2015; Diop *et al.*, 2024). Recientemente, tanto en medicina veterinaria como humana, se ha propuesto el uso de dosis reducidas (como 10.000 UI/m²), que parecen mantener una eficacia comparable a las dosis estándar (Groselj *et al.*, 2017; Dos Anjos *et al.*, 2020).

En el presente estudio se optó por emplear la dosis estándar más baja de bleomicina (15.000 UI/m²), decisión basada en los resultados obtenidos en los primeros casos tratados, donde se observó un control tumoral satisfactorio acompañado de una baja incidencia de efectos adversos. Estos hallazgos respaldan el uso de dicha dosis como una

estrategia inicial segura y eficaz, especialmente en contextos clínicos donde se busca minimizar la toxicidad sin comprometer la efectividad terapéutica.

5.4.4.2.- Respuestas a la EQT

En nuestra serie de 93 gatos (grupo 2) diagnosticados con CCE, la EQT mostró una elevada tasa de respuesta inicial, con un 90,3 % de pacientes que presentaron regresión tumoral en el primer mes. Sin embargo, esta eficacia decreció con el tiempo: al tercer mes la respuesta global se redujo al 75,9 %, y a los seis meses, solo el 59,4 % mantenían respuesta, mientras que el 26,1 % presentaban progresión de la enfermedad (EP).

Desde una perspectiva clínica, la pérdida de respuesta terapéutica observada podría estar condicionada por diversos factores, entre los cuales destaca la reexposición al principal agente etiológico: la radiación ultravioleta. Varios de los pacientes incluidos en el estudio continuaron residiendo en entornos sin modificaciones significativas en sus hábitos de exposición solar ni en el uso de medidas de fotoprotección. Esta situación podría haber favorecido tanto la recurrencia local como la aparición de nuevas lesiones. Estos hallazgos refuerzan la importancia de incorporar recomendaciones ambientales y de manejo post-tratamiento como parte integral del protocolo terapéutico, especialmente en regiones con altos niveles de radiación solar.

Nuestros datos son comparables con los publicados por Simčič *et al.* (2021) en un estudio multicéntrico que incluyó 61 gatos tratados con EQT, en el que se informó una tasa de respuesta global del 96,7 %. Sin embargo, es importante destacar que dicho estudio se centró en las respuestas iniciales tras la primera sesión, sin detallar la evolución a medio o largo plazo, ni la recurrencia de las lesiones. La comparación directa entre estudios sigue siendo difícil debido a diferencias metodológicas, como los criterios de inclusión, la estadificación tumoral, la duración del seguimiento o el manejo ambiental de los pacientes.

Diversos estudios han respaldado la eficacia de la EQT combinada con bleomicina en el tratamiento del CCE felino, incluso en localizaciones complejas como la cabeza o el plano nasal. Spugnini *et al.* (2009) reportaron una tasa de control completo del 77,7 % en 9 gatos tras tres años de seguimiento, mientras que Tozon *et al.* (2014) observaron una respuesta completa en el 81,8 % de los 11 gatos tratados, aunque las recidivas fueron más frecuentes en tumores avanzados (T4). De forma similar, Spugnini *et al.* (2015) obtuvieron una respuesta global del 89 % en un grupo más amplio de 47 gatos con CCE periocular y otros tumores avanzados, con un periodo medio libre de enfermedad de 30,5 meses. Estos resultados, aunque procedentes de muestras limitadas, coinciden con los hallazgos de nuestro estudio.

Varios estudios sobre EQT en CCE felino han centrado su análisis en lesiones de entre 0,5 y 3 cm, correspondientes generalmente a estadios T1 o T2. Sin embargo, son escasos los trabajos que abordan específicamente la eficacia de esta terapia en tumores más avanzados o agresivos (Spugnini *et al.*, 2009; Tozon *et al.*, 2014). Esta limitación puede explicar por qué la tasa de remisión completa tiende a disminuir cuando se incluyen pacientes con estadios más altos. Así lo evidenció Spugnini *et al.* (2015), donde se observó una tasa de respuesta completa del 44,6% en casos de CCE periorbitales avanzados, mientras que en estudios con tumores en estadios más tempranos las tasas

ascendieron hasta el 81,8%. En conjunto, la literatura coincide en que la respuesta al tratamiento está fuertemente influenciada por el grado de invasión y el tamaño tumoral, lo que resalta la importancia de una adecuada estratificación clínica para interpretar los resultados (Spugnini *et al.*, 2009; Tozon *et al.*, 2014; Simčič *et al.*, 2021).

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la eficacia de la EQT como tratamiento inicial del CCE felino, particularmente en estadios tempranos. No obstante, evidencian la importancia de un seguimiento clínico estrecho, la monitorización de posibles recidivas, y la implementación de estrategias preventivas para mitigar los factores de riesgo persistentes que pueden comprometer la durabilidad de la respuesta terapéutica.

5.4.4.3.- Sesiones de EQT

En este estudio, la mayoría de los pacientes (72 %) requirió únicamente una sesión de electroquimioterapia (EQT), lo cual coincide con lo reportado en investigaciones previas, donde se ha observado que una sola aplicación puede ser suficiente en numerosos casos (Spugnini *et al.*, 2015; Dos Anjos *et al.*, 2020; Simčič *et al.*, 2021). Las sesiones adicionales se indicaron en aquellos gatos que presentaron una respuesta parcial, ausencia de respuesta inicial o recidiva tras haber alcanzado una respuesta completa.

La necesidad de múltiples sesiones en algunos pacientes (28 %) mostró una asociación significativa con la extensión tumoral, siendo más común en los estadios T3 y T4. Este hallazgo refuerza la idea de que la eficacia del tratamiento no solo depende de las características biológicas del tumor, sino también de su tamaño y profundidad. Estudios previos han descrito patrones similares, señalando que en tumores de gran volumen o con infiltración profunda, la EQT puede requerir aplicaciones repetidas o combinadas para lograr un control adecuado (Mir *et al.*, 2006; Tozon *et al.*, 2014). Asimismo, se observó que el tamaño tumoral se correlaciona con la aparición de efectos adversos, lo que sugiere que, a mayor masa tumoral, mayor es la complejidad del manejo clínico y la probabilidad de requerir múltiples intervenciones.

De manera concordante, el estudio multicéntrico de Simčič *et al.* (2021) reportó que el 63,9 % de los gatos fueron tratados con una sola sesión de EQT, mientras que el 36,1 % necesitó sesiones adicionales, ya sea por recurrencia local o para consolidar la respuesta inicial. Estos datos respaldan la eficacia de una única sesión en muchos casos, pero también subrayan la importancia de adaptar el tratamiento a la evolución clínica individual de cada paciente.

Uno de los principales retos al comparar estos resultados con los de otros estudios radica en la escasa estratificación de los pacientes según el estadio tumoral. Muchas investigaciones incluyen muestras pequeñas y presentan los resultados de forma agregada, sin distinguir entre casos iniciales y avanzados (Tozon *et al.*, 2014; Diop *et al.*, 2024). Esta heterogeneidad limita la posibilidad de establecer conclusiones sólidas sobre la eficacia relativa del número de sesiones requeridas.

Otro aspecto que dificulta la comparación entre estudios es la variabilidad en los periodos de seguimiento. En algunos trabajos, los resultados se reportan únicamente hasta la obtención de una respuesta positiva, sin evaluar la duración de dicha respuesta ni la aparición de recidivas a largo plazo (Spugnini *et al.*, 2009; Tozon *et al.*, 2014; Spugnini *et al.*, 2015; Dos Anjos *et al.*, 2020). Esta falta de uniformidad metodológica pone de

manifiesto la necesidad de establecer protocolos más estandarizados, que incluyan criterios homogéneos de evaluación y tiempos de seguimiento claramente definidos.

5.4.4.4.- Gatos testados frente a FeLV/FIV

En otros estudios clínicos sobre EQT para el tratamiento del CCE en gatos, es habitual excluir a pacientes positivos a los virus de leucemia felina (FeLV) o de inmunodeficiencia felina (FIV). La razón principal de esta exclusión radica en que ambos virus comprometen el sistema inmunológico de los gatos, lo que puede afectar la respuesta al tratamiento y la capacidad de recuperación. Además, la presencia de estas infecciones puede influir en la progresión de la neoplasia y en la aparición de complicaciones adicionales (Hartmann, 2011), lo que dificulta la evaluación precisa de la eficacia y seguridad de la EQT en un entorno de estudio controlado.

Se han realizado investigaciones que respaldan la relevancia de estos virus en la oncología felina, destacando la importancia de los avances en programas de vacunación y detección, que han reducido significativamente la prevalencia de FeLV y, en consecuencia, su impacto como agente oncogénico en la población felina (Poli *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 2006).

La relación entre ciertos virus y el desarrollo de neoplasias en gatos ha sido ampliamente documentada, destacando especialmente el virus de la leucemia felina (FeLV). Este retrovirus, altamente patógeno, ha sido históricamente uno de los principales responsables de la aparición de linfomas y leucemias en la especie felina. Su mecanismo oncogénico se basa, en gran medida, en la inserción del genoma viral en proximidad a oncogenes celulares, como el myc, lo que conduce a su sobreexpresión y favorece una proliferación celular desregulada (Westman *et al.*, 2022).

Por su parte, el FIV también está asociado con un mayor riesgo de cáncer en gatos. Los gatos positivos a FIV tienen una probabilidad cinco veces mayor de desarrollar linfomas o leucemias en comparación con los gatos no infectados. En estos casos, los linfomas suelen ser de células B, y se ha sugerido que el impacto del virus en la oncogénesis es indirecto, promovido principalmente por la hiperplasia crónica de células B y la supresión inmunitaria que compromete la vigilancia tumoral. Además de los linfomas, el FIV se ha relacionado con CCE, fibrosarcomas y mastocitomas (Hartmann, 2011; Bęczkowski y Beatty, 2022).

En general, se recomienda esterilizar a estos gatos, evitar o reducir el acceso al exterior y las peleas con otros gatos (evitar o impedir la propagación del virus); y no vacunarlos de leucemia felina sin antes asegurarse de que son negativos, ya que puede activarse la enfermedad (Hartmann, 2011).

En el presente estudio se incluyó un grupo de 11 gatos positivos a FeLV y/o FIV (subgrupo 3) diagnosticados CCE, seleccionados por ser pacientes asintomáticos, con tumores mayoritariamente de bajo grado y con parámetros hematológicos dentro de los rangos normales. De los siete animales que pudieron ser evaluados hasta los 180 días tras el tratamiento con EQT, cuatro alcanzaron una respuesta completa, dos presentaron progresión de la enfermedad y uno fue eutanasiado por causas asociadas a su estado clínico. Ninguno de ellos desarrolló metástasis, y tuvieron un tiempo medio de supervivencia de 417 días, similar a los gatos no infectados.

Aunque el número de casos fue reducido, la evolución clínica observada indica que los gatos FeLV/FIV positivos, siempre que se encuentren clínicamente estables y presenten CCE de bajo grado, pueden responder favorablemente a la EQT, mostrando resultados comparables a los registrados en pacientes seronegativos. Esta respuesta favorable podría atribuirse, en parte, a la localización predominantemente superficial del tumor en la mayoría de los casos, lo que reduce la influencia directa de la inmunosupresión viral sobre la progresión neoplásica o la eficacia del tratamiento. En este contexto, la EQT se perfila como una alternativa terapéutica viable incluso en pacientes inmunocomprometidos, siempre que su estado clínico general permita tolerar el procedimiento.

5.4.4.5.- EQT/bleomicina con toceranib

Hasta el momento, no se han publicado estudios en gatos que evalúen terapias multimodales que incluyan la combinación de EQT/bleomicina, toceranib y antiinflamatorios no esteroideos. En nuestro estudio, este enfoque terapéutico se aplicó a un subgrupo de pacientes con tumores de mayor grado, siendo tratados 17 gatos con esta triple combinación (subgrupo 4).

Durante las primeras semanas de seguimiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de respuesta entre los gatos tratados con toceranib y aquellos que no recibieron este fármaco. No obstante, al evaluar los resultados a los 180 días, se evidenció una tendencia hacia una mayor proporción de respuestas completas o parciales en el grupo que recibió toceranib, así como un incremento en la supervivencia media. Este patrón es consistente con lo reportado en estudios previos realizados en otras especies o tipos tumorales, donde el uso de toceranib ha demostrado beneficios tanto en el control de la enfermedad como en la prolongación del intervalo libre de progresión (Wiles *et al.*, 2017).

Si bien el número de casos incluidos aún es limitado para establecer conclusiones definitivas, los resultados preliminares sugieren que la incorporación de toceranib podría potenciar los efectos terapéuticos de la combinación EQT/bleomicina, especialmente en neoplasias de comportamiento más agresivo. Estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar estudios adicionales con un mayor tamaño muestral, que permitan validar la eficacia y seguridad de esta estrategia terapéutica multimodal en gatos con CCE en estadios avanzados.

5.4.4.6.- Análisis de supervivencia.

En cuanto a los datos de supervivencia, nuestro estudio incluyó un seguimiento de hasta tres años en algunos casos, lo que permitió analizar la evolución a largo plazo según el grado tumoral. Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el grado tumoral constituye un factor pronóstico determinante en la supervivencia de los gatos con CCE tratados mediante EQT combinada con bleomicina. La clasificación de los casos según la OMS en dos grandes grupos (bajo grado: T1-T2; alto grado: T3-T4) permitió identificar diferencias claras y estadísticamente significativas en la supervivencia, lo que está en línea con observaciones previas en oncología veterinaria (Spugnini *et al.*, 2006; Tozon *et al.*, 2014; Simčič *et al.*, 2021).

En concreto, los gatos con tumores de bajo grado mostraron una supervivencia media significativamente mayor, 893 días, frente a los 440 en el grupo de alto grado. Este

hallazgo refuerza la hipótesis de que los tumores más localizados y de menor tamaño responden mejor al tratamiento y permiten un mayor control de la enfermedad a largo plazo, como ya sugerían varios estudios anteriores (Spugnini *et al.*, 2015; Diop *et al.*, 2024).

Además, el hecho de que el 81,6% de los casos con tumores de bajo grado permanecieran censurados (vivos al final del seguimiento), en contraste con el 55,6% en el grupo de alto grado, subraya la relevancia clínica del estadio tumoral en la evolución del paciente. Este patrón progresivo de peor pronóstico en tumores más avanzados también ha sido descrito por otros autores (Spugnini *et al.*, 2009; Wiles *et al.*, 2017).

5.4.4.7.- Tasas de respuesta al tratamiento.

Al finalizar el periodo de estudio, el 57% de los gatos seguían vivos, con un tiempo medio de supervivencia (TMS) de 439 días. Al desglosar por grado tumoral, los gatos con tumores de bajo grado presentaron un TMS estimado de 523 días, mientras que los de alto grado alcanzaron los 326 días.

Los resultados obtenidos en este estudio superan de forma notable los reportados en el trabajo multicéntrico de Simčič *et al.* (2021), en el cual solo el 23 % de los animales permanecían con vida al finalizar el seguimiento (14 de 61 casos), con una mediana de supervivencia de 286 días, un intervalo libre de enfermedad (ILE) de 136 días y una supervivencia libre de progresión (SLP) de 65,5 días. En contraste, los datos aquí presentados muestran mejoras sustanciales: una mayor tasa de supervivencia global (57 % frente a 23 %), un ILE más prolongado (297 frente a 136 días) y, de manera destacada, una SLP considerablemente superior (312 frente a 65,5 días).

Estas diferencias podrían estar relacionadas con diversos factores, entre ellos una selección más rigurosa de los casos, la aplicación de un protocolo terapéutico más uniforme, la incorporación de terapias combinadas en tumores de comportamiento más agresivo y un seguimiento clínico más estrecho. No obstante, para confirmar estos hallazgos y establecer su aplicabilidad clínica, será necesario llevar a cabo estudios adicionales con un mayor tamaño muestral y criterios metodológicos más estrictos.

En cuanto a las recurrencias, en nuestro estudio se observó una tasa global del 32,2 % entre los pacientes que habían alcanzado una respuesta completa (RC), diferenciándose en un 17,6 % para las lesiones de bajo grado y un 52,8 % en las de alto grado. Estos valores son superiores a los reportados en otros estudios. Por ejemplo, Simčič *et al.* (2021) registraron una tasa de recurrencias del 22,5 % tras RC, mientras que Tozon *et al.* (2014) informaron solo un 18 %, y Spugnini *et al.* (2009) documentaron recurrencia local en 2 de los 9 gatos tratados (22,2 %).

Tal como hemos observado, estas recurrencias pueden deberse a la persistencia de células neoplásicas residuales que no fueron completamente eliminadas durante el tratamiento, y que progresaron con el tiempo. Asimismo, la exposición solar crónica y continuada, especialmente en gatos con acceso al exterior, podría haber contribuido a la aparición de nuevas lesiones en la misma localización. Un factor limitante para confirmar estas hipótesis es la negativa habitual de los tutores a realizar nuevas biopsias tras el tratamiento, lo que impide verificar la presencia de enfermedad residual de forma histopatológica.

5.4.4.8.- Evaluación de la seguridad: Toxicidad local y sistémica.

En el presente estudio se evaluaron los efectos adversos, tanto locales como sistémicos, asociados al uso de EQT con bleomicina en gatos diagnosticados con CCE. La mayoría de los pacientes (86 %) presentó una inflamación leve durante los primeros 15 días posteriores al tratamiento, mientras que un 9,7 % desarrolló edema o necrosis localizada, y solo un 1,1 % experimentó hinchazón severa. Estos efectos fueron considerados esperables, en concordancia con el mecanismo de acción de la EQT, y coinciden con lo reportado por Spugnini *et al.* (2015) y Tozon *et al.* (2015), quienes identificaron la inflamación, el eritema y la necrosis superficial como las reacciones adversas más frecuentes tras la aplicación de esta técnica.

En este estudio, la toxicidad local fue evaluada mediante una escala subjetiva de seis puntos. El 86% de los gatos se clasificaron con toxicidad leve (≤ 2), mientras que el 9,7% mostró grados más severos (>2), especialmente en zonas altamente vascularizadas o móviles como párpados o plano nasal. En estos casos, se observaron úlceras, formación de costras adheridas, infecciones locales leves y necrosis de tejidos desvitalizados, con tiempos de recuperación de hasta 4-6 semanas. En 4 pacientes, la inflamación nasal severa dificultó la alimentación, requiriendo la colocación de sondas esofágicas, práctica que no fue mencionada en estudios anteriores (Spugnini *et al.*, 2015; Tozón *et al.*, 2015, Simčič *et al.*, (2021), pero que se considera útil en medicina veterinaria para mantener el soporte nutricional (Zoran, 2005; Chan, 2020).

En este estudio se analizaron los efectos adversos locales y sistémicos asociados al uso de EQT con bleomicina en gatos diagnosticados con CCE. En relación con el dolor provocado por las contracciones musculares inducidas por los pulsos eléctricos, este fue mínimo, gracias al uso de anestesia general y bloqueos locales, lo que favoreció el confort del paciente y permitió un manejo adecuado de la inflamación postoperatoria.

Simčič *et al.* (2021) observaron un perfil de toxicidad local más severo, con un 49 % de los casos presentando necrosis profunda o pérdida de tejido, especialmente en tumores de gran tamaño o cuando se utilizaron parámetros eléctricos más intensos. En contraste, los parámetros eléctricos empleados en el presente estudio (1000–1300 V, pulsos de 100 μ s, frecuencia de 47–63 Hz) mostraron un perfil de seguridad más favorable, con menor incidencia de complicaciones graves.

Desde el punto de vista sistémico, la bleomicina fue bien tolerada. Los efectos secundarios registrados fueron leves, incluyendo vómitos, diarrea y anorexia, los cuales podrían estar más relacionados con la inflamación local o con anosmia secundaria que con toxicidad directa del fármaco. No se detectaron alteraciones hematológicas ni bioquímicas relevantes, lo que coincide con los hallazgos de Tozon *et al.* (2015) y Spugnini *et al.* (2015), quienes también destacaron la baja incidencia de toxicidad sistémica tras la administración intravenosa de bleomicina.

En estudios experimentales, como el realizado por Radzevičiūtė *et al.* (2022), se ha explorado el uso de doxorubicina como alternativa terapéutica, especialmente en combinación con pulsos eléctricos de nanosegundos a alta frecuencia (1 MHz). Esta técnica ha demostrado una permeabilización celular eficiente con menor daño térmico.

Sin embargo, dichos protocolos aún no han sido implementados en la práctica clínica veterinaria, lo que abre nuevas líneas de investigación para el futuro.

Por otro lado, en los pacientes tratados con toceranib, no se observaron efectos adversos significativos. Aunque existen pocos estudios en gatos, los disponibles (Holtermann *et al.*, 2019; Žagar y Schmidt, 2023) indican que se trata de un fármaco generalmente bien tolerado.

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la seguridad y tolerabilidad del tratamiento con EQT combinada con bleomicina en gatos con CCE. La toxicidad local observada fue manejable, mientras que los efectos sistémicos fueron mínimos.

5.5.- Electroquimioterapia en otros tipos de tumores y especies

El haber podido aplicar la electroquimioterapia (EQT) en una muestra amplia y representativa de casos de CCE felino nos ha permitido adquirir un conocimiento más profundo sobre su uso, manejo y respuesta clínica. Esta experiencia ha servido como base para extrapolar su aplicación a otros tipos de tumores y especies, donde la casuística es mucho más limitada y la posibilidad de reunir grandes cohortes resulta difícil. Así, el presente trabajo no solo aporta evidencia en el contexto específico del CCE felino, sino que también ha contribuido al desarrollo y consolidación de protocolos terapéuticos aplicables a otros escenarios clínicos menos frecuentes.

5.5.1.- Carcinoma de células escamosas (CCE) en halcón peregrino (*Falco peregrinus*)

El uso de la electroquimioterapia (EQT) se considera una buena opción para tratar muchos tipos de tumores en animales y humanos. En medicina veterinaria, específicamente en el campo de la oncología en animales exóticos, se ha descrito el tratamiento de diversos tumores epiteliales en diferentes especies. Estas especies incluyen periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) (Lanza *et al.*, 2019), cacaúas ninfas (*Nymphicus hollandicus*) (Racnik *et al.*, 2019), hurones (*Mustela putorius furo*) (Racnik *et al.*, 2017), tortugas (*Trachemys scripta scripta*) (Lanza *et al.*, 2015), reptiles (*Pogona vitticeps*) (Doneley *et al.*, 2022) y erizos australianos (*Atelerix albiventris*) (Spugnini *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, no hemos encontrado en la literatura ningún otro caso de CCE tratado con EQT en halcón peregrino (*Falco peregrinus*). Dado que este tipo de terapia no suele producir efectos secundarios (a diferencia de la quimioterapia convencional), puede utilizarse con seguridad en animales exóticos, aunque no se han establecido protocolos de dosificación, descrito efectos secundarios ni estandarizado las sesiones; extrapolándose todo de lo que se hace en perros y gatos.

Si bien es cierto, que en especies exóticas se utiliza principalmente cisplatino intratumoral (Racnik *et al.*, 2019), también se ha empleado bleomicina, por lo que sería interesante evaluar la respuesta del cisplatino en aves rapaces ante este tipo de lesiones. En algunos casos, en otras especies de aves, incluido el que se describe aquí, la bleomicina mostró mejores resultados (Racnik *et al.*, 2019).

En el caso descrito, la cirugía no resultó viable debido al tamaño y a la extensión del tejido afectado. Se optó, por tanto, por un abordaje orientado al control local de la enfermedad y a la prolongación de la supervivencia. Este enfoque permitió una reducción

significativa de la profundidad de la lesión, aunque no consiguió un control completo a nivel superficial, lo que derivó en una progresión localizada de la enfermedad. No obstante, esta evolución no comprometió la capacidad de vuelo del ave.

Se requieren más estudios en esta especie para profundizar en los efectos de la técnica y optimizar parámetros como las dosis, la periodicidad y el número de sesiones.

5.5.2.- *Condroma mandibular canino*

El condroma mandibular en perros es una neoplasia de comportamiento benigno, pero su localización y crecimiento progresivo pueden generar alteraciones funcionales significativas (Milli *et al.*, 1990; Thompson y Poll, 2002). En el caso que abordamos, la masa tumoral afectaba la región rostral de la mandíbula, comprometiendo la alimentación y causando dolor, ulceración y sangrado.

Una de las principales ventajas clínicas de la electroquimioterapia (EQT) reside en su abordaje mínimamente invasivo. A diferencia de la cirugía tradicional en estos casos, como la hemimandibulectomía, el procedimiento no requiere incisiones mayores, extirpación extensa de tejido ni esfuerzos reconstructivos (Moretti *et al.*, 2022). Esto la hace especialmente útil para mantener la integridad estructural y funcional de la cavidad oral, reduciendo el riesgo de complicaciones postoperatorias que interfieran con la alimentación y la bebida. En comparación con la radioterapia (Sonis *et al.*, 2004), la EQT evita efectos adversos, como mucositis, xerostomía y retraso en la cicatrización de las heridas, lo que proporciona un período de recuperación más favorable para los pacientes.

Aunque la EQT no puede revertir la lisis ósea existente, sí puede lograr el control local de la enfermedad y contribuye significativamente al alivio del dolor. La evidencia en oncología humana ha demostrado que la EQT puede reducir notablemente el dolor asociado a tumores, especialmente en pacientes con osteosarcoma (Campanacci *et al.*, 2021). Se cree que este beneficio se debe tanto a la reducción del volumen tumoral como a la atenuación de los procesos inflamatorios locales y puede extrapolarse razonablemente a pacientes veterinarios que padecen tumores orales con afección ósea.

5.5.3.- *Carcinoma de células escamosas del tercer párpado felino*

La aplicación de EQT como monoterapia para el carcinoma de células escamosas (CCE) del tercer párpado en dos gatos demostró ser eficaz y segura en una localización anatómicamente compleja, donde la cirugía tradicional suele implicar enucleación o resecciones amplias (Spugnini, 2015; Diop *et al.*, 2024). Los resultados se alinean con la tendencia actual hacia tratamientos conservadores y órgano-específicos, tanto en oncología veterinaria como en medicina humana. La combinación de bleomicina sistémica e intratumoral pudo haber favorecido las respuestas consistentes y sostenidas observadas.

Además del efecto citotóxico directo, la EQT puede inducir respuestas inmunogénicas que contribuyan al control tumoral a largo plazo. En comparación con otras terapias no quirúrgicas, como la plesioterapia o la terapia fotodinámica (Bailey, 2023; Sebbag y Pe'er, 2024), la EQT ofrece la ventaja de requerir una sola sesión y proporcionar intervalos libres de enfermedad más prolongados. Estos hallazgos respaldan la inclusión de la EQT

dentro de las opciones terapéuticas en oncología ocular felina y justifican la necesidad de futuros estudios prospectivos.

3.6.4.- *Plasmocitomas extramedulares en pacientes caninos*

Los plasmocitomas extramedulares (PEM) son neoplasias poco frecuentes en perros, de bajo potencial metastásico, pero con riesgo de recurrencia si la resección es incompleta. El tratamiento estándar es la cirugía con amplios márgenes, pero en localizaciones orales o labiales puede requerir procedimientos radicales y mutilantes (Kupanoff, 2006; Withrow *et al.*, 2012; Rawicka *et al.*, 2022).

En los dos casos descritos, se empleó la electroquimioterapia (EQT) como tratamiento adyuvante tras la resección incompleta. Una única sesión con bleomicina y electroporación consiguió la remisión clínica completa y mantenida, sin recidiva local durante seguimientos prolongados (703 y 575 días). Estos resultados coinciden con estudios previos que documentan altos porcentajes de control local (70–94%) y supervivencias superiores a un año en tumores similares tratados con EQT (Cunha *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2024).

A pesar del bajo potencial metastásico de los PEM, se recomienda un seguimiento a largo plazo, especialmente en casos con márgenes incompletos o indicadores histológicos de agresividad (p. ej., índice mitótico alto o anisocariosis) (Gupta *et al.*, 2014). Los PEM se diferencian del mieloma múltiple (MM) debido a su falta de afectación de la médula ósea y características sistémicas (Clark *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2008). No obstante, casos raros pueden progresar a MM, lo que justifica una vigilancia continua (Rawicka *et al.*, 2022).

6.- CONCLUSIONES:

1. En las condiciones de nuestro trabajo, la crioterapia ha sido eficaz en CCE felino de pequeño tamaño y diagnóstico temprano; sin embargo, incluso combinada con cirugía, los tumores infiltrativos han presentado una alta tasa de recidivas, y su uso no ha resultado adecuado en regiones anatómicas sensibles, como el plano nasal.
2. El CCE felino de origen solar de nuestros casos ha presentado baja frecuencia de metástasis (8,6 %), asociada a tumores de alto grado, sin relación con el estado retroviral.
3. La EQT con bleomicina se ha mostrado eficaz y segura, con buenos resultados estéticos y funcionales, observándose una mayor recuperación en tumores de bajo grado (71%) que en alto grado (38 %).
4. La EQT controló el CCE de los casos de nuestro estudio en el 72 % de los gatos con una única sesión, aunque en tumores avanzados fueron necesarias sesiones adicionales.
5. Los gatos FeLV/FIV positivos, clínicamente estables y que presentaban tumores de bajo grado, pudieron beneficiarse de la EQT en condiciones similares a los no infectados.
6. La combinación de EQT con bleomicina y toceranib, ha mostrado resultados preliminares prometedores en tumores de alto grado de nuestro estudio, apreciándose un mayor control del tumor (46% vs 27%).
7. La EQT con bleomicina ha mostrado altas tasas de supervivencia (893 días), prolongados intervalos libres de enfermedad (345 días) y mayor supervivencia sin progresión (381 días), especialmente en tumores de bajo grado, evidenciando un efecto relevante sobre el pronóstico de la enfermedad.
8. Las recurrencias fueron significativamente más frecuentes en los tumores de alto grado (52,8 %) frente a los de bajo grado (17,6 %), confirmando el valor pronóstico del grado tumoral.
9. La mayoría de los gatos de nuestro estudio toleró adecuadamente la EQT, sin presentar efectos adversos locales o sistémicos de relevancia, por lo que la consideramos una técnica alternativa segura, incluso en pacientes geriátricos.
10. Con el protocolo seguido en nuestro estudio, la EQT ha demostrado ser una herramienta terapéutica mínimamente invasiva, muy versátil y útil, aplicable en otras especies y tipos tumorales; habiéndose obtenido resultados prometedores en casos clínicos complejos o con riesgos elevados en terapias convencionales como CCE en halcón peregrino, condroma mandibular canino, CCE del tercer párpado en gatos y plasmocitomas extramedulares caninos.

7.- RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivo principal evaluar la eficacia y seguridad de la electroquimioterapia (EQT) con bleomicina en el tratamiento del carcinoma de células escamosas (CCE) localizado en la región cefálica de gatos, particularmente en áreas de difícil abordaje quirúrgico como el plano nasal, maxilar y. El estudio incluyó una muestra representativa de 93 gatos y el seguimiento se extendió hasta 1095 días, lo que permitió valorar no solo la respuesta clínica inmediata, sino también la evolución a medio y largo plazo, incluyendo recurrencias, supervivencia y calidad de vida postratamiento. Los resultados obtenidos en este estudio confirman que la EQT con bleomicina es una técnica eficaz y bien tolerada para el tratamiento del CCE en gatos. Se alcanzó una tasa de remisión completa del 59 % en el total de pacientes, con un pronóstico particularmente favorable en tumores de bajo grado, donde la tasa de remisión ascendió al 71 %. Además, se registraron niveles bajos de toxicidad sistémica y los efectos adversos locales fueron, en su mayoría, leves o moderados, y pudieron ser controlados eficazmente mediante cuidados postoperatorios adecuados.

La supervivencia media global fue de 737 días, con una diferencia significativa entre los grupos según el grado tumoral: 893 días en pacientes con tumores de bajo grado frente a 440 días en aquellos con tumores de alto grado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, según el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, lo que refuerza el valor pronóstico del grado tumoral y la utilidad de la EQT como estrategia terapéutica en casos seleccionados. Además, se observó que los gatos FeLV/FIV positivos también pueden beneficiarse del tratamiento, siempre que se encuentren clínicamente estables. Asimismo, se exploró un enfoque terapéutico multimodal, combinando la EQT con toceranib en tumores más agresivos o infiltrativos, con una tendencia a mejores tasas de respuesta y una supervivencia media más prolongada.

El presente estudio también permitió analizar el impacto del grado tumoral sobre la recurrencia y la supervivencia, evidenciando una asociación significativa entre tumores de mayor grado y un pronóstico menos favorable. En términos de tolerancia al tratamiento, se confirmó la buena aceptación del protocolo de EQT con bleomicina, siendo necesaria la implementación de soporte nutricional, como sondas esofágicas, únicamente en casos puntuales, particularmente en pacientes con afectación nasal extensa. Asimismo, los hallazgos refuerzan el potencial de la EQT como herramienta terapéutica en oncología veterinaria más allá del ámbito felino. La experiencia clínica acumulada y el desarrollo técnico alcanzado durante este trabajo han permitido extender con éxito la aplicación de la EQT a otras especies y tipos tumorales, a pesar de las limitaciones impuestas por el bajo número de casos en muchos de estos contextos. Se han documentado resultados alentadores en el tratamiento de carcinoma de células escamosas en halcón peregrino (*Falco peregrinus*), condroma mandibular canino, CCE del tercer párpado en gatos y plasmocitomas extramedulares en caninos. Estos casos respaldan el valor de la EQT como una alternativa terapéutica versátil y mínimamente invasiva, especialmente útil en situaciones donde la cirugía no es viable o compromete estructuras anatómicas funcionales.

En conclusión, este estudio no solo consolida el papel de la EQT como tratamiento de elección en determinados casos de CCE en gatos, sino que también amplía su proyección

dentro de la oncología veterinaria. La evidencia obtenida respalda su aplicación en distintas especies, destacando su capacidad para equilibrar la eficacia oncológica con la preservación del bienestar animal. Este enfoque clínico integrador refuerza el valor de la EQT como una herramienta terapéutica versátil, segura y mínimamente invasiva en contextos donde las opciones convencionales pueden ser limitadas o inadecuadas.

SUMMARY

This thesis aimed to evaluate the efficacy and safety of electrochemotherapy (ECT) using bleomycin in the treatment of squamous cell carcinoma (SCC) located in the cephalic region of cats, particularly in areas where surgical access is challenging, such as the nasal plane, maxilla, and eyelids. The study included a substantial cohort of 93 feline patients and follow-up extended up to 1095 days, allowing for the assessment of not only short-term responses but also long-term outcomes, including recurrence, survival, and post-treatment quality of life.

The findings of this study confirm that ECT is an effective and well-tolerated therapeutic approach, achieving complete remission in 59% of the overall feline cohort, with notably higher success rates observed in low grade tumors (up to 71%). The treatment was associated with a low incidence of systemic toxicity, and local adverse effects were predominantly mild to moderate in severity, manageable through appropriate post-treatment care. The median overall survival was 736 days, with a statistically significant advantage for cats diagnosed with low-grade tumors (893 days compared to 440 days) in high grade cases, as demonstrated by Kaplan–Meier survival analysis. Notably, the study also found that FeLV/FIV-positive cats can benefit from ECT, provided they are clinically stable. A multimodal therapeutic approach, combining ECT with toceranib in more aggressive or infiltrative tumors, was also explored and showed a trend toward better response rates and improved medium-term survival. The study further underscored the significant correlation between tumor grade and clinical outcome, demonstrating that higher grade tumors are associated with increased recurrence rates and reduced survival times. The treatment protocol was generally well tolerated, with only a small number of cases requiring nutritional support, such as esophageal feeding tubes, primarily in patients with extensive nasal involvement. Importantly, this research highlights the broader potential of ECT as a therapeutic modality in veterinary oncology beyond feline squamous cell carcinoma (SCC). The technical expertise and clinical insights gained throughout this study facilitated the successful application of ECT in other tumor types and species, despite the inherent limitations posed by small case numbers. Promising outcomes have been documented in cases such as SCC in peregrine falcons (*Falco peregrinus*), mandibular chondromas in dogs, third eyelid SCCs in cats, and extramedullary plasmacytomas in canines. These findings reinforce the value of ECT as a versatile, minimally invasive therapeutic option, particularly in scenarios where surgical intervention is not feasible or may compromise critical anatomical structures.

In conclusion, this work not only supports the use of ECT as a first line treatment in selected cases of feline SCC, but also paves the way for its broader integration into veterinary oncology. Its ability to balance effective tumor control with the preservation of animal welfare positions ECT as a promising tool in the management of complex oncological cases across species.

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787–793. <https://doi.org/10.1038/383787a0>.
- Abbaspour Babaei, M., Kamalidehghan, B., Saleem, M. *et al.* (2016). Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 10: 2443–2459. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S89114>
- Ackerman, N. (2013). Supportive feeding methods for small animals. *Today's Veterinary Nurse*.
- Ahmad, K.A., Wang, G., Unger, G. *et al.* (2008). Protein kinase CK2-a key suppressor of apoptosis. *Advances in enzyme regulation*, 48: 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2008.04.002>.
- Alam, M., Ratner, D. (2001). Cutaneous squamous-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 344(13): 975-983. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103293441306>
- Alex Hsi, R., Rosenthal, D.I., Glatstein, E. (1999). Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs*, 57: 725-734. <https://doi.org/10.2165/00003495-199957050-00005>.
- Altamura, G., Degli Uberti, B., Galiero, G. *et al.* (2021). The small molecule BIBR1532 exerts potential anti-cancer activities in preclinical models of feline oral squamous cell carcinoma through inhibition of telomerase activity and down-regulation of TERT. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 620-776. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.620776>
- Andrade, A.L., Fernandes, M., Biazzone, L. *et al.* (2003). Clinical trial with 90Strontium Low Radiation for treatment of third eyelid neoplasms in dogs. *En: Genes, Dogs and Cancer: 3rd Annual Canine Cancer Conference*. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2005.12.003>
- Andrews, M. D. (2004). Cryosurgery for common skin conditions. *American Family Physician*, 69: 2365-2372.
- Araya, A.A., García, C.H., Younes, P.N., *et al.* (2021). La Vía de PD-1/PD-L1 como blanco de inmunoterapia contra el Cáncer. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 15(2): 61-81. <https://doi.org/10.15517/rmucr.v15i2.48625>
- Baba, Y., Iyama, K. I., Honda, S., *et al.* (2007). Cytoplasmic expression of type VII collagen is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology*, 71(3-4): 221-228. <https://doi.org/10.1159/000106426>
- Baer, K.E., Helton, K. (1993). Multicentric Squamous Cell Carcinoma in situ Resembling Bowen's Disease in Cats. *Veterinary Pathology*, 30(6):535-543. DOI:10.1177/030098589303000607
- Bailey, K. (2023). Treatment of palpebral squamous cell carcinoma in a cat using strontium-90 plesiotherapy. *Veterinary Record Case Reports*; 11(1), e548. <https://doi.org/10.1002/vrc2.548>
- Baltás, E., Kis, E., Nagy, N., *et al.* (2017). Electrochemotherapy for non-melanoma skin cancer in a child with xeroderma pigmentosum. *Acta Dermatolo-Venereologica*, 97:962-964. DOI: 10.2340/00015555-2687.
- Barnes, D.C., Demetriou, J.L. (2017). Surgical management of primary, metastatic and recurrent anal sac adenocarcinoma in the dog: 52 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 58(5):263-268. <https://doi.org/10.1111/jsap.12633>
- Bartels, K.E. (2002). Lasers in veterinary medicine—where have we been, and where are we going?. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 32(3): 495-515. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(02\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(02)00002-5)
- Bath-Hextall, F. J., Matin, R. N., Wilkinson, D., *et al.* (2013). Interventions for cutaneous Bowen's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007281.pub2>.
- Baust, J.G., Gage, A.A. Baust, J.M. (2016). Principles of cryoablation. *Dermatological cryosurgery and cryotherapy*, 9-16. DOI:10.1007/978-1-4471-6765-5_2

- Beatty, J.A., Hartmann, K. (2021). Advances in Feline Viruses and Viral Diseases. *Viruses*, 13(5), 923. <https://doi.org/10.3390/v13050923>.
- Beazley, M.D., Bagley, D.H., Ketcham, A.S. (1974). The effect of cryosurgery on peripheral nerves. *Journal of Surgical Research*, 16(3): 231-234. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(74\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0022-4804(74)90036-5).
- Bęczkowski, P. M., Beatty, J. A. (2022). Feline immunodeficiency virus: Current knowledge and future directions. *Advances in Small Animal Care*, 3(1), 145-159. <https://doi.org/10.1016/j.yasa.2022.05.007>
- Behrem, S., Žarković, K., Eškinja, N., *et al.* (2005). Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croatian Medical Journal*, 46(3):417-22.
- Behrader, M., Domenge, C., Lubinski, B., *et al.* (1993). Electrochemotherapy, a new antitumor treatment-1st clinical phase I-II trial. *Cancer*, 72(12): 3694-3700. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19931215\)72:12<3694::AID-CNCR2820721222>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931215)72:12<3694::AID-CNCR2820721222>3.0.CO;2-2).
- Bellei, M., Neves, D., Gava, A. *et al.* (2006). Prevalência de neoplasias cutâneas diagnosticadas em caninos no estado de Santa Catarina, Brasil, no período entre 1998 a 2002. *Review Ciência Agroveter*, 5: 73-79. <https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5378>
- Berger, E.P., Johannes, C.M., Post, G.S., *et al.* (2018). Retrospective Evaluation of Toceranib Phosphate (Palladia) Use in Cats with Mast Cell Neoplasia. *Journal of Feline Medical and Surgery*, 20: 95-102. <https://doi.org/10.1177/1098612X17695898>
- Bernard, M.P., Bancos, S., Sime, P.J., *et al.* (2008) "Targeting cyclooxygenase-2 in hematological malignancies: rationale and promise". *Current Pharmaceutical Design*, 14(21): 2051-2060. DOI: [10.2174/138161208785294654](https://doi.org/10.2174/138161208785294654)
- Bertino, G., G., Sersa, G., De Terlizzi, F., *et al.* (2016). European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. *European Journal of Cancer*, 63: 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.001>
- Bertone, E. R., Snyder, L. A., Moore, A. S. (2003). Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(4): 557-562. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02478.x>
- Bhardwaj, N., Strickland, A.D., Ahmad, F., *et al.* (2010). Liver ablation techniques: a review. *Surgery Endoscopy*, 24(2): 254-265. <https://doi.org/10.1007/s00464-023-10468-1>
- Brown, R.J., Newman, S.J., Durtschi, D.C., *et al.* (2012). Expression of PDGFR- and Kit in Canine Anal Sac Apocrine Gland Adenocarcinoma Using Tissue Immunohistochemistry. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10: 74-79. DOI: [10.1111/j.1476-5829.2011.00286.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00286.x)
- Brugge, J.S., Erikson, R.L. (1977). Identification of a Transformation-Specific Antigen Induced by an Avian Sarcoma Virus. *Nature*, 269: 346-348. DOI: [10.1038/269346a0](https://doi.org/10.1038/269346a0)
- Brunner, C.H., Dutra, G., Silva, C.B., *et al.* (2014). Electrochemotherapy for the treatment of ibropapillomas in *Chelonia mydas*. *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, 45:213-8. <https://doi.org/10.1638/2010-0125.1>.
- Cairnduff, F., Stringer, M. R., Hudson, E. J., *et al.* (1994). Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *British Journal of Cancer*, 69(3): 605-608. DOI: [10.1038/bjc.1994.112](https://doi.org/10.1038/bjc.1994.112)
- Calvet, C.Y., Famin, D., André, F.M., *et al.* (2014). Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. *Oncoimmunology*, 3, e28131 <https://doi.org/10.4161/onci.28131>
- Campanacci L, Bianchi G, Cevolani L, *et al.* (2021): Operating procedures for electrochemotherapy in bone metastases: Results from a multicenter prospective study on 102 patients. *European Journal of Surgical Oncology*, 47 (10): 2609-2617.

- Cannon, C. M., Trembley, J. H., Kren, B. T., *et al.* (2017). Evaluation of protein kinase CK2 as a therapeutic target for squamous cell carcinoma of cats. *American Journal of Veterinary Research*, 78(8): 946-953. DOI: [10.2460/ajvr.78.8.946](https://doi.org/10.2460/ajvr.78.8.946)
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., *et al.* (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, 7(5): 575-583. DOI: [10.1038/87904](https://doi.org/10.1038/87904)
- Carpenter, J.L., Andrews, L.K., Holzworth, J. (1987). Tumors and tumors-like lesions. *En Diseases of the cat medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders. 406-596. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2006.04.00>
- Caruntu, A., Scheau, C., Tampa, M., *et al.* (2021). Complex Interaction among immune, inflammatory, and carcinogenic mechanisms in the head and neck squamous cell carcinoma. Springer International Publishing. *Best Practice in Health Care*, 11-35. https://doi.org/10.1007/5584_2021_626
- Carvalho, T., Vala, H., Pinto, C., *et al.* (2005). Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, 42(1): 66-73. DOI: [10.1354/vp.42-1-66](https://doi.org/10.1354/vp.42-1-66)
- Cemazar, M., Sersa, G. (2019). Recent advances in electrochemotherapy. *Bioelectricity*, 1(4): 204-213. DOI: [10.1089/bioc.2019.0028](https://doi.org/10.1089/bioc.2019.0028)
- Cemazar, M., Tamzali, Y., Sersa, G., *et al.* (2008). Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4): 826-831. DOI: [10.1111/j.1939-1676.2008.0117.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0117.x)
- Cerezo, L., Otero, J., Aragón, G., *et al.* (1990). Conjunctival intraepithelial and invasive squamous cell carcinomas treated with strontium-90. *Radiotherapy and Oncology*, 17(3): 191-197. DOI: [10.1016/0167-8140\(90\)90203-9](https://doi.org/10.1016/0167-8140(90)90203-9)
- Chan, D. L. (2020). Nutritional Support of the Critically Ill Small Animal Patient. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 50(6), 1411-1422. DOI: [10.1016/j.cvsm.2020.07.006](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.006)
- Cheng, S.J., Lee, J. J., Kok, S. H., *et al.* (2010). Expression of placenta growth factor: an independent factor for prediction of progression and prognosis of oral cancer. *Head & Neck*, 32(10): 1363-1369. <https://doi.org/10.1002/hed.21335>
- Cheng, S.Y., Luk, N. M., Chong, L. Y. (2001). Special features of non-melanoma skin cancer in Hong Kong Chinese patients: 10-year retrospective study. *Hong Kong Medical Journal*, 7(1): 22-28.
- Christensen, S. R. (2018). Recent advances in field cancerization and management of multiple cutaneous squamous cell carcinomas. *Research*, 7. DOI: [10.12688/f1000research.12837.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.12837.1)
- Clark, G.N., Berg, J., Engler, S. J., *et al.* (1992). Extramedullary plasmacytomas in dogs: results of surgical excision in 131 cases. *Journal American Animal Hospital Association*, 28:105-111.
- Clarke, R. E. (1991). Cryosurgical treatment of feline cutaneous squamous cell carcinoma. *Australian Veterinary Practice*, 21(3): 148-152. [http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9060](https://doi.org/10.1590/1678-4162-9060)
- Clover, A. J. P., Salwa, S. P., Bourke, M. G., *et al.* (2020). Electrochemotherapy for the treatment of primary basal cell carcinoma; A randomized control trial comparing electrochemotherapy and surgery with five year follow up. *European Journal of Surgical Oncology*, 46(5): 847-854. DOI: [10.1016/j.ejso.2019.11.509](https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.11.509)
- Cooper, I. S. (1963). Cryogenic surgery: a new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissues. *New England Journal of Medicine*, 268(14): 743-749. DOI: [10.1056/NEJM196304042681401](https://doi.org/10.1056/NEJM196304042681401)
- Cooper, S., Dawber, R. (2001). The history of cryosurgery. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94: 196-201. <https://doi.org/10.1177/014107680109400416>
- Cullen, J. M., Breen, M. (2016). An overview of molecular cancer pathogenesis, prognosis, and diagnosis. *Tumors in Domestic Animals*, 1-26. DOI: [10.1002/9781119181200.ch1](https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch1)

- Cunha, R. M. D. C., Lavalle, G. E., Caires, C. E. T. *et al.* (2017). Electrochemotherapy treatment of oral extramedullary plasmacytoma of the tongue: a retrospective study of three dogs. *Ciência Rural*, 47. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170425>
- Cunha, S. C., Carvalho, L. A. V., Canary, P. C., *et al.* (2010). Radiation therapy for feline cutaneous squamous cell carcinoma using a hypofractionated protocol. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12: 306-313. DOI: [10.1016/j.jfms.2009.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.10.005)
- Daleck, C., Nardi, A., Rodaski, S. (2008). *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo, Roca. 2ª Ed., p. 606.
- Daskalov, I., Mudrov, N., Peycheva, E. (1999). Exploring new instrumentation parameters for electrochemotherapy. Attacking tumors with bursts of biphasic pulses instead of single pulses. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 18(1): 62-66. DOI: [10.1109/51.740982](https://doi.org/10.1109/51.740982)
- Daud, A.I., DeConti, R. C., Andrews, S. *et al.* (2008) Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26(36):5896–5903. DOI: [10.1200/JCO.2007.15.6794](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6794)
- De Castro Cunha, R. M., Lavalle, G. E., Nunes, F. C., *et al.* (2023). Canine squamous cell carcinoma: Electrochemotherapy association with surgery and correlation with overall survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, 21: 240–254. DOI: [10.1111/vco.12882](https://doi.org/10.1111/vco.12882)
- De Oliveira Pires, F. A., Viéra, R. B., Grego, J. C., *et al.* (2021). Oral extramedullary plasmocytoma in domestic cat. *Ciência Animal*, 31(4): 154-162. http://www.uece.br/cienciaanimal/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=954&tmpl=component&format=raw&Itemid=157
- De Queiroz, G. F., Matera, J. M., Zaidan Dagli, M. L. (2008). Clinical study of cryosurgery efficacy in the treatment of skin and subcutaneous tumors in dogs and cats. *Veterinary Surgery*, 37(5): 438-443. DOI: [10.1111/j.1532-950X.2008.00411.x](https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2008.00411.x)
- Diop, N., Sayag, D., Marques, G. B., *et al.* (2024). Comparison of Three Chemotherapy Protocols with Electrochemotherapy for the Treatment of Feline Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology*; 22(3): 437-446. <https://doi.org/10.1111/vco.12995>
- Dobashi, Y., Shoji, M., Jiang, S. X., *et al.* (1998). Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *The American Journal of Pathology*, 153(3): 963-972. DOI: [10.1016/S0002-9440\(10\)65638-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65638-6)
- Doneley, R. J. T., Spröhnle-Barrera, C. H., Jones, E. E., *et al.* (2022). The use of electrochemotherapy to treat an oral mucocutaneous fibrosarcoma in a central bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 41, 38-41.
- Dor, Y., Camenisch, T. D., Itin, A., *et al.* (2001). A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Development*, 128(9): 1531-1538. DOI: [10.1242/dev.128.9.1531](https://doi.org/10.1242/dev.128.9.1531)
- Doré, M. (2011). “Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers”. *Veterinary Pathology*, 48(1): 254–265. DOI: [10.1177/0300985810379434](https://doi.org/10.1177/0300985810379434)
- Dorn, C. R., Taylor, D. O., Schneider, R. (1971). Sunlight exposure and risk of developing cutaneous and oral squamous cell carcinomas in white cats. *Journal of the National Cancer Institute*, 46: 1073–1078. <https://doi.org/10.1093/jnci/46.5.1073>
- Dos Anjos, D.S., Bueno, C., Magalhaes, L.F., *et al.* (2019). Electrochemotherapy induces tumor regression and decreases the proliferative index in canine cutaneous squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 9:15819.
- Dos Anjos, D.S., Rossi, Y.A., Sierra, O.R., *et al.* (2020). Outcome following curative-intent electrochemotherapy for extramedullary plasmocytoma in dogs—case reports. *Topics in companion animal medicine*, 40: 100-441. DOI: [10.1016/j.tcam.2020.100441](https://doi.org/10.1016/j.tcam.2020.100441)

- Dos Anjos, D.S., Rossi, Y.A., Sierra, O.R., *et al.* (2020). Response dataset from canine extramedullary plasmacytoma treated with lipophobic drugs enhanced by electroporation. *Data in Brief*, 32: 106-185. DOI: [10.1016/j.dib.2020.106085](https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106085)
- Dos Anjos, D.S., Sierra, O.R., Spugnini, E.P. *et al.* (2020). Comparison of two different doses of bleomycin in electrochemotherapy protocols for feline cutaneous squamous cell carcinoma nonsegregated from ultraviolet light exposure. *Science Report*, 10: 18362. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75472-0>
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E. *et al.* (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*, 2(5): 561- 566. DOI: [10.1038/nm0596-561](https://doi.org/10.1038/nm0596-561)
- Du, J.R., Jiang, Y., Zhang, Y. M., *et al.* (2003). Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 9(7): 1604-1606. DOI: [10.3748/wjg.v9.i7.1604](https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i7.1604)
- Eddy, S. F., Guo, S., Demicco, E. G., *et al.* (2005). Inducible IκB kinase/IκB kinase ε expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-κB activation in breast cancer cells. *Cancer Research*, 65(24): 11375-11383. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1602>
- Emmenegger, U., Man, S., Shaked, Y., *et al.* (2004). A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens. *Cancer research*, 64(11): 3994-4000. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-04-0580](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0580)
- Falk, H., Matthiessen, L. W., Wooler, G., *et al.* (2018). Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. *Acta Oncologica*, 57(3): 311-319. DOI: [10.1080/0284186X.2017.1355109](https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1355109)
- Favrot, C., Welle, M., Heimann, M., *et al.* (2009). Clinical, histologic, and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma *in situ*. *Veterinary Pathology*, 46(1): 25-33. DOI: [10.1354/vp.46-1-25](https://doi.org/10.1354/vp.46-1-25)
- Feroli, M., Perrone, A. M., De Iaco, P., *et al.* (2024). Clinical Insights and Future Prospects: A Comprehensive Narrative Review on Immunomodulation Induced by Electrochemotherapy. *Current Oncology*, 31(10): 6433. DOI: [10.3390/curroncol31100478](https://doi.org/10.3390/curroncol31100478)
- Fernández, J. G., Rodríguez, D. A., Valenzuela, M., *et al.* (2014). Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β-catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Molecular Cancer*, 13(1): 1-15. DOI: [10.1186/1476-4598-13-209](https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-209)
- Ferrara, N. (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*, 55: 15-35.
- Ferrer, E., Rodríguez, I. (2023). Description of outcome and adverse events in 21 cats with locally advanced nasal planum squamous cell carcinoma treated with electrochemotherapy, BSAVA Congress Proceedings. <https://doi.org/10.22233/9781913859152.32.4>
- Fesseha, H., Yilma, T. (2020). Cyrosurgery: Its Principles and Application-A Review. *CPQ Medicine*, 10(2): 1-18.
- Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B., *et al.* (2008). FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nature Reviews Cancer*, 8(12): 942-956. DOI: [10.1038/nrc2524](https://doi.org/10.1038/nrc2524)
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Molecular Medicine*, 1(2): 120-122. DOI: [10.1038/nm0195-27](https://doi.org/10.1038/nm0195-27)
- Foster S.F., Charles J.A., Swinney G.R., *et al.* (1999). Multiple crusted cutaneous plaques in a cat, *Australian Veterinary Journal*, 77 (6): 360–368. DOI: [10.1111/j.1751-0813.1999.tb10303.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1999.tb10303.x)
- Frandsen, S. K., Vissing, M., Gehl, J. (2020). A comprehensive review of calcium electroporation—A novel cancer treatment modality. *Cancers*, 12(2):1-21. DOI: [10.3390/cancers12020290](https://doi.org/10.3390/cancers12020290)

- Frimberger, A. E., Moore, A. S., Cincotta, L., *et al.* (1998). Photodynamic therapy of naturally occurring tumors in animals using a novel benzophenothiazine photosensitizer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(9): 2207-2218.
- Front, D., Iosilevsky, G., Even-Sapir, E., *et al.* (1990). Administered dose and tumor dose of bleomycin labeled with cobalt-57 in mice and men. *Journal of Nuclear Medicine*, 31(11):1784–1790.
- Furihata, M., Ishikawa, T., Inoue, A., *et al.* (1996). Determination of the prognostic significance of unscheduled cyclin A overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2(10): 1781-1785.
- Gadde, S., Poda, S. (2023). Prevalence of Herpes Simplex Virus (HSV) and Cytomegalovirus (CMV) in Oral Squamous Cell Carcinoma patients with a history of Nicotine and Alcohol abuse. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 17(2): 873-884. DOI:10.5530/ctbp.2023.2.25
- Gage, A. A., Baust, J. M., Baust, J. G. (2009). Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology*, 59(3): 229-243. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.10.001
- Gargiulo, M., Papa, A., Capasso, P., *et al.* (2012). Electrochemotherapy for non-melanoma head and neck cancers: clinical outcomes in 25 patients. *Annals of Surgery*, 255: 1158-1164. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31824f68b2.
- Gill, V. L., Bergman, P. J., Baer, K. E., *et al.* (2008). Use of imiquimod 5% cream (Aldara™) in cats with multicentric squamous cell carcinoma in situ: 12 cases (2002–2005). *Veterinary and Comparative Oncology*, 6(1): 55-64. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2007.00144.x
- Goldsmith, J. R., Chen, Y. H. (2017). Regulation of inflammation and tumorigenesis by the TIPE family of phospholipid transfer proteins. *Cellular & Molecular Immunology*, 14 (6): 482-487. DOI: 10.1038/cmi.2017.4
- Goldschmidt, M.H. (2016). Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. En: Tumors in Domestic Animals; Wiley: Ames, IA, USA, V, 88–141.
- Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S. (1998). Squamous cell carcinoma. En: Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., eds. *Skin Tumors of the Dog and Cat*. Reed Educational and Professional Publishing Ltd.
- Goldstein, R. S., Hess, P. W. (1977). Cryosurgical treatment of cancer. *The Veterinary Clinics of North America*, 7(1): 51-64. DOI: 10.1016/s0091-0279(77)50005-6
- Goodfellow, M., Hayes, A., Murphy, S., *et al.* (2006). A retrospective study of 90Strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8(3): 169-176. DOI: 10.1016/j.jfms.2005.12.003
- Graham, G. F. (1993). Cryosurgery. *Clinics in Plastic Surgery*, 20 (1): 131-147. [https://doi.org/10.1016/S0094-1298\(20\)30779-3](https://doi.org/10.1016/S0094-1298(20)30779-3)
- Graham, J.E., Kent M.S., Théon, A. (2004). Current therapies in exotic animal oncology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 7: 757-781. DOI: 10.1016/j.cvex.2004.04.004.
- Gray, M. E., Lee, S., McDowell, A. L., *et al.* (2017). Dual targeting of EGFR and ERBB2 pathways produces a synergistic effect on cancer cell proliferation and migration in vitro. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 890-909. DOI: 10.1111/vco.12230.
- Groselj, A., Bosnjak, M., Strojjan, P., *et al.* (2018). Efficiency of electrochemotherapy with reduced bleomycin dose in the treatment of nonmelanoma head and neck skin cancer: Preliminary results. *Head & Neck*, 40(1): 120-125. DOI: 10.1002/hed.24991.
- Gross, T.L., Ihrke, P., Walder, E.J., *et al.* (2005). Epidermal Tumors. In *Skin Diseases of the Dog and Cat*; Blackwell Publishing: Oxford, UK, pp. 559–603.

- Guerra, B. (2006). Protein kinase CK2 subunits are positive regulators of AKT kinase. *International Journal of Oncology*, 28(3): 685-693. DOI: [10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990201\)20:2<391::AID-ELPS391>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990201)20:2<391::AID-ELPS391>3.0.CO;2-N)
- Guo, C., Yu, S., Davis, A. T., *et al.* (1999). Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells. *Cancer Research*, 59(5): 1146-1151.
- Gupta, A., Fry, J.L., Meindel, M., *et al.* (2014). Pathology in practice. Cutaneous extramedullary solitary digital plasmacytoma in a dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 244:163–165.
- Hahn, K.A., Oglivie, G., Rusk, T., *et al.* (2008). Masitinib Is Safe and Effective for the Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 1301–1309. DOI: [10.1111/j.1939-1676.2008.0190.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0190.x)
- Hald, J. (1994). Tumor-infiltrating lymphocytes mediated lysis of autologous squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 39: 383-390. DOI: [10.1007/BF01516999](https://doi.org/10.1007/BF01516999)
- Hammond, G. M., Gordon, I. K., Theon, A. P., *et al.* (2007). Evaluation of strontium Sr 90 for the treatment of superficial squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats: 49 cases (1990–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 231(5): 736-741. <https://doi.org/10.2460/javma.231.5.736>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1): 57-70. DOI: [10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hand, C. M., Kim, S., Waldow, S. M. (2004). Overview of radiobiology. *Washington, CM and Leaver D. Principles and Practice of Radiation Therapy. Missouri: Mosby*, 55-85. DOI: [10.1016/j.jfms.2009.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.10.005).
- Halsey, C. H., Gustafson, D. L., Rose, B. J., *et al.* (2014). Development of an in vitro model of acquired resistance to toceranib phosphate (Palladia®) in canine mast cell tumor. *BMC Veterinary Research*, 10: 1-12. DOI: [10.1186/1746-6148-10-105](https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-105)
- Hardman, C., Stanley, R. G. (2001). Radioactive gold-198 seeds for the treatment of squamous cell carcinoma in the eyelid of a cat. *Australian Veterinary Journal*, 79 (9): 604-608. DOI: [10.1111/j.1751-0813.2001.tb10776.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10776.x)
- Harper, A., Blackwood, L. (2017). Toxicity and response in cats with neoplasia treated with toceranib phosphate. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(6): 619-623. DOI: [10.1177/1098612X16643124](https://doi.org/10.1177/1098612X16643124)
- Harris, K., Gelberg, H. B., Kiupel, M., *et al.* (2019). Immunohistochemical features of epithelial-mesenchymal transition in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, 56 (6): 826-839. DOI: [10.1177/0300985819859873](https://doi.org/10.1177/0300985819859873)
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 143(3-4): 190-201. DOI: [10.1016/j.vetimm.2011.06.003](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.003)
- Hasegawa, Y., Shosu, K., Tsuji, K., *et al.* (2022). Intratumoral Heterogeneity of c-KIT Mutations in a Feline Splenic Mast Cell Tumor and Their Functional Effects on Cell Proliferation. *Science Reports*, 12 (1): 15791. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19089-5>
- Hauck, M.L. (2013). Tumors of the skin and subcutaneous tissues. En: Vail DM, Withrow S.J. (eds.) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncologia*. St Louis, Elsevier Saunders, 305-320. DOI:[10.1016/B978-1-4377-2362-5.00018-9](https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00018-9)
- Hauck, M. L., Oblak, M. L. (2020). Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. En: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 6th ed., 352-366. DOI:[10.1111/vco.12672](https://doi.org/10.1111/vco.12672)
- Hazirolu, R., Bilgili, H., Kapakin, K.A. (2007). Chondroma in a Dog. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31 (1): 14.

- Hellwig, C. T., Ludwig-Galezowska, A. H., Concannon, C. G., *et al.* (2010). Activity of protein kinase CK2 uncouples Bid cleavage from caspase-8 activation. *Journal of Cell Science*, 123(9): 1401-1406. DOI: [10.1242/jcs.061143](https://doi.org/10.1242/jcs.061143)
- Henderson, B. W., Dougherty, T. J. (1992). How does photodynamic therapy work?. *Photochemistry and Photobiology*, 55 (1): 145-157. DOI: [10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x)
- Hendrick, M. J., Goldschmidt, M. H., Shofer, F. S., *et al.* (1995). Post-surgical Outcomes in Cats with Carcinoma of the Nasal Planum. *Veterinary Pathology*; 32(1): 61-67. <https://doi.org/10.12982/VIS.2025.049>
- Hernández-Divers, S., Stahl, S.J., Cooper, T., *et al.* (2008). Comparison between CO2 laser and 4.0 MHz radiosurgery for incising skin in white *Carneau pigeons* (*Columba livia*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22 (2): 103-107. DOI:[10.1647/2007-009R1.1](https://doi.org/10.1647/2007-009R1.1)
- Hoffmann, N. E., Bischof, J. C. (2002). The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*, 60 (2): 40-49. DOI: [10.1016/s0090-4295\(02\)01683-7](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01683-7).
- Hoggard, N., Munday, J.S., Lu, J. (2018). Localization of *Felis catus* Papillomavirus Type 2 E6 and E7 RNA in Feline Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Pathology*, 55: 409–416. <https://doi.org/10.1177/0300985817750456>.
- Holt, T.L., Mann, F.A. (2002). Soft tissue application of lasers. *Veterinary Clinic North American Small Animal Practice*, 32 (3): 569-599. DOI: [10.1016/s0195-5616\(02\)00006-2](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(02)00006-2)
- Holtermann, N., Kiupel, M., Hirschberger, J. (2017). The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and side effects. *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 632-640. DOI: [10.1111/vco.12207](https://doi.org/10.1111/vco.12207).
- Huang, L., Jiang, S., Shi, Y. (2020). Tyrosine Kinase Inhibitors for Solid Tumors in the Past 20 Years (2001–2020). *Journal of Hematology Oncology*, 13:1-23. DOI: [10.1186/s13045-020-00977-0](https://doi.org/10.1186/s13045-020-00977-0)
- Isotani, M., Tamura, K., Yagihara, H., *et al.* (2006). Identification of a c-KIT Exon 8 Internal Tandem Duplication in a Feline Mast Cell Tumor Case and Its Favorable Response to the Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib Mesylate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114: 168–172. DOI: [10.1016/j.vetimm.2006.07.004](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.07.004)
- Ize-Iyamu, I.N., Saheeb, B.D., Edetanlen, B.E. (2013). Comparing the 810nm diode laser with conventional surgery in orthodontic soft tissue procedures. *Ghana Medicine Journal*, 47 (3): 107-111.
- Jacobs, K. M., Oliver, T. P. (2011). Cryotherapy. In *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, 869-872.
- Jarozeski, M.J., Coppola, D., Pottinger, C., *et al.* (2002): Electrochemotherapy for the treatment of human sarcoma in athymic rats. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 1:393-399. DOI: [10.1177/153303460200100510](https://doi.org/10.1177/153303460200100510)
- Jarrett, R. H., Norman, E. J., Gibson, I. R., *et al.* (2013). Curettage and diathermy: a treatment for feline nasal planum actinic dysplasia and superficial squamous cell carcinoma. *Journal of Small Animal Practice*, 54 (2): 92-98. DOI: [10.1111/jsap.12025](https://doi.org/10.1111/jsap.12025)
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., *et al.* (2018): Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*, 17:36. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0801-5>
- Jones, E. M., Marken, J. P., Silver, P. A. (2024). Synthetic microbiology in sustainability applications. *Nature Reviews Microbiology*; 22(6): 345-359. DOI: [10.1038/s41579-023-01007-9](https://doi.org/10.1038/s41579-023-01007-9).
- Kabak, Y.B.; Sozmen, M., Devrim, A. K., *et al.* (2020). Expression levels of angiogenic growth factors in feline squamous cell carcinoma. *Acta Veterinaria Hungarica*, 68: 37–48. DOI: [10.1556/004.2020.00005](https://doi.org/10.1556/004.2020.00005)
- Kaplan, I. (2010). The CO2 surgical laser. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28 (1): 847-848. DOI: [10.1089/pho.2010.9926](https://doi.org/10.1089/pho.2010.9926)

- Kaser-Hotz, B., Rohrer, C. R., Fidel, J. L., *et al.* (2001). Radiotherapy in three suspect cases of feline thymoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37(5): 483-488. DOI: [10.5326/15473317-37-5-483](https://doi.org/10.5326/15473317-37-5-483)
- Kibbi, N., Zhang, Y., Leffell, D. J., *et al.* (2020). Photodynamic therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ: Impact of anatomic location, tumor diameter, and incubation time on effectiveness. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82 (5): 1124-1130. <https://doi.org/10.1016/j.jdpdt.2022.103211>
- Kisakov, D. N., Belyakov, I. M., Kisakova, L. A., *et al.* (2024). The use of electroporation to deliver DNA-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*; 23(1): 102-123. DOI: [10.1080/14760584.2023.2292772](https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2292772).
- Klagsbrun, M. D. A. P., D'amore, P. A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annual Review of Physiology*, 53 (1): 217-239. DOI: [10.1146/annurev.ph.53.030191.001245](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.53.030191.001245)
- Klingemann, H. (2021). Immunotherapy for Dogs: Still Running Behind Humans. *Frontiers in Immunology*, 12: 665784. DOI: [10.3389/fimmu.2021.665784](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.665784)
- Knapp, D.W., Richardson, R.C., Bottoms, G.D., *et al.* (1992). Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 29(3): 214–218. DOI: [10.1007/bf00686255](https://doi.org/10.1007/bf00686255)
- Kodre, V., Cemazar, M., Pecar, J., *et al.* (2009). Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo*, 23:55–62.
- Kopke, M.A., Gal, A., Piripi, S.A., *et al.* (2021). Squamous Cell Carcinoma of the Anal Sac in Two Cats. *Journal of Small Animal Practice*, 62: 704–708. <https://doi.org/10.1111/jsap.13217>
- Korpan, N. N. (2012). Basics of cryosurgery. Springer Science & Business Media.
- Kotnik T, Pucihar G, Miklavcic D. (2010) Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *The Journal of Membrane Biology*, 236 (1):3–13. DOI: [10.1007/s00232-010-9279-9](https://doi.org/10.1007/s00232-010-9279-9)
- Kuflik, E. G. (1994). Cryosurgery updated. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31 (6): 925-944. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(94\)70261-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(94)70261-6)
- Kuflik, E. G., Gage, A. A. (1991). The five-year cure rate achieved by cryosurgery for skin cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 24(6): 1002-1004. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70160-4](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70160-4)
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., *et al.* (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*. Elsevier health sciences. ISBN: 9781455753406
- Kupanoff, P.A., Popovitch, C.A., Goldschmidt, M.H. (2006). Colorectal plasmacytomas: a retrospective study of nine dogs. *Journal of American Animal Hospital Association*, 42 (1):37-43. DOI: [10.5326/0420037](https://doi.org/10.5326/0420037).
- Lachowicz, J.L., Post, G.S., Brodsky, E. A. (2005). Phase I Clinical Trial Evaluating Imatinib Mesylate (Gleevec) in Tumor-Bearing Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19: 860–864. DOI: [10.1892/0891-6640\(2005\)19\[860:apicte\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19[860:apicte]2.0.co;2)
- Lana, S. E., Ogilvie, G. K., Withrow, S. J., *et al.* (1997). Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 33 (4): 329-332. DOI: [10.5326/15473317-33-4-329](https://doi.org/10.5326/15473317-33-4-329)
- Lanza, A., Baldi, A., Rossi, G., *et al.* (2019). Electrochemotherapy for the treatment of an incompletely excised subcutaneous low-grade epithelioid hemangioendothelioma in a budgerigar parakeet (*Melopsittacus undulatus*). *Open Veterinary Journal*, 9(3), 269-272.

- Lanza, A., Baldi, A., Spugnini, E. P. (2015). Surgery and electrochemotherapy for the treatment of cutaneous squamous cell carcinoma in a yellow-bellied slider (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246 (4), 455-457.
- LeBlanc AK, Atherton M, Bentley RT, et al. (2021) Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) following investigational therapy in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*;19(2):311–352. DOI: [10.1111/vco.12677](https://doi.org/10.1111/vco.12677).
- Lehnerdt, G., Schmitz, K. J., Dost, P., et al. (2005). Histological criteria and metastasis of squamous cell carcinoma of the pinna. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 84 (7): 482-486. DOI: [10.1055/s-2005-861017](https://doi.org/10.1055/s-2005-861017)
- Levinson, A.D., Oppermann, H., Levintow, L., et al. (1978). Evidence That the Transforming Gene of Avian Sarcoma Virus Encodes a Protein Kinase Associated with a Phosphoprotein. *Cell*, 15: 561–572. DOI: [10.1016/0092-8674\(78\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90024-7)
- Levy, J. K., Scott, H. M., Lachtara, J. L., et al. (2006). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American veterinary medical association*, 228(3), 371-376. DOI: [10.2460/javma.228.3.371](https://doi.org/10.2460/javma.228.3.371).
- Liotta, L. A., Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*, 411 (6835): 375-379. DOI: [10.1038/35077241](https://doi.org/10.1038/35077241)
- Little, S., Levy, J., Hartmann, K., et al. (2020). 2020 AAFP feline retrovirus testing and management guidelines. *Journal of feline medicine and surgery*, 22(1): 5-30. DOI: [10.1177/1098612X19895940](https://doi.org/10.1177/1098612X19895940)
- London, C. (2004). Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2: 177–193. DOI: [10.1111/j.1476-5810.2004.00059.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2004.00059.x)
- London, C., Mathie, T., Stingle, N., et al. (2012). Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10 (3): 194-205. DOI: [10.1111/j.1476-5829.2011.00275.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00275.x)
- London, C. A., Hannah, A. L., Zadovskaya, R., et al. (2003). Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clinical Cancer Research*, 9 (7): 2755-2768.
- London, C.A., Malpas, P.B., Wood-Follis, S.L., et al. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, 15: 3856– 3865. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-08-1860](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1860)
- Lowe, R., Gavazza, A., Impellizeri, J. A., et al. (2017). The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. *Veterinary and comparative oncology*, 15(3): 775-784. DOI: [10.1111/vco.12217](https://doi.org/10.1111/vco.12217)
- Lucas, R., Larsson, C. E. (2006). Crioterapia na clínica veterinária: avaliação da praticabilidade, e efetividade em carcinoma espinocelular de felinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43: 33-42. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26533>
- Lysa B., Tartler U., Wolf R. (2004). Gene expression in actinic keratosis: pharmacological modulation by imiquimod. *British Journal of Dermatology*, 151: 1150–1159. DOI: [10.1111/j.1365-2133.2004.06236.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06236.x)
- Macewen, E., Mooney, S.; Brown, N.O. et al. (1987). Management of feline neoplasms. En: Holzworth, J. (Ed). *Diseases of the Cat Medicine and Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 597-618.
- MacNeill, A. L. (2011). Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Topics in Companion Animal Medicine*, 2 6(2): 62-76. DOI: [10.1053/j.tcam.2011.02.004](https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.02.004)
- Madhusudan, S., Ganesan, T.S. (2004). Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Clinical Biochemistry*, 37: 618–635. DOI: [10.1016/j.clinbiochem.2004.05.006](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.006)

- Magden, E., Quackenbush, S. L., VandeWoude, S. (2011). FIV associated neoplasms—A mini-review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4): 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.016> [Get rights and content](#)
- Maglietti, F., Tellado, M., De Robertis, M., *et al.* (2020). Electroporation as the immunotherapy strategy for cancer in veterinary medicine: State of the art in Latin America. *Vaccines*, 8(3): 537. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030537>.
- Maglietti, F., Tellado, M., Olaiz, N., *et al.* (2016). Combined local and systemic bleomycin administration in electrochemotherapy to reduce the number of treatment sessions. *Radiology and Oncology*, 50 (1): 58–63. DOI: [10.1515/raon-2016-0015](https://doi.org/10.1515/raon-2016-0015)
- Marcellini, M., De Luca, N., Riccioni, T., *et al.* (2006). Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *The American Journal of Pathology*, 169(2): 643–654. DOI: [10.2353/ajpath.2006.051041](https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051041)
- Marconato, L. (2005). Chemioterapici utilizzati in medicina veterinaria. *En: Marconato L and Del Piero F (eds). Oncologi medica dei piccoli animali*. 1st ed. Milan: Poletto editore, 108–144.
- Marques, L. A. C. (1989). *Criocirurgia: nossa experiência* (Doctoral dissertation, Tese. Rio de Janeiro: Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1989.
- Martinez-Ruzafa, I., Dominguez, P. A., Dervisis, N. G., *et al.* (2009). Tolerability of gemcitabine and carboplatin doublet therapy in cats with carcinomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3): 570–577. DOI: [10.1111/j.1939-1676.2009.0279.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0279.x)
- Marty, M., Sersa, G., Garbay, J. R., *et al.* (2006). Electrochemotherapy—An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements*, 4(11): 3-13. DOI: [10.1016/j.ejcsup.2006.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.002)
- Mazaro, R. D., Lorenzetti, D. M., Leite, S. M., *et al.* (2023). Epidemiological, anatomopathological, and immunophenotypical aspects of cutaneous lymphomas in dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 43, 1-16.
- McBride, A.A. (2017). Oncogenic human papillomaviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732): 20160273. <https://doi.org/10.3390/v12010124>
- McDonnell, M. A., Abedin, M. J., Melendez, M., *et al.* (2008). Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29): 20149-20158. DOI: [10.1074/jbc.M802846200](https://doi.org/10.1074/jbc.M802846200)
- Meier, V., Polton, G., Cancedda, S., *et al.* (2017). Outcome in dogs with advanced (stage 3b) anal sac gland carcinoma treated with surgery or hypofractionated radiation therapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15 (3): 1073-1086. DOI: [10.1111/vco.12248](https://doi.org/10.1111/vco.12248)
- Melzer, K., Guscetti, F., Bley, C. R., *et al.* (2006). Ki67 reactivity in nasal and periocular squamous cell carcinomas in cats treated with electron beam radiation therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (3): 676-681. DOI: [10.1892/0891-6640\(2006\)20\[676:krinap\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[676:krinap]2.0.co;2)
- Merrick, C. H., Pierro, J., Schleis, S. E., *et al.* (2017). Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) toxicity in cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15 (3): 710-717. DOI: [10.1111/vco.12211](https://doi.org/10.1111/vco.12211)
- Miklavčič, D. (2012). Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 50: 1213–1225. DOI: [10.1007/s11517-012-0991-8](https://doi.org/10.1007/s11517-012-0991-8)
- Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., *et al.* (2014). Electrochemotherapy: From the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering OnLine*, 13: 29. DOI: [10.1186/1475-925X-13-29](https://doi.org/10.1186/1475-925X-13-29).

- Miklavčič, D., Pucihar, G., Pavlovec, M., *et al.* (2005). The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 65(2): 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.07.004>.
- Millanta, F., Asproni, P., Canale, A., *et al.* (2014). COX-2, mPGES-1 and EP2 receptor immunohistochemical expression in canine and feline malignant mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(3): 270–280. DOI: 10.1111/vco.12096.
- Mir, L.M., Devauchelle, P., Quintin-Colonna, F., *et al.* (1997). First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, 76: 1617-1622. DOI: 10.1038/bjc.1997.606
- Mir, L.M., Gehl, J., Sersa, G., *et al.* (2006). Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements*, 4(11):14-25. DOI:10.1016/j.ejcsup.2006.08.003.
- Mir, L.M., Glass, L.F., Serša, G., *et al.* (1998). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, 77 (12): 2336-2342. DOI: 10.1038/bjc.1998.388.
- Mitchell, B.L., Thamm, D.H., Biller, B.J. (2012). Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26: 355–362. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.00883.x
- Moore, A.S., Ogilvie, G.K. (2001). Skin tumors. Feline oncology- a comprehensive. Guide to Compassionate Care. *Veterinary Learning Systems*, 412-418.
- Moretti G, Dentini A, Beccati F, *et al* (2022). Palliative repeated electroporations of oral tumours in dogs: a case series. *Frontiers in Veterinary Science*: 1004811
- Morton, C., Horn, M., Leman, J., *et al.* (2006). Comparison of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy with cryotherapy or fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ: results of a multicenter randomized trial. *Archives of Dermatology*, 142 (6): 729-735. DOI: 10.1001/archderm.142.6.729
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., *et al.* (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62 (7): 743-750. DOI: 10.1292/jvms.62.743
- Murphy, S. (2013). Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15 (5): 401-407. DOI:10.1177/1098612X13483238
- Nevile, J. C., Hurn, S. D., Turner, A. G., *et al.* (2015). Management of canine corneal squamous cell carcinoma with lamellar keratectomy and strontium 90 plesiotherapy: 3 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 18(3): 254-260. <https://doi.org/10.1111/vop.12201>
- Nguyen, S. M., Thamm, D. H., Vail, D. M., *et al.* (2015). Response evaluation criteria for solid tumours in dogs, a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and comparative oncology*, 13(3), 176-183. DOI: 10.1111/vco.12032
- O'Connell, K. A., Okhovat, J. P., Zeitouni, N. C. (2018). Photodynamic therapy for Bowen's Disease (squamous cell carcinoma in situ) current review and update. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 24: 109-114. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.009
- Olmsted, G. A., Farrelly, J., Post, G. S., *et al.* (2017). Tolerability of toceranib phosphate (Palladia) when used in conjunction with other therapies in 35 cats with feline oral squamous cell carcinoma: 2009–2013. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19 (6): 568-575. DOI: 10.1177/1098612X16638118
- Omi, T., Nomano, K. (2014). The Role of the CO2 Laser and Fractional CO2 Laser in Dermatology. *Laser Therapy*, 23 (1): 49-60, DOI: 10.5978/islsm.14-RE-01

- Otterson, M. F. (2003). Sequelae of cryotherapy in breast tissue. *Cryobiology*, 47 (2): 174-178. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2003.09.002](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.09.002)
- Owen, L.N. (1980). TNM classification of tumours in domestic animals. World Health Organization. Geneva. VPH/CMO/80.20.
- Paczuska, J., Kielbowicz, Z., Nowak, M., *et al.* (2014). The carbon dioxide laser: an alternative surgery technique for the treatment of common cutaneous tumors in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56 (1): 1-4. DOI: [10.1186/1751-0147-56-1](https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-1)
- Parreira, I., Keglevich, S. (2005). As neoplasias em cães. *Enciclopédia Biosfera*, 1: 1-32.
- Patel, G. K., Yee, C. L., Terunuma, A., *et al.* (2012). Identification and characterization of tumor-initiating cells in human primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 132 (2): 401-409. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.317>
- Peaston, A. E., Leach, M. W., Higgins, R. J. (1993). Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202 (8): 1261-1265. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.1993.202.08.1261>
- Perez, J., Mozos, E., Martín, M. P., *et al.* (1999). Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with equine squamous cell carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 121 (4): 385-397. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0336>
- Peters-Kennedy, J., Scott, D. W., Miller Jr, W. H. (2008). Apparent clinical resolution of pinnal actinic keratoses and squamous cell carcinoma in a cat using topical imiquimod 5% cream. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (6): 593-599. DOI: [10.1016/j.jfms.2008.02.002](https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.02.002)
- Petter, G., Haustein, U. F. (1998). Squamous cell carcinoma of the skin-histopathological features and their significance for the clinical outcome. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 11 (1): 37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.1998.tb00951.x>
- Piegols, H. J., Takada, M., Parys, M., *et al.* (2018). Investigation of novel chemotherapeutics for feline oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 9 (69): 33098–33109. DOI: [10.18632/oncotarget.26006](https://doi.org/10.18632/oncotarget.26006)
- Pinard, C.L., Mutsaers, A.J., Mayer, M.N., *et al.* (2012). Retrospective study and review of ocular radiation side effects following external-beam Cobalt-60 radiation therapy in 37 dogs and 12 cats. *Canadian Veterinary Journal*, 53: 1301–1307. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3500122>
- Plumb, D.C. (2011). Veterinary drug handbook. 7th ed. Stockholm, WI: PharmaVet, 117–118.
- Polajzer, T., Jarm, T., Miklavcic, D. (2020). Analysis of damage-associated molecular pattern molecules due to electroporation of cells in vitro. *Radiology and Oncology*, 54: 317–328. DOI: <https://doi.org/10.2478/raon-2020-0047>.
- Poli, A., Abramo, F., Baldinotti, F., *et al.* (1994). Malignant lymphoma associated with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *Journal of comparative pathology*, 110(4), 319-328. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80309-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80309-X)
- Potanas, C.P., Padgett, S., Gamblin, R. M. (2015). Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005–2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246 (8): 877-884. DOI: [10.2460/javma.246.8.877](https://doi.org/10.2460/javma.246.8.877)
- Potočník, T., Miklavčič, D., Lebar, A. M. (2021). Gene transfer by electroporation with high frequency bipolar pulses in vitro. *Bioelectrochemistry*, 140: 107803. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107803>
- Prado, L., Rossetto, V., Carvalho, L., *et al.* (2017). Evaluation of the cryosurgery for treatment of squamous cell carcinoma in cats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69: 877-882. DOI: [10.1590/1678-4162-9060](https://doi.org/10.1590/1678-4162-9060)

- Probst, U., Fuhrmann, I., Beyer, L., *et al.* (2018). Electrochemotherapy as a new modality in interventional oncology: a review. *Technology Cancer Research & Treatment*. DOI: [10.1177/1533033818785329](https://doi.org/10.1177/1533033818785329).
- Pron, G., Belehradec, J. Jr., Mir, L.M. (1993). Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 194: 333-337. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1824>Get rights and content.
- Pucihar, G., Mir, L. M., Miklavčič, D. (2002). The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 57(2): 167-172. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00116-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00116-0).
- Racnik, J., Svara, T., Zadavec, M., *et al.* (2017). Electrochemotherapy with bleomycin of different types of cutaneous tumours in a ferret (*Mustela putorius furo*). *Radiology and oncology*, 52(1), 98.
- Racnik, J., Svara, T., Zadavec, M., *et al.* (2019). Electrochemotherapy with bleomycin in the treatment of squamous cell carcinoma of the uropygial gland in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 29, 217-221.
- Radzevičiūtė, E., Malyško-Ptašinskė, V., Kulbacka, J., *et al.* (2022). Nanosecond electrochemotherapy using bleomycin or doxorubicin: Influence of pulse amplitude, duration and burst frequency. *Bioelectrochemistry*, 148, 108251. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2022.108251](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108251).
- Ramos, S. C., Dias-Pereira, P., Luís, A. L., *et al.* (2024). Electrochemotherapy in dogs and cats—a review. *Veterinary and Comparative Oncology*; 22(3): 311-321. <https://doi.org/10.1111/vco.12980>
- Randall, E. K., Kraft, S. L., Yoshikawa, H., *et al.* (2016). Evaluation of 18F-FDG PET/CT as a diagnostic imaging and staging tool for feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14 (1): 28-38. <https://doi.org/10.1111/vco.12047>
- Raskin, R. E. (2015). Skin and subcutaneous tissue. *En: Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*, 34-90.
- Rathore, K., Alexander, M., Cekanova, M. (2014). Piroxicam inhibits Masitinib-induced cyclooxygenase 2 expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Translational Research*, 164 (2): 158-168. DOI: [10.1016/j.trsl.2014.02.002](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.02.002)
- Rawicka, A., Castra, M., Guandalini, A., *et al.* (2022). Conjunctival extramedullary plasmacytoma in dogs and a cat: Clinical characteristics and histopathological findings. *Animals* (Basel), 12 (21): 3015. doi: [10.3390/ani12213015](https://doi.org/10.3390/ani12213015).
- Ribatti, D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, 11 (3): 215-221. DOI: [10.1007/s10456-008-9114-4](https://doi.org/10.1007/s10456-008-9114-4)
- Ribeiro, R. C. S., Anjos, D. S., Pazzini, J. M., *et al.* (2023). Evaluation of cell proliferation and apoptosis markers as predictive factors for electrochemotherapy in cutaneous squamous cell carcinoma of cats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 43: e06518. DOI:[10.1590/1678-5150-PVB-6518](https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6518)
- Riedel, F., Götte, K., Schwalb, J., *et al.* (2000). Vascular endothelial growth factor expression correlates with p53 mutation and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Oto-Laryngologica*, 120 (1): 105-111. DOI:[10.1080/00016480060203334](https://doi.org/10.1080/00016480060203334)
- Rigel, D.S. (2008). Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *Journal of American Academic Dermatology*, 58: S129-132. DOI: [10.1016/j.jaad.2007.04.034](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.04.034)
- Rodríguez Guisado, F., Suárez-Bonnet, A., Ramírez, G.A. (2021). Cutaneous Spindle Cell Squamous Cell Carcinoma in Cats: Clinical, Histological, and Immunohistochemical Study. *Veterinary Pathology*; 58(3):503-507. DOI:[10.1177/0300985820985126](https://doi.org/10.1177/0300985820985126)

- Rogers, H.W., Weinstock, M.A., Feldman, S.R. (2015). Incidence Estimate of Non melanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the US Population. *Journal of American Academic Dermatology*, 151 (10):1081–1086. DOI:10.1001/jamadermatol.2015.1187
- Rogers, K. S. (1994). Feline cutaneous squamous-cell carcinoma. *Feline Practice*, 22(5): 7-9.
- Rook, K. A. (2019). Canine and feline cutaneous epitheliotropic lymphoma and cutaneous lymphocytosis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49(1), 67-81. DOI: 10.1016/j.cvsm.2018.08.007.
- Rubinsky, B. (2000). Cryosurgery. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2: 157-187. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.157>.
- Ruslander, D., KaserHotz, B., Sardinas, J. C. (1997). Cutaneous squamous cell carcinoma in cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19 (10): 373-381.
- Sadanaga, N., Kuwano, H., Watanabe, M., *et al.* (1994). Local immune response to tumor invasion in esophageal squamous cell carcinoma: The expression of human leukocyte antigen-DR and lymphocyte infiltration. *Cancer*, 74 (2): 586-591. DOI: 10.1002/1097-0142(19940715)74:2<586::aid-cncr2820740209>3.0.co;2-4
- Salim, A., Leman, J. A., McColl, J. H., *et al.* (2003). Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *British Journal of Dermatology*, 14 8(3): 539-543. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05033.x>
- Sánchez, G., Nova, J. (2013). Risk factors for squamous cell carcinoma, a study by the National Dermatology Centre of Colombia. *Actas Dermo-sifiliográficas*, 104: 672-678 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2015.12.008>
- Sardesai, N. Y., Weiner, D. B. (2011). Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Current Opinion in Immunology*, 23 (3): 421-429. DOI: 10.1016/j.coi.2011.03.008
- Schlueter, A., Hanot, C., Sellon, R., *et al.* (2025). Treatment of feline oral squamous cell carcinoma with accelerated radiation and carboplatin with and without follow-up toceranib phosphate. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 27(4). DOI: 10.1177/1098612X251314343.
- Schmidt, B., Glickman, N.W., DeNicola, A.E., *et al.* (2001). Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(11): 1783–1786. DOI: 10.2460/javma.2001.218.1783.
- Schmitz, L., Grinblat, B., Novak, B., *et al.* (2019). Somatic mutations in kinetochore gene KNSTRN are associated with basal proliferating actinic keratoses and cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33 (8): 1535-1540. DOI: 10.1111/jdv.15615
- Schon M., Bong A.B., Drewniok, C. (2003). Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *Journal of the National Cancer Institute*, 95: 1138–1149. DOI: 10.1093/jnci/djg016
- Sebbag, L., Pe'er, O. (2024). Marginal resection and infracyanine green-mediated photodynamic therapy in the management of feline eyelid squamous cell carcinoma: Two cases. *Veterinary Ophthalmology*, 27(4): 374-381. doi: 10.1111/vop.13193.
- Seldin, D. C., Landesman-Bollag, E., Farago, M., *et al.* (2005). CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 274: 63-67. DOI: 10.1007/s11010-005-3078-0
- Sequeira, I., Pires, M., Leitão, J. (2022). Feline oral squamous cell carcinoma: a critical review of etiologic factors. *Veterinary Sciences*, 9(10): 558. DOI: 10.3390/vetsci9100558
- Sersa, G., Cufer, T., Paulin, S., *et al.* (2012). Electrochemotherapy of chest wall breast cancer recurrence. *Cancer Treatment Review*, 38:379-386. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.07.006>

- Sersa, G., Jarm, T., Kotnik, T., *et al.* (2008). Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *British Journal of Cancer*, 98: 388-398. DOI: [10.1038/sj.bjc.6604168](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604168)
- Sersa, G., Teissie, J., Cemazar, M., *et al.* (2015). Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64:1315–1327. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1724-2>
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., *et al.* (2005). Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *The EMBO journal*, 24 (20): 3532-3542. DOI: [10.1038/sj.emboj.7600827](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600827)
- Showalter, C., (2020). The Abscopal Effect. RadOncoNews. <https://blog.radformation.com/the-abscopal-effect>.
- Siewert, J., Pellin, M. A., Husbands, B. D., *et al.* (2022). Feline cutaneous lymphoma: an evaluation of disease presentation and factors affecting response to treatment. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24(4): 389-397. DOI: [10.1177/1098612X211028837](https://doi.org/10.1177/1098612X211028837).
- Silván, U., Díez-Torre, A., Bonilla, Z., *et al.* (2015). Vasculogenesis and angiogenesis in nonseminomatous testicular germ cell tumors. En *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33 (6): 268-e17. DOI: [10.1016/j.urolonc.2015.01.005](https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.01.005)
- Simčič, P., Pierini, A., Lubas, G., *et al.* (2021). A Retrospective Multicentric Study of Electrochemotherapy in the Treatment of Feline Nasal Planum Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Sciences*, 8 (3): 53. <https://doi.org/10.3390/vetsci8030053>
- Skorupski, K. A., Alarcón, C. N., De Lorimier, L. P., *et al.* (2018). Outcome and clinical, pathological, and immunohistochemical factors associated with prognosis for dogs with early-stage anal sac adenocarcinoma treated with surgery alone: 34 cases (2002–2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 253 (1): 84-91. DOI: [10.2460/javma.253.1.84](https://doi.org/10.2460/javma.253.1.84)
- Sledge, D., Webster, J., Kiupel, M. (2016). Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal*, 215:43–54. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.003>.
- Smith, C. W., Chen, Z., Dong, G., *et al.* (1998). The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1a, IL-6, GM-CSF, and KC. *Clinical & Experimental Metastasis*, 16: 655-664. DOI: [10.1023/a:1006559811429](https://doi.org/10.1023/a:1006559811429)
- Smith K.J., Hamza S., Skelton H. (2004). Topical imidazoquinoline therapy of cutaneous squamous cell carcinoma polarizes lymphoid and monocyte/macrophage populations to a Th1 and M1 cytokine pattern. *Clinical and Experimental Dermatology*, 29: 505–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01593.x>
- Smith, W., DeWitt, D., Garavito, R. (2000). Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology”. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1): 145–182. DOI:[10.1146/annurev.biochem.69.1.145](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145)
- Snavely, N. R., Snavely, D. A., Wilson, B. B. (2010). Toxic effects of fluorouracil cream ingestion on dogs and cats. *Archives of Dermatology*, 146 (10): 1195-1196. DOI: [10.1001/archdermatol.2010.289](https://doi.org/10.1001/archdermatol.2010.289)
- Sonis, S. T., Elting, L. S., Keefe, D., *et al.* (2004). Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 100(S9), 1995-2025.
- Spugnini, E.P., Arancia, G., Porrello, A., *et al.* (2007). Ultrastructural modifications of cell membranes induced by "electroporation" on melanoma xenografts. *Microscopy Research and Technique*, 70:1041-1050. DOI: [10.1002/jemt.20504](https://doi.org/10.1002/jemt.20504)
- Spugnini, E.P., Baldi, A. (2019). Electrochemotherapy in veterinary oncology: state of the art and perspectives. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49(5): 967-979. DOI: [10.1016/j.cvsm.2019.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.006).

- Spugnini, E.P., Baldi, A., Vincenzi, B., *et al.* (2007). Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 59: 375-381. DOI: [10.1007/s00280-006-0281-y](https://doi.org/10.1007/s00280-006-0281-y)
- Spugnini, E.P., Citro, G., Mellone, P., *et al.* (2007). Electrochemotherapy for localized lymphoma: a preliminary study in companion animals. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 26, 343-346.
- Spugnini, E.P., Citro, G., Porrello, A. (2005). Rational design of new electrodes for electrochemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 24 (2): 245-254.
- Spugnini, E.P., Dotsinsky, I., Mudrov, N., *et al.* (2008). Successful rescue of a apocrine gland carcinoma metastatic to the cervical lymph nodes by mitoxantrone coupled with trains of permeabilizing electric pulses (electrochemotherapy). *In Vivo*, 22:51-54
- Spugnini, E. P., Dragonetti, E., Vincenzi, B., *et al.* (2006). Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma. *Melanoma Research*, 16 (1): 23-27. DOI:[10.1097/01.CMR.0000195702.73192.A0](https://doi.org/10.1097/01.CMR.0000195702.73192.A0)
- Spugnini, E.P., Filipponi, M., Romani, L., *et al.* (2007). Local control and distant metastasis after electrochemotherapy of a canine anal melanoma. *In Vivo*, 21:897-9.
- Spugnini, E.P., Gennaro, C., Baldi, G. (2009). Adjuvant electrochemotherapy in veterinary patients: a model for the planning of future therapies in humans. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28: 1-5. DOI: [10.1186/1756-9966-28-114](https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-114)
- Spugnini, E. P., Lanza, A., Sebasti, S. *et al.* (2018). Electrochemotherapy palliation of an oral squamous cell carcinoma in an African hedgehog (*Atelerix albiventris*). En *Veterinary Research Forum* (Vol. 9, No. 4, p. 379).
- Spugnini, E. P., Pizzuto, M., Filipponi, M., *et al.* (2015). Electroporation enhances bleomycin efficacy in cats with periocular carcinoma and advanced squamous cell carcinoma of the head. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29: 1368-1375. DOI: [10.1111/jvim.13586](https://doi.org/10.1111/jvim.13586)
- Spugnini, E. P., Porrello, A. (2003). Potentiation of chemotherapy in companion animals with spontaneous large neoplasms by application of biphasic electric pulses. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 22 (4): 571-580.
- Spugnini, E.P., Vincenzi, B., Amadio, B., *et al.* (2019). Adjuvant electrochemotherapy with bleomycin and cisplatin combination for canine soft tissue sarcomas: a study of 30 cases. *Open Veterinary Journal*, 9:88-93. DOI: [10.4314/ovj.v9i1.15](https://doi.org/10.4314/ovj.v9i1.15).
- Spugnini, E. P., Vincenzi, B., Baldi, F., *et al.* (2006). Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer Research*, 26 (6B): 4585-4589.
- Spugnini, E. P., Vincenzi, B., Citro, G., *et al.* (2009). Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: a preliminary report. *The Veterinary Journal*, 179 (1): 117-120. DOI: [10.1016/j.tvjl.2007.08.011](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.011).
- Spugnini, E.P., Vincenzi, B., Citro, G., *et al.* (2011). Evaluation of Cisplatin as an electrochemotherapy agent for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25:407-11. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0678.x>.
- Stanley, M.A. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential, *Clinical and Experimental Dermatology*, 27: 571-577. DOI: [10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x)
- Stell, A. J., Dobson, J. M., Langmack, K. (2001). Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. *Journal of Small Animal Practice*, 42(4): 164-169. DOI: [10.1111/j.1748-5827.2001.tb01796.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2001.tb01796.x)

- Supsavhad, W., Dirksen, W. P., Hildreth III, B. E., *et al.* (2016). p16, pRb, and p53 in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary Sciences*, 3 (3): 1-15. DOI: [10.3390/vetsci3030018](https://doi.org/10.3390/vetsci3030018)
- Suzuki, D. O., Berkenbrock, J. A., de Oliveira, K. D., *et al.* (2017). Novel application for electrochemotherapy: Immersion of nasal cavity in dog. *Artificial Organs*, 41 (8): 767-773. DOI: [10.1111/aor.12858](https://doi.org/10.1111/aor.12858)
- Tài, N. T., Ngàn, T. B. (2023). Advances in the Management and Treatment of Feline oral squamous cell carcinoma (FOSCC). *Journal of Humanities and Applied Science Research*, 6 (4): 1-13.
- Teifke, J. P., Löhr, C. V. (1996). Immunohistochemical detection of P53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 114 (2): 205-210. DOI: [10.1016/s0021-9975\(96\)80010-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80010-7)
- Teissie, J., Golzio, M., Rols, M. P. (2005) Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724 (3):270-280. DOI: [10.1016/j.bbagen.2005.05.006](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.006)
- Tejera-Vaquero, A., Descalzo-Gallego, M. A., Otero-Rivas, M. M., *et al.* (2016). Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107 (4): 318-328. DOI: [10.1016/j.ad.2015.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ad.2015.12.008)
- Tellado, M., Mir, L. M., Maglietti, F. (2022). Veterinary Guidelines for Electrochemotherapy of Superficial Tumors. *Frontiers in Veterinary Science*, vol 9., p. 868989. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.868989>
- Théon, A. P., Madewell, B. R., Shearn, V. I., *et al.* (1995). Prognostic factors associated with radiotherapy of squamous cell carcinoma of the nasal plane in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 206 (7): 991-996. <https://doi.org/10.2460/javma.1995.206.07.991>
- Théon, A. P., VanVechten, M. K., Madewell, B. R. (1996). Intratumoral administration of carboplatin for treatment of squamous cell carcinomas of the nasal plane in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 57 (2): 205-210. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1996.57.02.205>
- Théon, A.P., Wilson, W. D., Magdesian, K. G., *et al.* (2007). Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230 (10): 1506-1513. DOI: [10.2460/javma.230.10.1506](https://doi.org/10.2460/javma.230.10.1506)
- Thompson KG, Poll RR. (2002). Tumors of bones. Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. Fourth Ed. Iowa State Press, 259-261. ISBN 0-8138-2652-7.
- Thomson, M. (2007). Squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats and dogs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 2 2(2): 42-45. DOI: [10.1053/j.ctsap.2007.03.002](https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2007.03.002)
- Togashi, Y., Hayashi, H., Okamoto, K. *et al.* (2015): Chronic nicotine exposure mediates resistance to EGFR-TKI in EGFR-mutated lung cancer via an EGFR signal. *Lung Cancer*, 88: 16-23. DOI: [10.1016/j.lungcan.2015.01.027](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.01.027)
- Torres, J., Rodriguez, J., Myers, M. P., *et al.* (2003). Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (33): 30652-30660. DOI: [10.1074/jbc.M212610200](https://doi.org/10.1074/jbc.M212610200)
- Torrigiani, F., Pierini, A., Lowe, R., *et al.* (2019). Soft tissue sarcoma in dogs: A treatment review and a novel approach using electrochemotherapy in a case series. *Veterinary and Comparative Oncology*, 17 (3): 234-241. <https://doi.org/10.1111/vco.12462>
- Tortochaux, J., Tao, Y., Tournay, E., *et al.* (2011). Randomized phase III trial (GORTEC 98-03) comparing re-irradiation plus chemotherapy versus methotrexate in patients with recurrent or a second primary head and neck squamous cell carcinoma, treated with a palliative intent. *Radiotherapy and Oncology*, 100 (1): 70-75. DOI: [10.1016/j.radonc.2011.06.025](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.025)

- Tounekti, O., Pron, G., Belehradec, J. Jr., *et al.* (1993). Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Research*, 53: 5462-5469.
- Tozon, N., Kodre, V., Sersa, G., *et al.* (2005). Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Research*, 25:839-846.
- Tozon, N., Pavlin, D., Sersa, G., *et al.* (2014). Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: An observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16: 291–299. <https://doi.org/10.1177/1098612X13507071>
- Tozon, N., Sersa, G., Cemazar, M. (2001). Electrochemotherapy: potentiation of local tumor effectiveness of cisplatin in dogs and cats. *Anticancer Research*, 21: 2483-2488.
- Tozon, N., Tratar, U. L., Znidar, K., *et al.* (2016). Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (116), 54760. DOI: [10.3791/54760](https://doi.org/10.3791/54760).
- Tremble, L.F., O'Brien, M.A., Soden, D.M., *et al.* (2019). Electrochemotherapy with cisplatin increases survival and induces immunogenic responses in murine models of lung cancer and colorectal cancer. *Cancer Letters*, 442: 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.11.015>
- Trembley, J. H., Chen, Z., Unger, G., *et al.* (2010). Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy. *Biofactors*, 36 (3): 187-195. DOI: [10.1002/biof.96](https://doi.org/10.1002/biof.96)
- Treize, A. E. (2002). In vivo DNA electrotransfer. *DNA and Cell Biology*, 21 (12): 869-877. DOI: [10.1089/104454902762053837](https://doi.org/10.1089/104454902762053837)
- Truchuelo, M., Fernández-Guarino, M., Fleta, B., *et al.* (2012). Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: an observational and descriptive study in 51 lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26 (7): 868-874. DOI: [10.1111/jdv.14164](https://doi.org/10.1111/jdv.14164)
- Uribe, B. E., Londoño, A. M., Jiménez C., G., *et al.* (2017). Carcinoma escamocelular de piel de alto riesgo: definición, diagnóstico y manejo. *Medicina Cutánea Ibero Latino Americana*, 45 (1): 8-13.
- Urie, B.K., Russell, D.S., Kisseberth, W.C. (2012). Evaluation of Expression and Function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, Platelet Derived Growth Factor Receptors-Alpha and -Beta, KIT, and RET in Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma and Thyroid Carcinoma. *BMC Veterinary Research*, 8:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114198>
- Ursic, K., Kos, S., Kamensek, U., *et al.* (2018). Comparable effectiveness and immunomodulatory actions of oxaliplatin and cisplatin in electrochemotherapy of murine melanoma. *Bioelectrochemistry*, 119: 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.09.009>
- Vail, D. M., Withrow, S. J. (2007). Tumors of the skin and subcutaneous tissues. En: *Withrow, SJ; Macewen, EG Small Animal Clinical Oncology*, 4: 375-401.
- Valenti, P., Menicagli, F., Baldi, A., *et al.* (2021). Evaluation of electrochemotherapy in the management of apocrine gland anal sac adenocarcinomas in dogs: A retrospective study. *Open Veterinary Journal*, 11 (1): 100-106. DOI: [10.4314/ovj.v11i1.15](https://doi.org/10.4314/ovj.v11i1.15)
- Van Nimwegen, S. A., Bakker, R. C., Kirpensteijn, J., *et al.* (2018). Intratumoral injection of radioactive holmium (166Ho) microspheres for treatment of oral squamous cell carcinoma in cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16 (1): 114-124. DOI: [10.1111/vco.12319](https://doi.org/10.1111/vco.12319)
- VanVechten, M.K., Theon, A.P. (1993). Strontium-90 plesiotherapy for treatment of early squamous cell carcinoma of the nasal planum in 25 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 107:108. DOI: [10.1177/1098612X211038141](https://doi.org/10.1177/1098612X211038141)

- Vásquez, J. L., Gehl, J., Hermann, G. G. (2012). Electroporation enhances mitomycin C cytotoxicity on T24 bladder cancer cell line: a potential improvement of intravesical chemotherapy in bladder cancer. *Bioelectrochemistry*, 88: 127-133. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.08.001)
- Walder, E.J. (1995). Comparative aspects of nonmelanoma skin cancer. *Clinical Dermatology*, 13: 569-578. DOI: [10.1016/0738-081x\(95\)00060-s](https://doi.org/10.1016/0738-081x(95)00060-s)
- Waldman, A., Schmuls, C. (2019). Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Hematology Oncology Clinics*, 33 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.08.001>
- Weinberg, R.A. (2014). Growth Factors, Receptors, and Cancer. *En: The Biology of Cancer*; Garland Science, Taylor & Francis Group: New York, NY, USA, pp. 131–174.
- Weinstock, M. A., Thwin, S. S., Siegel, J. A., *et al.* (2018). Veterans Affairs Keratinocyte Carcinoma Chemoprevention Trial (VAKCC) Group. Chemoprevention of basal and squamous cell carcinoma with a single course of fluorouracil, 5%, cream: a randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association of Dermatology*, 154 (2): 167-174. DOI: [10.1001/jamadermatol.2017.3631](https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2017.3631)
- Weishaupt, K. R., Gomer, C. J., Dougherty, T. J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Research*, 36: 2326-2329.
- Werner, P. R., Werner, J., Daleck, C. R., *et al.* (2008). Oncologia em Cães e Gatos, 127: 5791-5801.
- Westman, M. E., Coggins, S. J., Van Dorsselaer, M., *et al.* (2022). Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management. *Australian Veterinary Journal*, 100(8), 345-359. DOI: [10.1111/avj.13166](https://doi.org/10.1111/avj.13166).
- Wiles, V., Hohenhaus, A., Lamb, K., *et al.* (2017). Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats with oral squamous cell carcinoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19 (2): 185-193. DOI: [10.1177/1098612X15622237](https://doi.org/10.1177/1098612X15622237).
- Willcox, J.L., Marks, S.L., Ueda, Y., *et al.* (2019). Clinical features and outcome of dermal squamous cell carcinoma in 193 dogs (1987-2017). *Veterinary Comparative Oncology*, 17 (2): 130-138. DOI: [10.1111/vco.12461](https://doi.org/10.1111/vco.12461)
- Willey, A., Mehta, S., Lee, P. K. (2010). Reduction in the incidence of squamous cell carcinoma in solid organ transplant recipients treated with cyclic photodynamic therapy. *Dermatologic Surgery*, 36 (5): 652-658. DOI: [10.1111/j.1524-4725.2009.01384.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2009.01384.x)
- Winkler, G.C., Barle, E.L., Galati, G., *et al.* (2014): Functional differentiation of cytotoxic cancer drugs and targeted cancer therapeutics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70: 46–53. DOI: [10.1016/j.yrtph.2014.06.012](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.06.012).
- Withrow, S. J. (1980). General principles of cryosurgical technique. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 10 (4): 779-786. DOI: [10.1016/s0195-5616\(80\)50079-3](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(80)50079-3)
- Withrow, S. J., Page, R., Vail, D. M. (2012). Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. Elsevier Health Sciences, 33: 749-752.
- Withrow, S. J., Straw, R. C. (1990). Resection of the nasal planum in nine cats and five dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 26 (2): 219-222. DOI: [10.1111/j.1748-5827.1990.tb00708.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1990.tb00708.x)
- Wouda, R. M., Borrego, J., Keuler, N. S., *et al.* (2016). Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14 (1): 67-80. DOI: [10.1111/vco.12068](https://doi.org/10.1111/vco.12068)
- Wright, Z., Rogers, K.S., Mansell, J. (2008). Survival data for canine oral extramedullary plasmacytoma: a retrospective analysis (1996-2006). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 44: 75-81.
- Wypij, J. M. (2013). A naturally occurring feline model of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology Research International*, 2013(1), 502197. DOI: [10.1155/2013/502197](https://doi.org/10.1155/2013/502197)

- Xing, Y., Li, H., Yuan, T., *et al.* (2025). Cryoablation in the treatment of early breast cancer: a comprehensive analysis. *Frontiers in Oncology*, 20;15:1469684. doi: 10.3389/fonc.1469684.
- Xu, L., Stevens, J., Hilton, M.B, Seaman, S., *et al.* (2014) “COX-2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models”. *Science Translational Medicine*, 6(242). DOI: 10.1126/scitranslmed.3008455
- Yager, J. A., Scott, D. W., Jubb, K. V. F., *et al.* (1993). En: *Pathology of Domestic Animals*, 3 (1): 27.
- Yamane, K., Kinsella, T. J. (2005). CK2 inhibits apoptosis and changes its cellular localization following ionizing radiation. *Cancer Research*, 65 (10): 4362-4367. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3941
- Yao, Y., Pan, Y., Chen, J., *et al.* (2007). Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 37 (1): 39-48.
- Yiu, W. K., Basco, M. T., Aruny, J. E., *et al.* (2007). Cryosurgery: a review. *International Journal of Angiology*, 16 (01): 1-6. <https://doi.org/10.1155/2013/502197>
- Yoshikawa, H., Ehrhart, E. J., Charles, J. B., *et al.* (2016). Assessment of predictive molecular variables in feline oral squamous cell carcinoma treated with stereotactic radiation therapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14 (1): 39-57. DOI: 10.1111/vco.12050
- Zaccone, R., Renzi, A., Chalfon, C., *et al.* (2022). Environmental risk factors for the development of oral squamous cell carcinoma in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36 (4): 1398-1408. DOI: 10.1111/jvim.16372
- Žagar, Ž., Schmidt, J. M. (2023). A Scoping Review on Tyrosine Kinase Inhibitors in Cats: Current Evidence and Future Directions. *Animals*, 13 (19): 3059. DOI: 10.3390/ani13193059
- Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., *et al.* (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372 (6508): 773-776. DOI: 10.1038/372773a0
- Zmigrodzka, M., Rzepecka A., Krzyzowska, M., *et al.* (2018). The cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway and its role in the pathogenesis of human and dog hematological malignancies. *Journal of Physiology and pharmacology*, 69(5). DOI: 10.26402/jpp.2018.5.01
- Zoran, D. L. (2005). Feeding tubes. En *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology* (pp. 288-296). BSAVA Library.
- Zouboulis, C. C. (1998). Cryosurgery in dermatology. *European Journal of Dermatology*, 8 (7): 466-474.

ANEXO

(I) RESEÑA DE LOS PACIENTES grupo 2 (Frecuencias edad, sexo, raza, capa)

Tabla 1: Estadísticos

EDAD

N	Válido	93
	Perdidos	0
Media		9,44
Desviación		4,156
Mínimo		2
Máximo		20

Tabla 2: Frecuencia y porcentajes de la edad (años)

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	2	2	2,2	2,2	2,2
	3	3	3,2	3,2	5,4
	4	4	4,3	4,3	9,7
	5	10	10,8	10,8	20,4
	6	7	7,5	7,5	28,0
	7	7	7,5	7,5	35,5
	8	8	8,6	8,6	44,1
	9	5	5,4	5,4	49,5
	10	15	16,1	16,1	65,6
	11	5	5,4	5,4	71,0
	12	8	8,6	8,6	79,6
	13	3	3,2	3,2	82,8
	14	4	4,3	4,3	87,1
	15	4	4,3	4,3	91,4
	16	1	1,1	1,1	92,5
	17	3	3,2	3,2	95,7
	18	1	1,1	1,1	96,8
	19	2	2,2	2,2	98,9
	20	1	1,1	1,1	100,0
	Total	93	100,0	100,0	

Tabla 3: Sexo de los gatos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Hembra	45	48,4	48,4	48,4
	Macho	48	51,6	51,6	100,0
	Total	93	100,0	100,0	

Tabla 4: Capa de los gatos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	blanco	23	24,7	24,7	24,7
	bicolor B/G	19	20,4	20,4	45,1
	bicolor B/N	27	29,0	29,0	74,1
	tricolor/calico	13	14,0	14,0	88,1
	crema	11	11,8	11,8	100,0
	Total	93	100,0	100,0	

Tabla 5: Localización de las lesiones carcinomatosas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
	plano nasal	51	54,8	54,8	54,8
	plano nasal, mejilla	1	1,1	1,1	55,9
	plano nasal, párpado, oreja	1	1,1	1,1	57,0
	plano nasal, orejas	3	3,2	3,2	60,2
	plano nasal, párpado, sienes	2	2,2	2,2	62,4
	plano nasal, labio, barbilla	1	1,1	1,1	63,4
	plano nasal, labio	4	4,3	4,3	67,7
	plano nasal, sienes	1	1,1	1,1	68,8
	orejas, sienes	4	4,3	4,3	73,1
	párpado, sienes	1	1,1	1,1	74,2
	labios	1	1,1	1,1	75,3
	auricular	4	4,3	4,3	79,6
	orejas, párpado	2	2,2	2,2	81,7
	párpado	8	8,6	8,6	90,3
	invasión nasal y bucal	2	2,2	2,2	92,5

ANEXO

párpado, mejilla	1	1,1	1,1	93,5
invasión auricular	1	1,1	1,1	94,6
barbilla	2	2,2	2,2	96,8
mandibular	3	3,2	3,2	100,0
Total	93	100,0	100,0	

Tabla 6: Casos diagnosticados con biopsias y/o citologías

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Biopsia y citología	13	14,0	14,0	14,0
	Biopsia	60	64,5	64,5	78,5
	Citología	20	21,5	21,5	100,0
	Total	93	100,0	100,0	

Tabla 7: Vías administración bleomicina en cada grupo del grado tumoral

		QUIMIOTERÁPICO USADO		
		Bleomicina IV	BL IV + intratumoral	Total
Grado tumor según OMS	Tumor < 2cm	22	3	25
	Tumor entre 2-5cm	20	11	31
	Tumor > 5cm	10	19	29
	Tumor invasivo	2	6	8
Total		54	39	93

Tabla 8: Respuestas según grado del tumor control post- EQT 30 días

Recuento

		CONTROL EQT 30 días					
		Eutanasia	Recuperación completa	Recuperación parcial	Enfermedad estable	Enfermedad progresiva	Total
Grado tumor	Tumor < 2cm	0	14	11	0	0	25
	Tumor entre 2-5cm	0	12	17	0	0	29
	Tumor > 5cm	2	4	19	2	1	28
	Tumor invasivo	1	2	5	3	0	11
Total		3	32	52	5	1	93

Tabla 9: Respuestas según grado del tumor control post-EQT 90 días

Recuento

		CONTROL EQT90 días					Total
		Eutanasia	Recuperación completa	Recuperación parcial	Enfermedad estable	Enfermedad progresiva	
Grado	Tumor < 2cm	0	22	1	0	1	24
	Tumor entre 2-5cm	1	19	0	2	4	26
	Tumor > 5cm	1	7	10	1	6	25
	Tumor invasivo	0	1	3	3	1	8
Total		2	49	14	6	12	83

Tabla 10: Respuestas según grado del tumor control post-EQT 180 días

Recuento

		CONTROL EN 180 DÍAS					Total
		Eutanasia	Recuperación completa	Recuperación parcial	Enfermedad estable	Enfermedad progresiva	
Grado	Tumor < 2cm	0	17	1	0	4	22
	Tumor entre 2-5cm	1	14	0	2	6	23
	Tumor > 5cm	1	5	3	2	7	18
	Tumor invasivo	1	1	0	3	1	6
Total		3	37	4	7	18	69

Tabla 11: control a los 30 días post-EQT con y sin Toceranib en tumores de alto grado

		CONTROL EQT 30 días					Total
		Eutanasia	Recuperación completa	Recuperación parcial	Enfermedad estable	Enfermedad progresiva	
Alto grado	TRATAMIENTO No recibieron Toceranib	3	5	13	1	1	23
	Recibieron Toceranib	0	1	11	4	0	16
Total		3	6	24	5	1	39

Tabla 12: control a los 90 días post-EQT con y sin Toceranib en tumores de alto grado

		CONTROL EQT 90 días					Total
		Eutanasia	Recuperación completa	Recuperación parcial	Enfermedad estable	Enfermedad progresiva	
TRATAMIENTO	Alto grado No recibieron Toceranib	0	5	6	2	4	17
	Recibieron Toceranib	1	3	7	2	3	16
Total		1	8	13	4	7	33

Tabla 13: control a los 180 días post-EQT con y sin Toceranib en tumores de alto grado

		CONTROL EQT 180 días					Total
		Eutanasia	Recuperación completa	Recuperación parcial	Enfermedad estable	Enfermedad progresiva	
TRATAMIENTO	Alto grado No recibieron Toceranib	1	2	1	3	4	11
	Recibieron Toceranib	1	4	2	2	4	13
Total		2	6	3	5	8	24

Tabla 14: Kaplan-Meier- Resumen de casos procesados según el grado del tumor

Bajo y alto grado	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
bajo grado	49	9	40	81,6%
alto grado	36	16	20	55,6%
Global	85	25	60	70,6%

Tabla 15: Medias para el tiempo de supervivencia según grado del tumor

Bajo y alto grado	Estimación	Desv. Error	Media ^a	
			Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
bajo grado	893,444	101,792	693,931	1092,957
alto grado	440,086	50,353	341,395	538,777
Global	736,559	74,603	590,338	882,781

a. La estimación está limitada al tiempo de supervivencia más largo, si está censurado.

Tabla 16: Resumen de procesamiento de casos con y sin toceranib

Bajo y alto grado	TRATAMIENTO con y sin		N de eventos	Censurado	
	Toceranib	N total		N	Porcentaje
bajo grado	No recibieron Toceranib	48	8	40	83,3%
	Recibieron Toceranib	1	1	0	0,0%
	Global	49	9	40	81,6%
alto grado	No recibieron Toceranib	21	7	14	66,7%
	Recibieron Toceranib	15	9	6	40,0%
	Global	36	16	20	55,6%
Global	Global	85	25	60	70,6%

Tabla 17: Medias para el tiempo de supervivencia

Tabla 17: Medias para el tiempo de supervivencia							
Alto grado	TRATAMIENTO con y sin Toceranib	Estimación	Desv. Error	Media ^a		Estimación	Desv. Error
				Intervalo de confianza de 95 %			
				Límite inferior	Límite superior		
alto grado	No recibieron Toceranib	421,261	54,320	314,794	527,728	542,000	141,339
	Recibieron Toceranib	435,947	73,768	291,362	580,532	300,000	255,516
	Global	440,086	50,353	341,395	538,777	349,000	200,737

a. La estimación está limitada al tiempo de supervivencia más largo, si está censurado.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis, la Dra. Otilia Ferrer, por ser mucho más que una guía académica. Su rigor científico, su visión clara y su compromiso inquebrantable han sido el faro de este trabajo, pero ha sido su calidad humana lo que más me ha sostenido. En los momentos de duda, cansancio o desaliento, cuando sentía que flaqueaba, ella fue quien tiró de mí con convicción, ternura y firmeza, recordándome el sentido de este camino que compartimos durante tantos años. Gracias, Otilia, por no soltarme nunca, incluso cuando yo ya no tenía fuerzas para seguir. Este logro también es tuyo.

Al Catedrático y Doctor J. Alberto Montoya, mi tutor, por ser mi ángel de la guarda cuando más lo necesitaba, siempre disponible, sin importar la hora ni el momento. Gracias por tu generosidad, tu compromiso incansable y por ser un referente ético y profesional para toda nuestra comunidad. Has sido, y sigues siendo, un verdadero embajador de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas en el mundo.

A Carlos, compañero de vida: gracias por amarme con esa mezcla de ternura y admiración que me eleva, por mirar lo que soy incluso cuando yo no lo veo, y recordármelo con gestos, palabras y silencios. Eres catapulta en mi vida: me impulsas, siempre con fe en mí y sin pedir nada a cambio. Gracias por elegirme cada día, por SER y ESTAR: mi HOGAR.

A mi madre, raíz firme del árbol del que vengo. Gracias por encarnar la fuerza, la ternura y la sabiduría de todas las mujeres que nos preceden. Esta tesis también es fruto de tu amor, tu ejemplo y tu manera única de enseñarme a florecer sin perder mi esencia.

A mi padre, mi mecenas silencioso. Gracias por tu generosidad constante, por estar siempre dispuesto a ayudar sin esperar nada a cambio. Tu apoyo discreto pero firme ha hecho posible cada paso de este camino. Tu amor, que nunca exige, ha sido una fuerza invisible que me ha dado alas en todo el camino.

A Sonia, profesional brillante y compañera de aventuras. Gracias por estar siempre detrás de mis pacientes, asegurándote de que no sintieran dolor y también por compartir viajes inolvidables, acumulando memorias que nos conectan con lo salvaje, con lo auténtico y con nosotras mismas.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros de profesión, gracias por las conversaciones que me devolvieron el aliento, por hacerme reír cuando más lo necesitaba y por recordarme, incluso en medio del caos, que la vida es mucho más que una tesis.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todos los veterinarios, tutores y a mis pacientes, que participaron en este proyecto, especialmente a aquellos que confiaron en el enfoque de la electroquimioterapia en momentos en los que era aún poco conocida.

Agradezco cada paso, cada persona y cada experiencia que me ha acompañado en este viaje. Hoy cierro una etapa, con la certeza de que el conocimiento no solo se escribe: también se vive.