**a)** **Identificação da proposta**

**Título do projeto:**

**USO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS FELINO EM ESTÁGIO AVANÇADO**

**Coordenador (a) do projeto: Carlos Eduardo Bezerra de Moura**

**Vice-coordenador: Genilson Fernandes de Queiroz**

**Instituição executora do projeto: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO**

**Resumo**

O Carcinoma de células escamosas (CCE) de felinos em estágio avançado se caracteriza por lesões ulcerativas, hemorrágicas e fétidas, comprometendo a qualidade de vida dos animais, sendo desafiador diante das opções de tratamento atualmente disponíveis. O plasma atmosférico frio (CAP) é comumente utilizado pela sua ação antimicrobiana e cicatrização, porém vem emergindo como um tratamento promissor no câncer, promovendo a morte seletiva de células cancerígenas por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Nosso grupo desenvolveu dispositivo de CAP obtido a partir de uma barreira de descarga dielétrica (DBD) destinado a aplicações biomédicas. O presente trabalho objetiva avaliar os efeitos do tratamento com CAP utilizando esse novo dispositivo sobre células tumorais em cultivo e em CCE de felinos em estágios avançados. Os queratinócitos e células de carcinoma serão obtidos a partir de biópsia de pele normal e do tumor de pacientes portadores de CCE atendidos no Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da UFERSA. As células serão expostas ao plasma por tempo e distâncias estabelecidos. O dano térmico provocado sobre as células em cultivo será avaliado pela medida da temperatura utilizando uma câmera de infravermelho. A morfologia, viabilidade, apoptose e propriedades biomecânicas celulares serão investigadas por microscópio eletrônico de varredura, ensaio de MTT, reação de TUNEL e microscopia de força atômica respectivamente. Para as análises *in vivo* serão incluídos no estudo gatos com CCE (estádios T3 ou T4) encaminhados ao Hospital Veterinário da UFERSA, cujas lesões serão tratadas com sessões de aplicações de plasma DBD. Para avaliar os efeitos desse tratamento, serão obtidas biópsias tumorais, antes e após o tratamento. Esses fragmentos de tecidos serão submetidos a processamento histológico e posterior análises histopatológicas, especialmente relacionadas à identificação e quantificação dos tipos celulares do estroma tumoral, expressão de fatores angiogênicos, pró-inflamatórios e proteínas de choque térmico. A remissão do tumor ao longo do tratamento será avaliada pela mensuração de sua área e os pacientes também serão acompanhados para determinar resposta a terapia e influência na qualidade de vida dos animais. Com os resultados dessa pesquisa, espera-se contribuir no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratamento de câncer.

**Palavras-chaves:** plasma, oncologia, cultivo celular, microscopia, felinos, cuidados paliativos

**b) Dados do proponente e equipe;**

**Coordenador:**

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura**

[**http://lattes.cnpq.br/4717410137206021**](http://lattes.cnpq.br/4717410137206021)

Médico Veterinário formado pela Universidade Federal Rural do Semi-árido - UFERSA (2001). Mestre em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP (2003). Doutor em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP (2007). Foi professor do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) no período de 2004 a 2015. Atualmente, é Professor Associado III do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). Nessa instituição exerce a função de líder do grupo de Pesquisas e Inovação em Estudos Morfofisiológicos - GPIEM. Tem experiência em morfofisiologia animal e biotecnologia, atuando principalmente nos temas morfologia animal, microscopia de luz e eletrônica, morfometria e biomateriais. Orienta pelos Programas de Pós-graduação em Ciência Animal, Ciências e Engenharia de Materiais da UFERSA e Biologia Estrutural e Funcional da UFRN. Membro de corpo editorial e parecerista de diversos periódicos nacionais e internacionais.

Responsabilidade no projeto: Coordenar, identificar e atuar proativamente sobre problemas e oportunidades; Escrever relatórios de progresso do projeto; Desenvolver o trabalho em equipe; Estabelecer comunicação efetiva e Orientação de alunos na execução do projeto.

 **Vice-coordenador:**

**Prof. Dr. Genilson Fernandes de Queiroz**

Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido, mestre e doutor em Medicina Veterinária na área de concentração de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais com ênfase em Oncologia Veterinária pela Universidade de São Paulo, pós-doutorado pela Universidade de Cambridge envolvido em um projeto para desenvolver terapia fotodinâmica como uma ferramenta para o tratamento de cânceres superficiais em espécies veterinárias bem como participação clínica na Unidade de Terapia do Câncer. Atualmente é professor Associado III do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, lecionando a disciplina Fisiologia Animal II. Coordena o projeto de extensão “Atendimento dos casos de oncologia em pequenos animais” no Hospital Veterinário e o projeto de pesquisa “Diagnóstico e tratamento em oncologia veterinária”. Participou do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal lecionando a disciplina Tópicos avançados em oncologia veterinária. Recentemente é responsável pela disciplina “Noções Aplicadas de Oncologia Veterinária” do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Cirurgia e oncologia, atuando principalmente nos seguintes temas: Cirurgia de tecidos moles, Oncologia clínica e cirúrgica, Terapia fotodinâmica, Criocirurgia, Técnicas de Anaplastia.

Responsabilidade no projeto: auxiliar na coordenação; Escrever relatórios de progresso do projeto; Desenvolver o trabalho em equipe; Estabelecer comunicação efetiva e Orientação de alunos na execução do projeto. Responsável pela execução das etapa 2 e 4 do projeto.

**Pesquisadores no Brasil:**

 **Prof. Dr. Clodomiro Alves Júnior**

Possui graduação em física pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (1978), mestrado e doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de São Carlos (1984 e 1994, respectivamente). Pós-doutorado na École des Mines, Nancy-França. Professor titular da UFRN, onde orientou 84 trabalhos de pós-graduação, sendo 59 dissertações e 25 teses. Foi presidente da Sociedade Latino-americana de Biomateriais, orgãos artificiais e Engenharia de tecidos (SLABO). Atualmente é Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq 1B e Pesquisador Visitante Sênior da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). Tem experiência na área de Engenharia de Materiais e Metalúrgica, com ênfase em Processamento de materiais por plasma, atuando principalmente nos seguintes temas: plasma atmosférico para aplicação na agricultura, ambiente e saúde.

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica da etapas 1: responsável pelo desenvolvimento de dispositivos de plasma e estabelecimentos dos parâmetros para tratamento das células e tumores. Orientação de alunos na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

**Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra**

Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará (1996), mestrado em Reprodução de Pequenos Ruminantes pela Universidade Estadual do Ceará (1998) e Doutorado em 2010 pela Universidade Estadual Paulista/FCAV- Campus de Jaboticabal, na área de Reprodução Animal. Atualmente é professor associado I da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Tem experiência na área Biotecnologia da Reprodução Animal, atuando principalmente com Transplantes Gonadais (autotransplantes e xenotransplantes) e Inovações em Reprodução de diferentes espécies animais.Coordena o Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais/ TRIMA-UFERSA). Leciona disciplinas correlatas à Biotecnologia da Reprodução Animal nos cursos de graduação em Medicina Veterinária, Zootecnia e Biotecnologia da UFERSA e já tendo lecionado disciplinas com foco em inovação em reprodução na Pós-graduação em Ciência Animal da UFERSA (PPCA/ 2013- atual), FCAV/UNESP (2018) e desde 2019 no Programa de Pós-Graduação em Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia para a Inovação (PROFNIT-UFERSA). Propõe-se a desenvolver atividades de orientação com focos especifico em Reprodução Animal no PPCA-UFERSA e com foco interdisciplinar no PROFNIT, promovendo neste a interface entre utilização de células ou animais com áreas médicas, tecnológicas ou humanas.

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica na etapa 1: ensaios *in vitro*. Orientação de alunos na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

**Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha**

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (1994), mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo (1998) e doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo (2002). Atualmente é professor Titular do departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Glicídeos, atuando principalmente nos seguintes temas: polissacarídeos sulfatados de algas (galactanas e fucanas); xilanas, glucanas, alginatos e quitosanas. Enfatizando a determinação das principais características estruturais desses compostos e a relação dessas com suas atividades e propriedades farmacológicas, biológicas e biotecnológicas. Coordena estudos da avaliação da atividade antioxidante, antiproliferativa e citotóxica de moléculas, partículas, etc. Desempenhou atividades como vice-chefe do Departamento de Bioquímica, como coordenador e vice-coordenador do programa de Pós-graduação em Bioquímica, ambos da UFRN, e como Secretario Regional adjunto da SBPC/RN. É o a atual coordenador do laboratório de cultivo de células de animais do Depto. de Bioquimica-UFRN. E o atual responsável pelo Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais - BIOPOL (UFRN) e representante da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) para o estado do Rio Grande do Norte.

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica na etapa 1: ensaios *in vitro*. Orientação de alunos na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

 **Profa. Dra. Naisandra Bezerra da Silva**

Possui graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) - pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN (2003), mestrado em Bioecologia Aquática pela UFRN (2004) e doutorado em Ciências da Saúde (UFRN). Atualmente é professora Associada II da disciplina histologia - UFRN e membro permanente do Programa de Pós Graduação em Biologia Estrutural e Funcional/UFRN. Tem experiência na área de Morfologia, com ênfase em Morfologia do tubo gastrintestinal animal, atuando principalmente nos seguintes temas: alimentação, reprodução, histologia, limnologia e ecologia. No momento desenvolve estudos com alterações teciduais gonadais ícticas provocadas por inseticidas; reparação tecidual associada ao diabetes; superfícies de biomateriais modificadas por plasma; cultivo celular e genotoxidade. Desenvolve seus projetos de pesquisa junto a base "Plasticidade Morfofuncional dos Sistemas Orgânicos" .

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica na etapa 3, especialmente nas avaliações histopatológicas, imunohistoquímica e TUNEL; Orientação de alunos na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

**Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira**

Possui graduação em ciências biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (1988), mestrado em Bioecologia Aquática pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (1998) e doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (2004). Atualmente é Bolsista Produtividade do CNPq D1, Professor Associado III do Centro de Ciências Agrárias - Departamento de Ciências Animais (DCA) e Orientador de mestrado e doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPCA da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Com expertise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica na etapa 3, especialmente nas avaliações de microscopia e imunohistoquímica. Orientação de alunos na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

 **Colaboradores no Exterior:**

 **Prof. Dr. Nelson Barrera**

Bioquímico em Pontificia Universidad Católica de Chile (1997). Mestre em bioquímica pela Pontificia Universidad Católica de Chile (1999). Doutor em ciências biológicas pela Pontificia Universidad Católica de Chile (2004). Pós-doutorado em Estrutura e Função de Proteínas de Membrana, Dinâmica Celular e Molecular. Atualmente, Professor do departamento de fisiologia – Faculdad de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica de Chile. Com expertise em estrutura e função das proteínas da membrana, particularmente, determinando as interações estruturais entre estas proteínas através de uma "*crosstalk*" molecular e celular. Esta área é multidisciplinar e pode incluir uma combinação de diferentes métodos incluindo o desenvolvimento de novas abordagens teóricas, estruturais e funcionais, podendo estar associada a Microscopia de Força Atômica (AFM).

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica na etapa 3, especialmente nas avaliações das propriedades biomecânicas das células neoplásicas tratadas; Orientação de alunos durante estágio na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

 **Apoio técnico**

**Dr. André de Macedo Medeiros**

Biomédico formado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e Mestre em Psicobiologia Fisiológica pela mesma instituição. Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Farmacologia pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pesquisador colaborador do Laboratório de Neurociência Comportamental (LANCOM), técnico de laboratório da área de biologia na Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) e professor das disciplinas de Imunologia Clínica e Farmacologia Básica da Faculdade de Enfermagem e Medicina Nova Esperança (FACENE). Desde 2007 vem desenvolvendo projetos científicos na área de neuroendocrinologia, estudando a relação de hormônios sexuais, estresse e memória em modelos animais, na área de neuropsicofarmacologia, pesquisando possíveis fatores relacionados as diferenças sexuais em doenças neurodegenerativas, com ênfase à Doença de Alzheimer e na área de processo saúde doença, investigando o impacto de fatores epidemiológicos em doenças na região do oeste potiguar.

Responsabilidade no projeto: Contribuir na abordagem metodológica na etapa 2; Orientação de alunos na execução do projeto; Contribuir na escrita e revisão das publicações.

**Doutorandos:**

 **Joelma Gomes da Silva**

Bacharel em Fisioterapia pela Universidade Estadual da Paraíba. Pós graduada em Fisioterapia Traumato - Ortopédica e Desportiva pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Mestre em Saúde e Sociedade, pela Universidade Estadual do Rio Grande do Norte. Doutoranda em ciências animais pela Universidade Federal Rural do Semiárido. Atualmente atua como Coordenadora do curso de Fisioterapia da Faculdade Nova Esperança de Mossoró/FACENE-RN, além de professora nas disciplinas de Introdução à Fisioterapia, Processos Morfofisiológicos e Processos fisiológicos e fisiopatológicos. Foi professora da Faculdade do Vale do Jaguaribe do curso de Fisioterapia nas disciplinas de Ergonomia para fisioterapeutas, Metodologia do trabalho científico, Fisioterapia aplicada a Neonatologia e Pediatria, Patologia e Cinesiopatologia Humana, Recursos fisioterapêuticos termofotosonoelétrico, Métodos e técnicas de pesquisa. Foi professora da Universidade Regional da Bahia nas disciplinas de Anatomia humana e Fisiologia humana.

Responsabilidade: desenvolvimento de tese de doutoramento sobre o uso de plasma atmosférico no tratamento de células de carcinoma felino.

**Luã Barbalho de Macêdo**

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (2013), Residência em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais (2014) e Mestrado na área de Ciência Animal pela UFERSA, com ênfase em Morfofisiologia Animal. Atualmente é doutorando no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UFERSA desenvolvendo pesquisas relacionadas a farmacocinética em animais domésticos.

Responsabilidade no projeto: auxiliar na execução das etapas 2 e 3: tratamento dos tumores e avaliações anatomopatológicas.

**Mestrandos:**

 **André Gustavo Alves Holanda**

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA (2019). Atualmente é mestrando em Ciência Animal pela UFERSA. Tem interesse em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais, principalmente nos seguintes temas: diagnóstico e tratamento em oncologia veterinária, cirurgia de tecidos moles em cães e gatos.

Responsabilidade: participação na execução das etapas 2 e 4 do presente projeto.

**Iniciação científica**

**Bruna Castro Cesário**

Iniciação científica, desenvolve projetos sobre uso do plasma DBD aplicado a superfícies metálicas para prevenção de crescimento bacteriano. Atualmente estudante de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, participa do programa PIVIC ligada ao projeto Osseointegração de superfícies metálicas tratadas em plasma a frio gerado em uma descarga de barreira dielétrica (DBD).

**Bruno Henrique Morais do Nascimento**

Iniciação científica, graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Desenvolve atividades de extensão e pesquisa vinculado ao projeto de pesquisa “Diagnóstico e tratamento em oncologia veterinária” e estágio no setor de cirurgia do Hospital Veterinário da UFERSA.

**Gabriel de Moura Martins**

Iniciação científica, desenvolveu projetos nas áreas de funcionalização de superfícies de biomateriais, Bioinformática e Bioquímica, atualmente estudante de Biotecnologia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Atualmente, bolsista PIBIC ligado ao projeto Efeito da nitretação de superfícies de titânio sobre a comunicação de células endoteliais para aplicação clínica.

**Lucas Morel**

Iniciação científica, graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Desenvolve atividades de extensão e pesquisa vinculado ao projeto de pesquisa “Diagnóstico e tratamento em oncologia veterinária”.

**c) Área(s) do conhecimento predominante(s);**

**50501070 CLÍNICA CIRÚRGICA ANIMAL**

**50501062 CLÍNICA VETERINÁRIA**

**50503022 ANATOMIA PATOLOGIA ANIMAL**

**d) Instituição(ões) participante(s);**

Universidade Federal Rural do Semi-árido/ UFERSA **– instituição executora**

**Instituições colaboradoras:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte/ UFRN

Pontificia Universidad Católica de Chile/ PUC-Chile

 **INTRODUÇÃO**

 O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna, que se desenvolve a partir do epitélio escamoso, acometendo comumente os felinos. A sua causa está associada à exposição crônica à luz ultravioleta, com maior incidência em áreas escassas de pelos e despigmentadas como orelhas, pálpebras, plano nasal e áreas temporais (MURPHY, 2013). Costuma ser agressivo localmente e pouco metastático (GRANDI; RONDELLI, 2016).

A capacidade invasiva desse tipo câncer está relacionada a invasão do tipo coletiva que envolve um grupo de células aderidas que se desconectam do tumor primário (FRIEDL et al., 2012). Além disso, as células cancerígenas invasivas exibem propriedades mecânicas altamente dinâmicas localmente e de forma sincronizada (ABDINE et al., 2018) sujeitas `remodelação constante (BU et al., 2019), sendo caracterizadas como complexos viscoelásticos que podem sofrer deformações durante a progressão tumoral, nos processos de invasão e metástases (MAK; ERICKSON, 2013). Atualmente, essas propriedades mecânicas de células neoplásicas vem sendo investigada por métodos de microscopia de força atômica, no intuito de averiguar a capacidade invasiva e metastática dos tumores (ZEMLA et al., 2018).

Os tratamentos disponíveis na oncologia veterinária visam o controle ou a remissão tumoral, bem como a evitar a metástase e preservar a qualidade de vida (MOORE, 2011). As opções terapêuticas mais comuns para o CCE são: excisão cirúrgica (DEMIRUTKU et al., 2012), criocirurgia (QUEIROZ; MATERA; DAGLI, 2008), eletroquimioterapia (SPUGNINI et al., 2015), radioterapia (BERLATO et al., 2018) e terapia fotodinâmica (QUEIROZ et al., 2016). A excisão cirúrgica é a forma mais bem sucedida de tratar lesões avançadas (T3, T4), no entanto para tumores maiores ou invasivos a reconstrução da área acometida pode ser desafiadora limitando-a em função do resultado estético desfigurador (MURPHY, 2013). Portanto, é importante desenvolver terapias que possam controlar a doença e melhorar a qualidade de vida de felinos com CCE cutâneo em estágio avançado, considerando que cuidados paliativos são medidas válidas de tratamento em oncologia (MASON, 2016).

O plasma atmosférico a frio (CAP) vem emergindo como um tratamento promissor no câncer que pode complementar o conjunto existente de modalidades de tratamento e, quando combinadas com outras terapias, aumentam sua seletividade e eficácia contra cânceres resistentes (SEMMLER et al., 2020; DAI et al., 2018). O CAP possui as vantagens de ser barato, rápido, de fácil aplicação e, esperançosamente, é uma alternativa confiável, quando comparado aos tratamentos convencionais, que além dos altos custos e efeitos colaterais aos tecidos saudáveis, muitas vezes tem resultados insatisfatórios (SAADATI et al., 2018).

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

Com o desenvolvimento do CAP para aplicações biomédicas, surgiu um novo campo, a “medicina de plasma”, que aliando conhecimentos da física, medicina e outras ciências da vida vem desenvolvendo e testado diferentes fontes e dispositivos de plasma com aplicações biomédicas (LAROUSSI, 2018). Em geral, esses dispositivos podem ser divididos naqueles de descarga direta (por exemplo, DBD: descarga de barreira dielétrica) e os dispositivos de descarga indireta (por exemplo, APPJ: jato de plasma de pressão atmosférica), sendo aqueles gerados em descarga de barreira dielétrica (DBD) mais amplamente utilizados em aplicações biomédicas (BERNHARDT et al., 2019).

Esses dispositivos de CAP vem demonstrando efeito anticancerígenos contra o osteossarcoma (TORNIN et al., 2019); câncer de pulmão (KARKI et al., 2019); linfoma (CHENG et al., 2019); glioblastoma (CHEN et al, 2017) câncer de pâncreas (VAN LOENHOUT et al., 2019) câncer de próstata (FOFANA et al., 2020), câncer colorretal (SCHNEIDER et al., 2018), câncer de mama (WANG et al., 2019) e o carcinoma de cabeça e pescoço (GUERRERO-PRESTON et al., 2014).

Os mecanismos anticâncer ocorrem principalmente devido a ação seletiva de células cancerígenas as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) produzidos pelo CAP. As RONS causam toxicidade celular dose dependente podendo resultar em necrose, apoptose, senescência, e autofagia reduzindo a adesão, proliferação e migração celular, inclusive desencadear uma resposta imune (SEMMLER et al., 2020).

As estimativas indicam que humanos, cães e gatos apresentam risco ao câncer de forma semelhante ao longo da vida, reforçando a hipótese de que observações sobre biologia e epidemiologia do câncer em animais de companhia podem ser extrapoladas diretamente para humanos (MODIANO, 2016). Dessa forma, é possível mesclar dados científicos oncológicos de humanos e veterinários beneficiando claramente o conhecimento do desenvolvimento, progressão e manejo do câncer (SCHIFFMAN; BREEN, 2015).

Assim, baseado em estudos prévios, a hipótese é que a aplicação de plasma frio atmosférico exerce efeito antineoplásico sobre CCE de felinos em estágio avançado contribuindo para o controle do câncer nesta espécie.

**Objetivo Geral:**

* Avaliar a eficácia do plasma frio atmosférico no tratamento do carcinoma de células escamosas felino em estágio avançado.

**Objetivos Específicos:**

* Investigar o efeito do plasma DBD sobre a viabilidade de queratinócitos e células tumorais de felinos;
* Avaliar o tratamento de CCE cutâneo com dispositivo de plasma DBD;
* Avaliar os efeitos da terapia com CAP sobre a temperatura das células em cultura e tumoral;
* Avaliar as propriedades viscoelásticas das células tumorais tratadas a plasma;
* Identificar efeitos adversos da terapia com CAP;
* Analisar a histopatologia das lesões tumorais tratadas;
* Mensurar a expressão de fatores angiogênicos, pró-inflamatórios e proteínas de choque térmico;
* Avaliar a qualidade de vida dos animais em tratamento;
* Classificar a resposta dos pacientes à terapia com CAP;
* Avaliar o tempo de sobrevida dos pacientes;

**METODOLOGIA**

Esse trabalho será realizado em quatro etapas (Figura 1). A etapa 1 consiste na avaliação *in vitro* do efeito do CAP sobre a viabilidade de queratinócitos e células tumorais de felinos. A etapa 2 corresponde ao ensaio *in vivo,* o tratamento do tumor com plasma DBD e sua influência sobre a temperatura tumoral. A etapa 3 envolve as análises histopatológicas e da expressão de fatores angiogênicos, pró-inflamatórios e proteínas de de choque térmico nas lesões tratadas e a etapa 4 diz respeito à avaliação do tratamento *in vivo* e acompanhamento dos pacientes.



Figura 1 – Organograma das etapas de execução do projeto

**Etapa 1 - Ensaios *in vitro***

**Dispositivo de plasma atmosférico a frio**

O dispositivo de plasma atmosférico obtido por barreira dielétrica (DBD) que será utilizado neste trabalho foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Plasma Aplicado à Agricultura, Saúde e Meio Ambiente do CITED – Centro Integrado de Inovação Tecnológica do Semiárido da Universidade Federal Rural do Semi-árido - UFERSA. O dispositivo de jato de plasma (Figura 2) consiste em um tubo de Vidro Borossilicato e um eletrodo de cobre em formato cilíndrico envolvendo o tubo externamente conectado à uma fonte de alimentação de alta tensão, como porta amostra o aparato experimental utiliza uma placa de cobre em potencial terra. Nos experimentos com as células, a tensão, a frequência de excitação e a taxa de fluxo de gás serão ajustadas para 0,8–1,2 kVrms, 35 kHz e 0,1 L / min, respectivamente. A distância entre o bico e o piso da placa de cultura será de 15 mm. Para os experimentos *in vivo*, a fonte de alimentação será ajustada tensão de 14 Kv, com frequência entre 100 e 400 Hz e potências dissipadas nas descargas de gás entre 167 a 237 mW. A distância entre o bico do tubo e a pele será de 1 a 2 mm. O argônio será escolhido como gás de arraste com uma vazão de 4 slm. O intervalo do comprimento da pluma de plasma será (22 ± 1) mm. Para determinar as características do plasma será utilizado um espectrômetro USB-4000 Oceano Optics usando uma fibra óptica colocada verticalmente perto da pluma de plasma, e o espectro obtido a partir do plasma será analisado.

Figura 2 - Esquema do dispositivo de plasma DBD.

Fonte: modificado de WU et al. (2016 )

**Obtenção dos queratinócitos e células do carcinoma de células escamosas**

Os queratinócitos e células de carcinoma utilizados neste trabalho serão obtidos a partir de fragmentos de pele normal e do tumor de pacientes portadores de CCE do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da UFERSA. As coletas serão realizadas por meio de biópsia incisional de 5mm², de quatro pacientes, durante procedimento cirúrgico de excisão do tumor, na rotina do Hospital e após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo A) pelo tutor que concordar em participar da pesquisa.

Após a coleta, o tecido será mantido, por máximo 1h, em tubos de centrífuga de 15 ML contendo solução de tampão fosfato e 1% de penicilina/estreptomicina até o processamento. O tecido será fragmentado em explantes, os quais serão submetidos ao cultivo em placas contendo DMEM/F12, suplementado com 10% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Mulgrave, Austrália). O material será acondicionando em a 38.5°C em câmara de CO2 a 6% por 7 dias. Em seguida, as células derivados do explante serão transferidas para frascos de cultura estéril, com fins de expansão no mesmo meio de cultura até atingir 70-80% de confluência, para posterior experimentos.

**Tratamento de CAP sobre células**

Para avaliar o efeito do tratamento de plasma sobre as células em cultivo, as células serão transferidas para placas de 12 poços e divididas em dois grupos: Grupo I (controle de crescimento) - células sem tratamento; Grupo II - células tratadas com plasma DBD, com tensão, a frequência de excitação e a taxa de fluxo de gás de 0,8–1,2 kVrms, 35 kHz e 0,1 L / min, respectivamente.

Antes do tratamento com plasma, os meios de cada poço serão completamente removidos, e uma pequena quantidade de DMEM sem soro ( cerca de 200 microlitros) será adicionada para manter as células úmidas durante o tratamento. As células serão expostas ao plasma por 10s em dez pontos designados por placa. A distância entre o bico do dispositivo de CAP a superfície da célula será de 15 mm.

**Efeito do CAP sobre temperatura das células em cultivo**

Para avaliar o dano térmico provocado pelo CAP sobre as células em cultivo será mensurada a temperatura das células antes e imediatamente após a aplicação do CAP pelos diferentes dispositivos utilizando uma câmera de infravermelho modelo FLIR SC620. A temperatura das células será mensurada em ambiente fechado cuja temperatura e umidade serão controlados por termo-higrômetro digital com captura de foto a uma distância de 50 centímetros do meio de cultura.

**Morfologia das células**

Para análise da morfologia celular, 5x104 células serão cultivadas sobre lamínulas de vidro por 24h, em seguida submetidas a tratamento por CAP conforme descrito no item anterior. Após tratamento, as célula serão fixadas as lamínulas com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (PBS), pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% por 2h. Após a pós-fixação, serão desidratadas em série crescente de alcoóis, e metalizadas com ouro. As imagens serão capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

**Proliferação/ viabilidade celular**

As células (5x104 células/ poço) serão cultivadas por 24h em placas de 12 poços, em triplicata. Depois de submetidas ao tratamento de CAP, será adicionada em cada poço 1mL de solução de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluído em meio de cultura. Após 3 h de incubação, os cristais de formazan produzidos pela redução do MTT serão dissolvidos pela adição de 1 mL de etanol P.A. (Reagente ACS ≥ 99,5%) em cada poço por 15 minutos sob agitação constante. Em seguida, 100 μL de cada poço serão transferidos para placas de cultura de 96 poços e quantificados por espectrofotometria de absorvância a 570 nm em um leitor de microplacas (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). Os valores de absorvância serão utilizados para determinar a porcentagem de células viáveis com base em uma curva padrão obtida pela cultura de três concentrações diferentes de células, em triplicado, em uma placa de 24 poços.

**Ensaio de TUNEL**

A fragmentação do DNA resultante da apoptose será avaliada com o kit de detecção de morte celular *in situ* (Fluoresceína-dUPT, Roche )**.** A reação de TUNEL marca preferencialmente quebras na fita de DNA geradas durante apoptoses, Isso permitirá discriminar apoptoses por necroses e por rupturas primárias da fita de DNA induzidas pela irradiação com plasma. As células serão colhidas por tripsinização após 48 horas de exposição ao plasma e depois fixadas com paraformaldeído a 1% em PBS por 20 min . Após a fixação, o ensaio TUNEL será realizado por seguindo as instruções do fabricante. A fluorescência verde emitida das células apoptóticas será quantificada por citometria de fluxo. Um total de 50.000 eventos serão adquiridos para cada poço tratado e dos controles no citômetro de fluxo (FACScan, BD Biosciences, San Jose, EUA). A intensidade de fluorescência de cada amostra será obtida por meio do software do próprio aparelho.

**Interação células neoplásicas**

As análises das propriedades biomecânicas das células neoplásicas tratadas com CAP realizadas em parceria com a Universidade Católica Pontífica do Chile (PUC-Chile). As células serão colocadas em superfícies metálicas para obtenção das imagens de microscopia de força atômica (AFM) para determinar propriedades biomecânicas da célula, como amortecimento, rigidez e viscoelasticidade em interação com a superfície. Para isso, as tips do cantilever do AFM funcionalizadas com células individuais se aproximarão da superfície para medir suas forças de adesão. Todos os experimentos serão realizados em condições fisiológicas com o objetivo de obter novos insights sobre a adesão de células tumorais tratadas com CAP.

 Imagem de microscopia de força atômica (AFM)

Em um AFM (Asylum Research, Santa Bárbara, EUA) serão utilizadas *tips* BL-TR400 (k = 0,01–0,05 Nm-1) (Olympus) com excitação direta via configuração IDrive para obter mapas de canal 3D. Os canais de deflexão (A0), amplitude (A1), fase (φ) e extensão piezo (altura) serão obtidos com uma amplitude alvo de 200mV e uma velocidade lateral de 10 μm/s. O valor Q (Qfar) será obtido a 5µm sobre a superfície e a fase será bloqueada a 90º. O ponto de contato da amostra será determinado pelo algoritmo bayesiano descrito anteriormente (Rudoy et al., 2010).

Determinação das propriedades viscoelásticas das células endoteliais via AFM

Propriedades viscoelásticas, como rigidez (k-sample), amortecimento (c-sample) e viscoelasticidade (loss tangente) serão determinadas através do protocolo descrito em Cartagena et al. (2014). Resumidamente, as diferentes propriedades podem ser obtidas de acordo com as seguintes equações, onde ωdr é a frequência de excitação cantilever.

$$csample=\left[\frac{sinsin φ\_{1} }{A\_{1}}-\frac{sinsin φ \_{1near}}{A\_{1near}}\right]\frac{kA\_{1far}}{Q\_{far}W\_{dr}}\sqrt{1-\frac{1}{4Q\_{far}^{2}}}$$

(equação 1)

$$ksample=\left[\frac{coscos φ\_{1} }{A\_{1}}-\frac{coscos φ \_{1near}}{A\_{1near}}\right]\frac{kA\_{1far}}{Q\_{far}}\sqrt{1-\frac{1}{4Q\_{far}^{2}}}$$

(equação 2)

$$loss tangent=\frac{csample \_{dr}}{ksample}$$

(equação 3)

 Funcionalização de AFM com uma célula

As *tips* AFM (BL-TR400PB com constante de mola k = 0.09N / m) serão limpas com HCl (37%), acetona e isopropanol durante 15min e depois lavadas com água milliQ. Em seguida, as tips serão incubadas primeiro com poli-L-lisina (1mg / mL em PBS) por 30min em temperatura ambiente e em segundo lugar com colágeno (20mg / mL em PBS) por 2h a 37 ° C. Posteriormente, as *tips* serão lavadas com PBS e armazenadas a 4ºC até o uso. Num poço de placa de cultivo, aproximadamente 1x103 células serão adicionadas em suspensão (Tyrode / tampão de glicose a pH 7,4) por 30 minutos até serem depositadas no fundo do poço. Posteriormente, o poço contendo as células será colocado no suporte da AFM com a *tip* quimicamente modificada. Após 10 minutos de incubação para evitar a deriva térmica, o AFM será colocado 2,5 mm sobre a superfície e, usando uma câmera CCD, uma célula específica será selecionada. Usando um tempo de aproximação de 0,5 mm / s e tempo de permanência de 120s, a célula será aderida à tip do AFM. Antes do experimento (interação célula – célula), a *tip* funcionalizada do AFM será mantida por 15min para estabilizar o sinal de deflexão (Zhang et al., 2004).

Força de adesão entre as células neoplásicas

A força de adesão da célula em interação será medida pela aproximação das curvas da tip em diferentes posições sobre a superfície metálica modificada e as forças serão avaliadas a uma velocidade de retração de 1000nm / s (Shahin et al., 2008).

**Etapa 2 - Ensaios in vivo**

**Princípios éticos**

A pesquisa será realizada após análise e aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) e a inclusão do animal no estudo está vinculada a autorização do tutor pela assinatura do termo de livre consentimento motivado.

**Animais e Critérios de inclusão**

Serão incluídos no estudo gatos com CCE (estádios T3 ou T4) encaminhados ao Hospital Veterinário da UFERSA, os quais não tenham indicação para serem submetidos à excisão cirúrgica no momento da avaliação clínica.

Os animais passarão por exame clínico (hemograma completo, perfil renal e hepático), radiografia de tórax e crânio e biópsia incisional para confirmação diagnóstica. O estadiamento tumoral será registrado de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980). O tamanho tumoral será obtido em centímetros por mensuração com paquímetro em três dimensões anteriormente às sessões com plasma. O volume tumoral será calculado de acordo com a fórmula do elipsóide: (comprimento x largura x profundidade x π/6).

**Tratamento com CAP**

Os pacientes serão submetidos a um ciclo que compreenderá três aplicações de plasma dentro de uma semana, seguido de uma semana sem exposição. A área do tumor será varrida com plasma por 1 min/cm² (METELMANN et al., 2015; METELMANN et al., 2018).

O dispositivo de plasma DBD será ajustado para pulsos de alta tensão 14 (Kv), com frequência entre 100 e 400 Hz e potências dissipadas nas descargas do gás entre 167 a 237 mW. O dispositivo ficará a uma distância de 1 a 2 mm da pele (DAESCHLEIN et al., 2013).

Os efeitos adversos do tratamento com CAP serão avaliados a cada sessão do tratamento e se presentes serão registrados de acordo com critérios estabelecidos pelo grupo de oncologia cooperativa veterinária (VCOG-CTCAE, 2016).

**Efeito do CAP sobre a temperatura tumoral**

A temperatura dos tumores será mensurada através de análise termográfica em ambiente fechado, com temperatura e umidade controlados por termo-higrômetro digital. As imagens digitais e termográficas serão capturadas antes e após a administração do CAP na primeira sessão a uma distância de 50 centímetros de distância do animal, através de uma câmera termográfica modelo FLIR SC620.

**Etapa 3 – Análises anatomopatológicas**

**Colheita dos tecidos**

As colheitas teciduais dos pacientes tratados com o plasma serão realizadas por meio de biópsias incisionais antes e após a terapia. Os procedimentos serão realizados no centro cirúrgico do Hospital Veterinário da UFERSA. Os pacientes deverão estar em jejum alimentar de 6 a 12 horas. Os gatos receberão acepromazina (0,1 mg/kg) e tramadol (2 mg/kg) como medicação pré-anestésica, ambos por via intramuscular. 15 minutos depois, será realizado acesso venoso periférico na veia cefálica com cateter calibre 22 para administração de fluidos (Solução de Ringer com Lactato 3 mL/kg/h). A anestesia será induzida com propofol (5-8 mg/kg ) por via intravenosa. Os animais serão submetidos a intubação orotraqueal e a anestesia será mantida com isoflurano diluído em oxigênio a 100%. Os pacientes serão monitorados quanto às frequências cardíacas e respiratórias, capnografia, eletrocardiografia, pressão sanguínea não invasiva e oximetria de pulso. Será realizada tricotomia e antissepsia do tumor e área circundante para que posteriormente os panos de campo sejam posicionados. Em seguida, será realizada incisão em cunha dos tumores, em condições estéreis. As amostras tumorais serão armazenadas em formaldeído tamponado 10% em proporção de 10 partes de formol para 1 parte de tecido. Todos os animais serão medicados após a intervenção com meloxicam (0,1 mg/kg) por via intravenosa.

**Avaliação histopatológica**

As avaliações histopatológicas serão realizadas antes e após o tratamento dos tumores. As amostras de tecido fixadas serão submetidas a processamento histológico padrão para inclusão em parafina. Seções seriais de 5 μm de espessura serão obtidas usando micrótomo. Para a análise descritiva microscópica de cada grupo, as secções serão coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para quantificação dos diferentes tipos celulares do estroma tumoral serão utilizadas as lâminas coradas com HE e quando necessário será utilizado corante específico para cada tipo celular. As células visualizadas em microscópio óptico serão identificadas de acordo com a forma e coloração específica quando necessário em fibroblastos/miofibroblastos, adipócitos, células epiteliais, imunes, vasculares e musculares lisas, sendo contadas em 15 campos por grupo usando objetiva de 40X. As colorações específicas para fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, endoteliais e musculares lisas serão tricrômico de Masson, azul do Nilo, azul de toluidina e ácido periódico de Schiff, respectivamente conforme protocolos descritos por Tolosa et al., (2003) e Siviero et al. (2013). Para determinação da densidade de volume de cada tipo celular será aplicado sobre cada imagem uma grade de 250 pontos, com auxílio do software analisador de imagens. A densidade de cada tipo celular será obtida a partir do número de pontos que toca a célula sobre o número de pontos totais da grade.

**Ensaio de tunel**

Os cortes histológicos serão desparafinizados em xilol, hidratados em série de etanol com concentrações decrescentes, lavados em água destilada e submetidos a coloração de TUNEL, utilizando o Kit de detecção de morte celular *in situ* (Fluoresceína-dUPT, Roche), conforme instruções do fabricante. A fluorescência verde emitida das células apoptóticas será detectada em microscópio de imunofluorescência. O DAPI será utilizado como contracoloração para identificar os núcleos das células pela coloração azul. As imagens de fluorescência obtidas serão utilizadas para quantificação da intensidade utilizando software analisador de imagem.

**Imunohistoquimica**

Cortes de 5μm serão preparados em micrótomo e depositados em lâminas silanizadas. Logo após, estas serão mantidas em estufa por um período de 6h, submetidos à sequência de imersão de desidratação em duas soluções de xilol por 10 minutos cada, depois imersas em soluções decrescentes de etanol em três soluções de álcool absoluto, uma a 95ºGL, uma a 80ºGL e uma de 70 ºGL por cinco minutos cada, e por fim, as amostras permaneceram em água destilada por mesmo tempo.

A recuperação antigênica será realizada por meio da imersão das lâminas em solução de citrato de sódio (pH 6,0) aquecidas em três sessões de 5 minutos (cada) em micro-ondas convencional em potência máxima (750W), evitando a fervura do material imerso. Após o resfriamento das amostras, o material será lavado em solução tampão de tris-triton (TBS - tris(hidroximetil)aminometano, pH 7,6 acrescido de 0,075% de Triton-X- 100) duas vezes e sob agitação, por 5 minutos cada lavagem.

Para o bloqueio das reações inespecíficas será utilizado 300 μL de solução de bloqueio (UltraCruz© Blocking reagente – SC 516214), diluído em 2,7 ml de TBS, gotejando sobre os cortes presentes na lâmina até cobri-los. As lâminas contendo os cortes serão armazenadas em câmara úmida por 120 minutos em temperatura ambiente. Seguindo-se com uma lavagem em solução tris-triton sob agitação, em duas séries de 5 minutos e secas com papel toalha.

Para a marcação da caspase-3, VEGF e TNF alfa diluídos em TBS conforme tabela abaixo:

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos que serão utilizados

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Anticorpos** | **Proteína Alvo** | **Código** | **Fabricante** |
|  *Anti-caspase 3*  | Caspase-3 | **CUSA-CSB-PA140280** | **Interprise** |
|  *Anti-VEGF* | VEGF | **BOST-PA1080** | **Boster Biological Technology** |
|  *Anti-TNF alpha*  | TNF alpha | **BOST-PA1054** | **Boster Biological Technology** |
|  *Anti- HSP70* | HSP-79 | **Ab2787** | **ABCAM** |

Logo em seguida, as lâminas serão colocadas em câmara úmida por 12 horas sob refrigeração. No dia seguinte, as lâminas serão lavadas com TBS e imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% por 15 minutos e em ambiente escuro, para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, todos os cortes serão incubados com solução contendo o anticorpo secundário biotinilado contra anticorpo de cabra (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP - AB205718), em câmara úmida por 60 minutos em temperatura ambiente e, novamente, lavadas em TBS. Em ambiente escuro, será instilada uma gota do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB) em cada secção, sendo imersas em água destilada após o tempo de cada hormônio (ARO – 60 segundos; Ando – 180 segundos; ERα – 120 segundos). As lâminas serão contra coradas em hematoxilina de Harris por 5 segundos e mergulhadas em álcool absoluto e xilol e, conseguinte, montadas com Permount® (Fisher Chemical). As reações positivas serão reconhecidas pela coloração vermelho amarronzadas, enquanto que as negativas, em tons mais suaves de marrom amareladas a coloração branca.

Os controles negativos envolveram a omissão da incubação com os anticorpos primários do procedimento. As secções serão fotomicrografadas com a utilização de microscópio de luz convencional com câmera acoplada (LEICA DM500) para captura de imagens da reação.

**Etapa 4 - Avaliação do tratamento *in vivo***

**Análise da qualidade de vida**

Os pacientes serão avaliados quanto à qualidade de vida, por meio de um questionário (ANEXO B) respondido por seus tutores 15 dias após o término da terapia. O estado de saúde no momento do preenchimento do questionário será comparado pelos tutores com o estado antes do tratamento (1 – pior; 3 – igual; 5 – melhor). O material será produzido conforme descrito por Lycnh et al (2010).

**Classificação da resposta à terapia**

Os pacientes serão avaliados após o término do tratamento, realizando-se estudo radiográfico da região tumoral, bem como classificação da resposta à terapia conforme estabelecido pelo consenso da associação do grupo de oncologia veterinária - RECIST-VCOG que é considerada completa – CR, quando não há tumor remanescente ou a completa epitelização da pele tratada, resposta parcial- PR, em caso de redução de mais de 30% do volume do tumor, doença estável – SD, quando há redução de menos de 30% do volume ou um aumento de até 20% do volume e doença progressiva – PD, quando há um aumento de mais de 20% no volume do tumor tratado, (NGUYEN et al., 2013).Os pacientes serão acompanhados mensalmente por meio de consultas e/ou ligações telefônicas.

**Análise estatística**

Os valores médios de temperatura antes e após o tratamento serão avaliados por meio do teste de Tukey. A taxa de efeitos adversos será avaliada em percentual, comparando o número de animais que apresentaram efeitos colaterais de acordo com o grau (VCOG-CTCAE, 2016), com o total de pacientes por grupo.A qualidade de vida será avaliada por meio de estatística descritiva básica, associada ao teste não-paramétrico U de Mann-Whitney, testando se houveram diferenças significativas entre o estado de saúde inicial e após a terapia, bem como entre os tipos de tratamento e as respostas à terapia (NGUYEN et al., 2013). A taxa de resposta à terapia será avaliada em percentual, comparando o número de pacientes que obtiveram CR ou PR com o total de pacientes por grupo. Os animais continuarão em acompanhamento e a sobrevida dos grupos será avaliada utilizando o *software* Kaplan Meier (SPSS versão 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados serão considerados significantes quando o valor de P for < 0,05.

**CRONOGRAMA**

|  |  |
| --- | --- |
| **Atividades** | **Período** |
| 2020 | 2021 | 2021 | 2022 | 2022 | 2023 | 2023 | 2024 |
| Jul-Dez | Jan-Jun | Jul-Dez | Jan-Jun | Jul-Dez | Jan-Jun | Jul-Dez | Jan-Jun |
| Revisão Bibliográfica | x | x | X | x | x | x | x | x |
| Obtenção de queratinócitos e células neoplásicas | x |   |   |   |   |   |   |   |
| Tratamento com CAP e análise termográfica *in vitro* | x | x | X | x | x | x | x | x |
| Avaliação da morfologia, proliferação e viabilidade celular  | x | x | X | x | x | x | x | x |
| Realização de ensaio TUNEL e interação células neoplásicas *in vitro* | x | x | X | x | x | x | x | x |
| Atendimento e seleção dos animais para tratamento | x | x | X | x | x | x | x |   |
|  Avaliação termográfica e de efeitos colaterais do CAP *in vivo*  | x | x | X | x | x | x | x |   |
| Avaliação da resposta à terapia e qualidade de vida dos pacientes | x | x | X | x | x | x | x |   |
| Ensaio TUNEL, histopatologia e imunohistoquimica dos tumores | x | x | X | x | x | x | x |   |
| Acompanhamento dos pacientes | x | x | X | x | x | x | x | x |
| Análise dos resultados parciais |   |   |   | x |   |   |   |   |
| Produção de resumos para congressos científicos |   |   |   | x |   |   |   |   |
| Publicação dos resultados parciais em revistas especializadas |   |   |   | x |   |   |   |   |
| Análise dos resultados finais |   |   |   |   |   |   |   | x |
| Relatório final |   |   |   |   |   |   |   | x |
| Publicação dos resultados finais em revistas especializadas |   |   |   |   |   |   |   | x |

**REFERÊNCIAS**

1. ABIDINE, Y. et al. Mechanosensitivity of Cancer Cells in Contact with Soft Substrates Using AFM. Biophysical Journal, v.114, p.1165-1175, 2018.
2. BAUER, G.; GRAVES, D. B. Mechanisms of Selective Antitumor Action of Cold Atmospheric Plasma-Derived Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Plasma Processes And Polymers, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1157-1178, 14 out. 2016.
3. BERLATO, D. et al. Response, disease-free interval and overall survival of cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with a fractionated vs a single-dose protocol of strontium plesiotherapy. Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 21, n. 4, p.306-313, 2018.
4. BERNHARDT, T. et al. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. Oxidative medicine and cellular longevity, 2019, 10p.
5. BINENBAUM, Y. et al. Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma**.** Plos One, [s.l.], v. 12, n. 1, 19 jan. 2017.
6. BU, Y. et al. Measuring Viscoelastic Properties of Living Cells. Acta Mechanica Solida Sinica, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 599-610, 19 jul. 2019.
7. CHEN, Z. et al. A Novel Micro Cold Atmospheric Plasma Device for Glioblastoma Both In Vitro and In Vivo. Cancers, [s.l.], v. 9, n. 12, p. 61-76, 30 maio 2017.
8. CHENG, F. et al. Cold Plasma with Immunomodulatory Properties Has Significant Anti-Lymphoma Activities in Vitro and In Vivo. Blood, [s.l.], v. 134, n. 1, p.5307-5307, 13 nov. 2019.
9. CHERNETS, N. et al. Reaction Chemistry Generated by Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Treatment is Responsible for the Tumor Eradication in the B16 Melanoma Mouse Model. Plasma Processes And Polymers, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 1400-1409, 12 out. 2015.
10. DAESCHLEIN, G. et al. Comparison between cold plasma, electrochemotherapy and combined therapy in a melanoma mouse model. Experimental Dermatology, [s.l.], v. 22, n. 9, p. 582-586, 16 ago. 2013.
11. DAESCHLEIN, G. et al. Treatment of recalcitrant actinic keratosis (AK) of the scalp by cold atmospheric plasma.Cogent Medicine, [s.l.], v. 4, n. 1, 6 dez. 2017.
12. DAI, X. et al. The emerging role of gas plasma in oncotherapy. Trends in biotechnology, v.36, n.11, p.1183-1198. 2018
13. DEMIRUTKU, A. et al. Pinnal squamous cell carcinoma in cats and the effectiveness of treatment with radical pinnectomy. Veterinární Medicína, v. 57, n. 8, p.420-429, 2012.
14. FOFANA, M. et al. Selective treatments of prostate tumor cells with a cold atmospheric plasma jet**.**Clinical Plasma Medicine, [s.l.], v. 17-18, p.1-9, mar. 2020.
15. FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol. v.14, p.777–783, 2012.
16. GAY-MIMBRERA, J. et al. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. Advances In Therapy, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 894-909, 3 maio 2016.
17. GILL, V. L. et al. Use of imiquimod 5% cream (Aldara ™) in cats with multicentric squamous cell carcinoma in situ: 12 cases (2002 – 2005). Blackwell Publishing Ltd**.** Hoboken, p. 55-64, 2008.
18. GOODFELLOW, M. et al. A retrospective study of 90Strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. Journal Of Feline Medicine & Surgery, [s.l.], v. 8, n. 3, p.169-176, jun. 2006.
19. GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. R. Neoplasias Cutâneas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Oncologia em Cães e Gatos. 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 26. p. 501-540. Versão: Ebook.
20. GUERRERO-PRESTON, R. et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. International Journal Of Molecular Medicine, [s.l.], v. 34, n. 4, p.941-946, 11 jul. 2014.
21. ISHAQ, M.; BAZAKA, K.; OSTRIKOV, K. Intracellular effects of atmospheric-pressure plasmas on melanoma cancer cells**.**Physics Of Plasmas, [s.l.], v. 22, n. 12, dez. 2015.
22. KARKI, S. B. et al. Miniature Non-thermal Plasma Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Lung Carcinoma Cells**.**Plasma Chemistry And Plasma Processing, [s.l.], v. 40, n. 1, p.99-117, 14 out. 2019.
23. Laroussi, M. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. Frontiers in Physics, v.8, n.74, 2020.
24. LIN, A. et al. Nanosecond-Pulsed DBD Plasma-Generated Reactive Oxygen Species Trigger Immunogenic Cell Death in A549 Lung Carcinoma Cells through Intracellular Oxidative Stress. International Journal Of Molecular Science**s**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 966-989, 3 maio 2017.
25. LYNCH, S. et al. Development of a questionnaire assessing health-related quality-of-life in dogs and cats with cancer. Veterinary And Comparative Oncology, [s.l.], v. 9, n. 3, p.172-182, 10 set. 2010.
26. MAK, M.; ERICKSON, D. A serial micropipette microfluidic device with applications to cancer cell repeated deformation studies. Integrative Biology, [s.l.], v. 5, n. 11, p. 1374-1384, 16 set. 2013.
27. MASON, S. Palliative care in small animal oncology**.**In Practice, [s.l.], v. 38, n. 5, p.203-217, maio 2016.
28. METELMANN, H. et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. Clinical Plasma Medicine, [s.l.], v. 9, p.6-13, mar. 2018.
29. METELMANN, H. et al. Head and neck cancer treatment and physical plasma. Clinical Plasma Medicine, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 17-23, jun. 2015.
30. MODIANO, J. Comparative Pathogenesis of Cancers in Animals and Humans. Veterinary Sciences, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 24-28, 13 set. 2016.
31. MOORE, A. S. Managing Cats with Cancer. Journal Of Feline Medicine And Surgery, [s.l.], v. 13, n. 9, p.661-671, set. 2011.
32. MURPHY, S. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Cat. Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 15, n. 5, p.401-407, 2013.
33. NGUYEN, S. M. et al. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. Veterinary And Comparative Oncology, v. 13, n. 3, p.176-183, 2013.
34. NISHIME, T. M. C. et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. Surface And Coatings Technology, [s.l.], v. 312, p.19-24, fev. 2017.
35. OWEN, L. N. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. Veterinary Public Health Unit & Who Collaborating Center for Comparative Oncology. 1980.
36. QUEIROZ, G. F. et al. Comparison of cryosurgery and photodynamic therapy for squamous cell carcinoma in two differents populations of cats. In: 3rd World veterinary cancer congress, 2016, Foz do Iguaçu. Proceeding of the veterinary cancer society, 2016.
37. QUEIROZ, G. F.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Clinical study of cryosurgery efficacy in the treatment of skin and subcutaneous tumors in dogs and cats. Vet. Surg., v.37, p.438-443, 2008.
38. SAADATI, F., MAHDIKIA, H., ABBASZADEH, H. et al. Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. Sci Rep v.8, 7689, 2018.
39. SAMAL, S. Thermal plasma technology: the prospective future in material processing: The prospective future in material processing. Journal Of Cleaner Production, [s.l.], v. 142, p. 3131-3150, jan. 2017.
40. SCHARF, C. et al. Improved Wound Healing of Airway Epithelial Cells Is Mediated by Cold Atmospheric Plasma: A Time Course-Related Proteome Analysis. Oxidative Medicine And Cellular Longevity, [s.l.], v. 2019, 16 maio 2019.
41. SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. : what dogs and other species can teach us about humans with cancer. Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences, [s.l.], v. 370, n. 1673, 19 jul. 2015.
42. SCHNEIDER, C. et al. Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells. Biological Chemistry, [s.l.], v. 400, n. 1, p. 111-122, 19 dez. 2018.
43. SCHUSTER, M. et al. Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer**.**Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery, [s.l.], v. 44, n. 9, p.1445-1452, set. 2016.
44. SEEBAUER, C. et al. Physical plasma in palliative cancer care: Introduction and perspectives. European Journal Of Molecular & Clinical Medicine, [s.l.], v. 1, p.28-28, 7 set. 2017.
45. SEO, H. Y. et al. Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air-or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma. PLoS One, Korea, v.9, n.11, nov.2014.
46. SEMMLER, M. L. et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. **Cancers**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 269-287, 22 jan. 2020.
47. SIVIERO, F. Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa. 1. Ed. São Paulo: Roca, 2013. 494 p.
48. SPUGNINI, E. P. et al. Electroporation Enhances Bleomycin Efficacy in Cats with Periocular Carcinoma and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 29, n. 5, p.1368-1375, 2015.
49. TOLOSA, E. M. C., et al. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 1. Ed. Manole, 2003. 341 p.
50. TORNIN, J. et al**.**Pyruvate Plays a Main Role in the Antitumoral Selectivity of Cold Atmospheric Plasma in Osteosarcoma**.**Scientific Reports, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13, 23 jul. 2019.
51. VAN LOENHOUT, J. et al**.**Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells**.**Cancers, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1597-1612, 19 out. 2019.
52. Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG‐CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. Vet Comp Oncol, 14: 417-446. 2016.
53. WANG, L. et al. The inhibition effect of cold atmospheric plasma-activated media in cutaneous squamous carcinoma cells**.**Future Oncology, [s.l.], v. 15, n. 5, p.495-505, fev. 2019.
54. WANG, M. et al. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. Plos One, [s.l.], v. 8, n. 9, 11 set. 2013.
55. WELTMANN, K. et al. The future for plasma science and technology. Plasma Processes And Polymers, [s.l.], v. 16, n. 1, 14 dez. 2018.
56. WU, S.; CAO, Y.; LU, X.. The State of the Art of Applications of Atmospheric-Pressure Nonequilibrium Plasma Jets in Dentistry.**Ieee Transactions On Plasma Science,** [s.l.], v. 44, n. 2, p. 134-151, fev. 2016.
57. ZEMłA, J. et al. Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 73, p. 115-124, jan. 2018.

**Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto**

 Quanto aos dispositivos de plasma atmosférico, da primeira etapa desse projeto, serão desenvolvidas no LabPlasma – Laboratório de processamento de materiais por plasma na UFERSA. O LabPlasma também dispõe de Moinho de bolas de porcelana; Moinho de bolas tipo planetário; Jogo de peneiras vibratórias; Granulômetro a LASER; Prensa hidráulica; Dilatômetro BP-Engenharia Mod. RB-115, até 1500\*C; Forno de Redução com atmosfera controlada; Forno de Sinterização a Vácuo e atmosfera controlada – 2000°C; Forno de Sinterização e Tratamento Térmico até 1700°C; Forno Mufla até 1200°C; Estufa Fanem 200°C; Balança Analítica; Capela; Ponte de Capacitância HP mod. 4262-A; Megôhmetro Eletrônica MI-1050; Lab. de preparação metalográfica (Cortadeira, lixadeira, politriz); Microscópio ótico com analisador de imagem; Microdurômetro; Laboratórios de Fluorescência e Difração de Raios-X; DTA, TGA e Absorção Atômica; Oficinas Mecânica e Eletrônica; Microscópio Eletrônico de Varredura; Equipamento de tratamento e revestimento de superfícies por plasma; espectrômetro de emissão ótica.

Quanto ao cultivo celular e ensaios in vitro da etapa 1, serão realizados no desenvolvida no laboratório de Multiusuário da UFERSA, Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais (TRIMA/ UFERSA) e Laboratório de Biopolímeros da UFRN. O Multiusuário da UFERSA possui equipamentos para realização das técnicas de cultivo celular e biologia molecular, a saber: Incubadora BOD Tecnal, Transiluminador Uv trans, Impressora matricial microline 320 turbo OKI, Destilador Quimis, Máquina de gelo Everest, Computador Philips, Homogeneizador Stomacher Marconi, Chapa aquecedora Solab SL-140/D, Banho maria Tecnal TE-0541/1, Centrífuga refrigerada Solab SL-701, Microcentrífuga refrigerada Mikro 220R Hettich, Destilador de água Tecnal TE-1782, Phmetro digital Kasvi K39-2014B, Balança de precisão Marte AY220, Agitador magnético Tecnal TE-0851, Cuba horizontal + Fonte de eletroforese Loccus Biotecnologia, Capela de exaustão de gases Sppencer Scientifica Termocicladores para PCR comum e Real-time PCR, fontes e cubas de eletroforese.

O Grupo da UFRN dispõe de: espectrofotômetros, centrífugas refrigeradas, ultra-centrífuga, liofilizadores, sistema FPLC AKTA, HPLC analítico, HLC preparativo, plataforma EGPfor. E uma sala de cultura de células, com incubadora de CO2, fluxos laminares, microscópio invertido, freezeres (- 20 °C e - 80). Estufas, coagulômetro, coletor de frações, bombas peristálticas, microcentrífuga não refrigerada, leitor de ELISA, autoclaves, eletroporador, banho-sonicador, mufla, purificador de água Thermo, seqüenciador Megabase 1000 (Amersham), termocicladores, Bioplex, aparelho para PCR em tempo real, citômetro de fluxo.

O TRIMA/ UFERSA possui área de 75m² dividido em quatro compartimentos com equipamentos para processamento de sêmen, seleção de oócitos e fecundação in vitro, cultivo de células e embriões, micromanipulacão de gametas e embriões As salas estão dispostas em sala de reuniões e triagem de material, sala para lavagem e esterilização, sala de micromanipulacão e análise de gametas e embriões, sala de docente. Dispõe de autoclave 120 litros, Estufa de esterilização, Microscópios Microscópio invertido, Lupas estereoscópica, Fluxo laminar horizontal, Placa aquecedora, Banho Maria, Centrífuga, Geladeiras, Incubadora de CO2, Computadores, Balança analítica 0.0001, Agitador magnético, Incubadora de ovos, Rack isolador para camundongos, Nikon, microscópio Nikon e200, botijão de nitrogênio líquido, balança analitica, estereomicroscopio Zeiss e equipamento BioStation IM-Q que incorpora um microscópio, uma incubadora e uma câmera CCD refrigerada de alta sensibilidade em um corpo compacto.

A avaliação da interação das células neoplásicas tratadas por CAP serão desenvolvidas em parceria com professor Nelson Barrera da Universidades Pontificia Universidad Católica (Chile). O professor Barrera dispõe de um laboratório com dois setores: O laboratório de cultura de células possui fluxo laminar, banho-Maria, balança analítica, microscópio de luz invertido, destilador de água miliQ; incubadora de CO2, centrífuga refrigerada, refrigeradores, câmara fria, refrigerador -80ºC, nitrogênio líquido. Já o laboratório de microscopia possui o microscópio de força atômica para avaliação de células vivas, com computador acoplado, cilindro de nitrogênio, refrigerador.

A etapa 2 será realizada no Hospital Veterinário da UFERSA que presta atendimento a população do Município de Mossoró e Região Oeste do Estado. O Hospital Veterinário dispõe de infraestrutura com Laboratório Clínico, Serviço de Diagnóstico por Imagem, Anestesiologia e Setor de Cirurgia os quais possuem técnicos habilitados que contribuirão para execução do projeto da forma mais segura o possível. Além da infra-estrutura e equipe técnica do Hospital Veterinário os membros envolvidos no projeto mantém parceria com diversos laboratórios de pesquisa os quais possibilitarão o intercâmbio de equipamentos para utilização no projeto a exemplo da disponibilidade da câmera termográfica.

A etapa 3 referente as avaliações histopatológicas, imunohistoquímicas e de TUNEL serão serão executadas no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada da UFERSA. O Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada conta com computadores, geladeiras, destilador, balanças de precisão, microscópios comuns, microscópio com sistema para captura de imagens, estereomicroscópio com sistema para captura de imagens estufas, capelas, micrótomo, equipamento de eletroforese, centrífuga refrigerada, liofilizador, agitadores, banho-maria, computador, microondas, entre outros. Além disso, conta com toda uma estrutura de armários para o adequado armazenamento de material diversos (reagentes, corantes, entre outros).

**ANEXO A**

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

**Título do projeto:**

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

**Nome do pesquisador principal:**

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

 **Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou:**

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

**Objetivos do estudo:**

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

 **Procedimentos a serem realizados com os animais:**

1. Os animais serão submetidos a coletas de sangue sempre que necessário para avaliação de parâmetros fisiológicos como protocolo de avaliação de risco anestésico/cirúrgico e/ou avaliação de complicações no decorrer do tratamento;

2. Será realizado biópsia do tumor antes de iniciar o tratamento e logo após o último ciclo de aplicações nos animais anestesiados cujo protocolo anestésico será definido pela equipe da anestesiologia;

3. Os animais serão fotografados com câmera digital e infravermelho para estudo termográfico antes e imediatamente após tratamento dos tumores na primeira sessão;

4. Tratamento do tumor com plasma a frio com duração de tempo de acordo com o tamanho do tumor. O tratamento completo compreenderá quatro ciclos de três aplicações em dias consecutivos com intervalo de uma semana sem exposição, entre eles.

 **Potenciais riscos para os animais:**

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

 **Cronograma:**

O projeto terá duração de 4 ano, com início em 07/2019 e térmico em 06/2024.

**Benefícios:**

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

**Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto**

 Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) anima(is) será o(a) Dr(a)\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_, inscrito(a) no CRMV sob o n°\_\_\_\_\_\_\_\_. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos: (84) 3317-8310.

Contato/Tel. de emergência:

1. Que os pesquisadores deixarão um canal de livre comunicação para que eu possa tirar dúvidas sobre cada uma das etapas do estudo e possíveis complicações;

2. Que poderei contar com a assistência do hospital veterinário da UFERSA, sendo responsável por ela o Dr. Genilson Fernandes de Queiroz e o médico veterinário André Gustavo Alves Holanda através do telefone (84) 3317-8310.

Equipe:

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

Endereço:

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

**Declaração de Consentimento**

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

 Mossoró/RN, \_\_\_\_ /\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Assinatura do Responsável Assinatura do Pesquisador

Responsável:

Nome:

Documento de Identidade: (quando aplicável):

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

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

|  |
| --- |
| **QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA** **PARA ANIMAIS EM TRATAMENTO DO CÂNCER** |
|  |  |  |  |  |  |
| Tutor:  | Tel.: | Data:  |
| Paciente: | Espécie: | Raça: | RG: |
|  |  |  |  |  |  |
| **Instruções**: Indique nas questões seguintes, através de um círculo, o número que melhor represente sua opinião quanto ao **ATUAL** estado de saúde do seu animal.  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Discordo** | **Indiferente** | **Concordo** |
|  |
|  **ALEGRIA** |
| Meu animal quer brincar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal reage a minha presença | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal demonstra estar satisfeito com seu estilo de vida | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **ESTADO MENTAL** |
| Meu animal tem mais dias bons que ruins | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal passa mais tempo dormindo que acordado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal parece aborrecido, deprimido ou apático | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **DOR** |
| Meu animal está sentindo dor | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal fica ofegante mesmo em repouso | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal apresenta tremores ocasionalmente | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **APETITE** |
| Meu animal come a quantidade habitual de comida | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal tem náuseas ou vômitos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal come petiscos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **HIGIENE** |
| Meu animal apresenta hábitos de limpeza e higiene | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal tem irritações na pele ou odor de urina | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal tem o pelo oleoso, emaranhado e áspero | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **HIDRATAÇÃO** |
| Meu animal bebe água em quantidade adequada | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal tem diarreia | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal urina em quantidade normal | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **MOBILIDADE** |
| Meu animal anda normalmente | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal permanece em um único lugar o dia todo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Meu animal mantém o mesmo nível de atividade de sempre | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|  **ESTADO GERAL DE SAÚDE** |
| Estado geral de saúde comparado à última avaliação | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   | **Pior** | **Igual** | **Melhor** |
| Estado geral de saúde comparado ao diagnóstico inicial do câncer | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|  | **Pior** | **Igual** | **Melhor** |
| Qualidade de vida atual | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|  |  **Péssima**  |  |  |  | **Excelente** |

**ANEXO B**