

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TUMORES HEPÁTICOS MALIGNOS PRIMÁRIOS
DE CÃES DA REGIÃO CENTRAL DO RIO
GRANDE DO SUL (1965-2012)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Martins Flores

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**TUMORES HEPÁTICOS MALIGNOS PRIMÁRIOS DE CÃES
DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL
(1965-2012)**

Mariana Martins Flores

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Rafael Figuera

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Martins Flores, Mariana
Tumores hepáticos malignos primários de cães da
Região Central do Rio Grande do Sul (1965-2012) /
Mariana Martins Flores.-2013.
43 f. ; 30cm

Orientador: Rafael Almeida Fighera
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. doenças de cães 2. oncologia 3. patologia 4.
tumores hepáticos 5. câncer de fígado I. Almeida Fighera,
Rafael II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TUMORES HEPÁTICOS MALIGNOS PRIMÁRIOS DE CÃES DA
REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL (1965-2012)**

elaborada por
Mariana Martins Flores

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão examinadora:

Rafael Almeida Figuera, Dr, UFSM
(Presidente/Orientador)

Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD, UFSM

Tatiana Mello de Souza, Dr, autônomo

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

À minha família, amigos e colegas pelo apoio e compreensão.

Aos pós-graduandos e estagiários do LPV pela amizade e contribuição na elaboração dessa dissertação.

Aos professores Glaucia Kommers, Claudio Barros e Luiz Francisco Irigoyen pela orientação e ensinamentos.

Ao meu orientador, Rafael Figuera, pela dedicação.

Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

TUMORES HEPÁTICOS MALIGNOS PRIMÁRIOS DE CÃES DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL (1965-2012)

AUTORA: MARIANA MARTINS FLORES

ORIENTADOR: RAFAEL FIGHERA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013

Os tumores hepáticos malignos primários (THMP) representam uma importante causa de morte de cães na rotina do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM). Diante disso, a prevalência e os aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos THMP em cães foram estudados. De 7.373 cães necropsiados entre 1965 e 2012 (48 anos), 64 morreram de THMP. Esse número corresponde a 0,9% das causas de morte de cães, 7,8% das causas de morte de cães por tumores em geral e 33,5% das causas de morte de cães por tumores hepáticos. Desses 64 casos de THMP, 51 foram revistos histologicamente e avaliados imuno-histoquimicamente, dos quais 46 eram carcinomas (colangiocarcinomas [n=36], carcinomas hepatocelulares [n=9] e hepatocolangiocarcinoma [n=1]) e cinco eram sarcomas (hemangiossarcomas [n=5]). Dos cães com colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares em que a idade estava disponível nos protocolos, 64,7% e 77,8% eram idosos, respectivamente. Na necropsia, colangiocarcinomas caracterizaram-se principalmente por ocorrerem em um padrão multinodular (83,3%), enquanto carcinomas hepatocelulares ocorreram tanto de forma massiva (44,4%) quanto multinodular (44,4%). Metástases extra-hepáticas foram vistas em 77,8% e 33,3% dos casos de colangiocarcinomas e carcinoma hepatocelulares, respectivamente, e em relação aos colangiocarcinomas afetaram principalmente pulmões (52,8%), linfonodos (50%) e peritônio (19,4%). Ascite (22,2%) e icterícia (22,2%) foram achados associados ocasionalmente com ambos os tumores. Na histologia, a maior parte dos colangiocarcinomas (86,1%) e dos carcinomas hepatocelulares (55,6%) tinha padrão tubular e trabecular, respectivamente. Na imuno-histoquímica, a maioria (63,9%) dos colangiocarcinomas demonstrou imunomarcagem para CK7 e nenhum imunomarcou para Hep Par 1. A maioria (55,6%) dos carcinomas hepatocelulares demonstrou imunomarcagem para Hep Par 1 e nenhum imunomarcou para CK7. Os resultados aqui apresentados demonstram uma alta prevalência de THMP, principalmente colangiocarcinomas, e servem para auxiliar, através dos achados de necropsia, histologia e imuno-histoquímica, patologistas veterinários no diagnóstico dessa forma tão comum de câncer em cães da Região Central do RS, Brasil.

Palavras-chave: Doenças de cães. Oncologia. Patologia. Tumores hepáticos. Tumores de fígado. Câncer hepático.

ABSTRACT

MS Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PRIMARY CANINE MALIGNANT HEPATIC TUMORS IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL (1965-2012)

AUTHOR: MARIANA MARTINS FLORES
ADVISER: RAFAEL FIGHERA
Santa Maria, February 25th, 2013

Primary hepatic malignant tumors (PHMT) represent an important cause of death of dogs at the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM). Based in this information, the prevalence and epidemiological and immunohistochemical aspects of PHMT were reviewed in dogs necropsied in a 48-year period (1965-2012). Out of those 7,373 dogs, 64 died due to PHMT, which corresponds to 0.9% of the dogs dying from any cause in the period; 7.8% of dogs which deaths were caused by tumors in general; and 33.5% of all dogs dying from hepatic tumors (primary and metastatic). Out of the 64 cases of PHMT, 51 were reviewed histologically and evaluated by immunohistochemistry; from these cases, 46 were carcinomas (36 cholangiocarcinomas, 9 hepatocellular carcinomas and one hepatocholangiocarcinoma) and five were sarcomas (5 hemangiosarcomas). In those dogs in which the age was possible determined, 64.7% (cholangiocarcinomas) and 77.8% (hepatocellular carcinomas) were old. At necropsy examination cholangiocarcinomas were characterized mainly by a multinodular pattern (83.3%) while hepatocellular carcinomas occurred both as massive (44.4%) or multinodular (44.4%) distribution. Extra-hepatic metastasis occurred respectively in 77.8% and 33.3% of the cases of cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas; metastatic cholangiocarcinomas affected mainly the lungs (52.8%), lymph nodes (50%) and peritoneum (19.4%). Ascites (22.2%) and icterus (22.2%) were observed frequently associated to both tumors. Histologically, most part of the cholangiocarcinomas (86.1%) and of the hepatocellular carcinomas (55.6%) presented respectively a tubular or trabecular type. Immunohistochemistry revealed that the majority (63.9%) of cholangiocarcinomas was positive for CK7 and none was marked for Hep Par 1. The majority (55.6%) of the hepatocellular carcinomas revealed positive reaction for Hep Par 1 and none was marked for CK7. The results presented here demonstrated a very high prevalence of PHMT, especially cholangiocarcinomas, in the dog. The necropsy, histological and immunohistochemical findings reported might be useful to help veterinary pathologists in the diagnosis of this common form of cancer in dogs of the Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: Diseases of dogs. Oncology. Pathology. Hepatic tumors. Liver tumors. Liver cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2.CAPÍTULO 1. Prevalência e achados epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores hepáticos malignos primários de cães da região central do Rio Grande do Sul (1965-2012)	17
Abstract	18
Resumo	19
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados	22
Discussão	26
Conclusões	32
Referências	32
3.REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Os diferentes tipos de tumores hepáticos malignos primários (THMP) podem emergir de virtualmente todos os componentes celulares do fígado: hepatócitos (carcinoma hepatocelular), epitélio dos ductos biliares (colangiocarcinoma), células do estroma (sarcomas) e células neuroendócrinas (carcinoide) (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; HEAD et al., 2003).

Há poucos dados disponíveis na literatura que nos permitam discorrer a respeito da real prevalência dos tumores hepáticos em animais, principalmente quando comparamos essa situação à medicina humana (CRAWFORD, 1999; CULLEN; POPP, 2002; JEMAL et al., 2011). Apesar disso, a maior parte da literatura considera os THMP como incomuns em cães, pois correspondem a menos de 1% do total de necropsias (STROMBECK, 1978; PATNAIK et al., 1980), e do total de neoplasmas (BASTIANELLO, 1983) desta espécie. Em contrapartida, metástases para o fígado são geralmente muito comuns (CULLEN; POPP, 2002), representando 79% (TRIGO et al., 1982) dos cânceres de fígado de cães.

O carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma são os THMP mais comuns em cães, representando 70% a 91% desses tumores nessa espécie (STROMBECK, 1978; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982; CULLEN; POPP, 2002). Carcinomas hepatocelulares, também conhecidos como “hepatomas”, embora essa denominação seja mais utilizada em medicina humana, são tumores originários de hepatócitos (MULLIGAN, 1949; PONOMARKOV; MACKEY, 1976; CRAWFORD, 1999; HEAD et al., 2003). Colangiocarcinomas, ou “adenocarcinomas dos ductos biliares”, por sua vez, emergem do epitélio dos ductos biliares intra-hepáticos (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; HEAD et al., 2003). O restante dos THMP inclui carcinoides (carcinomas de células neuroendócrinas), sarcomas e, em uma quantidade muito menor, hepatocolangiocarcinomas (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; PATNAIK et al., 1980; PATNAIK et al., 1981c; TRIGO et al., 1982; SHIGA et al., 2001; HEAD et al., 2003). A categoria dos sarcomas engloba tumores que emergem de células mesenquimais como endotélio (hemangiossarcoma e linfangiossarcoma), fibras musculares lisas (leiomiossarcoma), e fibroblastos (fibrossarcoma) (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982; HEAD et al., 2003). Hepatocolangiocarcinomas são um raro grupo de tumores hepáticos malignos constituídos concomitantemente das populações neoplásicas hepatocelular e epitelial biliar (CULLEN;

POPP, 2002). Há poucos casos de hepatocolangiocarcinomas relatados em cães (PATNAIK et al., 1980; PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982; SHIGA et al., 2001; AFIP, 2010).

Baseado em um número considerável de estudos (STROMBECK, 1978; PATNAIK et al., 1980; PATNAIK, 1981a; PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982; RAMOS-VARA et al., 2001), a maioria dos autores (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; CULLEN; POPP, 2002; HEAD et al., 2003; STALKER; HAYES, 2007) concorda que o carcinoma hepatocelular é o câncer hepático primário mais diagnosticado em cães. Patnaik et al. (1980) obtiveram uma relação de cerca de 71% *versus* 29% para carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas, respectivamente. Apesar disso, alguns autores (TRIGO et al., 1982) demonstram uma diferença menor na relação entre esses dois tumores (58% *versus* 42%). Em contrapartida, um pequeno número de trabalhos (MESSOW, 1952; ROONEY, 1959; BASTIANELLO, 1983) aponta o colangiocarcinoma como câncer hepático mais prevalente nessa espécie. Esses tumores chegaram a representar cerca de 87%, 69% e 57% dos THMP nos estudos de Messow (1952), Rooney (1959) e Bastianello (1983), respectivamente. Além destes três trabalhos citados anteriormente, realizados na Alemanha, Suécia e na África do Sul, respectivamente, não há estudos publicados que relatem uma maior prevalência de colangiocarcinomas em cães.

Ainda neste contexto, há poucos trabalhos que comparam a ocorrência de tumores primários e metastáticos no fígado de cães. Trigo et al. (1982) relatou que apenas 19% dos tumores hepáticos malignos que afetavam o fígado eram primários. Essa prevalência aumenta em casos em que THMP são mais comuns, por exemplo, no trabalho de Messow (1952), no qual 58% de todos os tumores hepáticos malignos eram primários.

Macroscopicamente, tumores hepáticos podem ser classificados nas categorias “multinodular/nodular”, “massivo” ou “difuso” (para carcinomas hepatocelulares) e “multinodular/nodular” ou “massivo” (para colangiocarcinomas) (CULLEN; POPP, 2002). A categoria “multinodular/nodular” é caracterizada por tumores na forma de nódulos focais ou multifocais e aleatórios (HEAD et al., 2003), e é a categoria mais comum para colangiocarcinomas (ROONEY, 1959; REHMTULLA, 1974; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). A categoria “massivo” é caracterizada por tumores na forma de massas, geralmente solitárias, mas ocasionalmente múltiplas, com distribuição aleatória (CULLEN; POPP, 2002; HEAD et al., 2003; STALKER; HAYES, 2007), e é a apresentação macroscópica mais comum para carcinomas hepatocelulares (MULLIGAN, 1949; ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). Na categoria “difuso”, são enquadrados casos em que o tumor afeta todo ou a maior parte do fígado e ocorre como aumento de

volume difuso acompanhado de mudanças na cor e consistência do parênquima afetado (CULLEN; POPP, 2002; HEAD et al., 2003; STALKER; HAYES, 2007). Essa forma de apresentação não ocorre em colangiocarcinomas (CULLEN; POPP, 2002) e é incomum para carcinomas hepatocelulares (PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). Para fins de classificação dos hemangiossarcomas em massa e nódulo, os critérios utilizados por Flores et al. (2012) foram: (1) nódulo é considerado como um aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito com 1 a 10 cm de diâmetro; e (2) massa é considerado como um aumento de volume sólido, irregular, não circunscrito e de qualquer tamanho ou como um aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito [nódulo], porém, com mais de 10 cm de diâmetro.

A apresentação clássica dos colangiocarcinomas é sob a forma de múltiplos nódulos branco-amarelados, firmes, umbilicados e aleatórios, frequentemente afetando todos os lobos hepáticos (ROONEY, 1959; REHMTULLA, 1974; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). A consistência firme e a cor esbranquiçada da maioria desses tumores deve-se à maior quantidade de colágeno no tumor e pode ajudar a diferenciá-los do carcinoma hepatocelular, que geralmente tem uma consistência macia (CRAWFORD, 1999; HEAD et al., 2003). Colorações esverdeadas, geralmente atribuídas ao acúmulo de pigmento biliar em meio ao tumor, são incomuns, visto que as células biliares neoplásicas não produzem bile (CRAWFORD, 1999). Alguns nódulos neoplásicos são denominados “umbilicados”, por apresentarem uma pequena depressão central atribuída a necrose (HEAD et al., 2003).

A apresentação macroscópica clássica dos carcinomas hepatocelulares é na forma de massas grandes e solitárias, frequentemente descritas como friáveis, macias ou amolecidas (MULLIGAN, 1949; ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). Essas características são atribuídas à pequena quantidade de colágeno e às grandes áreas de necrose presentes no tumor (HEAD et al., 2003). As massas neoplásicas podem afetar apenas um (PATNAIK et al., 1981b) ou mais de um lobo hepático (MULLIGAN, 1949). O lobo mais frequentemente afetado é o lobo lateral esquerdo (PATNAIK et al., 1981b). Carcinomas hepatocelulares podem variar entre marrons, amarelos, cinzentos ou esverdeados (MULLIGAN, 1949; ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). Áreas esverdeadas são geralmente atribuídas à produção de bile pelas células neoplásicas (CRAWFORD, 1999). É importante enfatizar que a ocorrência de carcinomas hepatocelulares na forma nodular e de colangiocarcinomas na forma massiva não é rara (PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982; HEAD et al., 2003). Portanto, a apresentação macroscópica é sugestiva, mas nunca deve ser usada para confirmar a origem do carcinoma hepático. Os raros

hepatocolangiocarcinomas relatados em cães na literatura são descritos como massivos (TRIGO et al., 1982; AFIP, 2010) ou nodulares (SHIGA et al., 2001).

Alguns estudos mais antigos citam casos ocasionais de cirrose hepática canina em associação com carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas (MULLIGAN, 1949; PONOMARKOV; MACKEY, 1976; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982). Em humanos, estima-se que 50% a 90% dos casos dos carcinomas hepatocelulares sejam associados à cirrose hepática (JEMAL et al., 2011). Isso ocorre principalmente porque na maioria dos casos a cirrose é fator predisponente ao desenvolvimento do tumor (CRAWFORD, 1999). O fato de cirrose ser um achado incomum em cães com THMP sugere que talvez a etiologia e/ou a patogênese dos neoplasmas hepáticos nessa espécie seja diferente da de humanos (PATNAIK et al., 1981b).

A aparência histológica dos carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas varia consideravelmente de acordo com o grau de diferenciação das células neoplásicas e arranjo do tumor (ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1981a; PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982). Colangiocarcinomas são tumores malignos formados por células epiteliais biliares neoplásicas, descritas como tendo um formato cuboide a colunar e com moderada quantidade de citoplasma, que varia de eosinofílico a levemente basofílico. Os núcleos são redondos a ovais, com cromatina frequentemente vesicular e estão localizados na região basal da célula (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; HEAD et al., 2003). Classicamente, colangiocarcinomas são constituídos de múltiplos lóbulos formados por estruturas tubulares, e separados uns dos outros por septos de tecido conjuntivo (PONOMARKOV; MACKEY, 1976). Alguns colangiocarcinomas demonstram áreas com aparência cística caracterizadas por acentuada dilatação tubular (PATNAIK et al., 1981a). Nesses casos, o tumor é chamado “cistadenocarcinoma” (CULLEN; POPP, 2002; HEAD et al., 2003). Outros colangiocarcinomas tornam-se acentuadamente atípicos a ponto de assumirem um padrão predominantemente sólido, com raras estruturas tubulares visíveis (CULLEN; POPP, 2002). Assim, podemos assumir que histologicamente os colangiocarcinomas podem ser separados em tubulares, císticos ou predominantemente sólidos.

A diferenciação dos colangiocarcinomas varia de alta (tumores predominantemente tubulares) a baixa (tumores predominantemente sólidos), passando por graus intermediários entre esses dois padrões (CULLEN; POPP, 2002; HEAD et al., 2003). Embora os tumores tubulares possam ser mais comuns (PATNAIK et al., 1981a), tumores com padrão predominantemente sólido ocasionalmente prevalecem (ROONEY, 1959, TRIGO et al., 1982). À medida que o grau de diferenciação diminui, os ácinos vão ficando irregulares, o

arranjo celular ocorre mais constantemente em pacotes, cordões e mantos sólidos, e as células neoplásicas tornam-se mais atípicas (ROONEY, 1959; PONOMARKOV; MACKEY, 1976; TRIGO et al., 1982; CULLEN; POPP, 2002). A ocorrência de áreas bem diferenciadas – e inclusive aparentemente benignas – na periferia ou em meio a um tumor pouco diferenciado é comum em colangiocarcinomas (PATNAIK et al., 1981a; TRIGO et al., 1982). Alguns autores interpretam essa mescla de áreas benignas e malignas como uma evidência de possível transformação neoplásica de uma área benigna (PATNAIK et al., 1981a), embora isto não seja comprovado (HEAD et al., 2003).

Embora a quantidade de estroma dos colangiocarcinomas seja variável (ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1981a; TRIGO et al., 1982), constantemente, esses tumores se caracterizam por ter uma marcada reação esfirrosa (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; CULLEN; POPP, 2002; HEAD et al., 2003). Em tumores com estroma abundante, o colágeno forma mantos que isolam grupos de células neoplásicas que formam ilhas tumorais em meio ao estroma (CULLEN; POPP, 2002). A grande quantidade de colágeno dá uma consistência firme aos colangiocarcinomas, diferenciando-os dos carcinomas hepatocelulares, que frequentemente têm consistência macia e/ou friável (HEAD et al., 2003). Mesmo em colangiocarcinomas pouco diferenciados, células gigantes multinucleadas e cariomegalia não são comuns (ROONEY, 1959; TRIGO et al., 1982). Em contrapartida, o alto grau de mitoses é uma característica frequente (PATNAIK et al., 1981a, TRIGO et al., 1982) e, por vezes, auxilia na diferenciação de colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares (HEAD et al., 2003).

A invasão de vasos linfáticos pelas células neoplásicas é raramente descrita de forma específica em estudos de colangiocarcinomas (ROONEY, 1959), embora o típico padrão de crescimento “invasivo” seja mencionado por muitos autores (CULLEN; POPP, 2002, HEAD et al., 2003; STALKER; HAYES, 2007). Esse comportamento agressivo das células neoplásicas vai ao encontro da alta capacidade metastática desses tumores (CULLEN; POPP, 2002). Constantemente, observam-se acúmulos de mucina – produzida pelas células neoplásicas – no interior dos ácinos tumorais. Esses acúmulos são particularmente comuns em cistadenocarcinomas, e chegam a formar “lagos” em meio ao tumor (REHMTULLA, 1974; PONOMARKOV; MACKEY, 1976; TRIGO et al., 1982). O acúmulo de bile geralmente não ocorre em colangiocarcinomas (ROONEY, 1959; TRIGO et al., 1982), uma vez que as células biliares não contribuem com a produção dessa substância (CRAWFORD, 1999), mas eventualmente pode ser visto no interior de ácinos tumorais (CULLEN; POPP, 2002). Áreas

de necrose e infiltrado inflamatório no tumor e parênquima hepático adjacente também podem ocorrer (HEAD et al., 2003).

Histologicamente, carcinomas hepatocelulares são constituídos de hepatócitos neoplásicos, descritos como tendo formato poligonal e moderada quantidade de citoplasma eosinofílico, que pode conter vacúolos atribuídos ao acúmulo de glicogênio e lipídeos. Os núcleos das células neoplásicas são centrais, redondos ou ovais, e frequentemente vesiculares (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; HEAD et al., 2003). Embora existam outras formas de separar os carcinomas hepatocelulares de acordo com o arranjo histológico (PATNAIK et al., 1981b), a classificação mais usada divide-os em três subtipos: “trabecular”, “adenoide” e “sólido” (HEAD et al., 2003). Alguns tumores podem apresentar mais de um subtipo histológico (PATNAIK et al., 1981b). O padrão trabecular é o mais comum em cães (MULLIGAN, 1949; ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982) e, em casos bem diferenciados, é o tumor que mais se assemelha ao tecido hepático normal (PONOMARKOV; MACKEY, 1976). Ele é caracterizado por células neoplásicas bem diferenciadas, organizadas em trabéculas irregulares, com uma espessura que varia de cinco a 20 camadas de células (HEAD et al., 2003). O padrão chamado “adenoide” é caracterizado por células organizadas em ácinos de tamanhos variáveis, frequentemente preenchidos por material proteináceo (HEAD et al., 2003). O padrão denominado “sólido” é marcado pela aparente falta de organização das células neoplásicas, que nesse caso, estão arranjadas em mantos. Com frequência, esse é o padrão menos diferenciado, com células marcadamente anaplásicas (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; HEAD et al., 2003).

As células neoplásicas dos carcinomas hepatocelulares podem variar de extremamente bem diferenciadas – assemelhando-se a hepatócitos normais – a altamente atípicas, tornando difícil reconhecer sua origem (PONOMARKOV; MACKEY, 1976). Células pouco diferenciadas caracterizam-se por apresentarem variações no seu formato (redondo, fusiforme, oval), e no tamanho e formato do núcleo, além de aumento da basofilia citoplasmática (CULLEN; POPP, 2002). De forma geral, células neoplásicas atípicas, bizarras, gigantes e multinucleadas são comuns em carcinomas hepatocelulares (PATNAIK et al., 1981b; HEAD et al., 2003). Mitoses são mais frequentes em tumores pouco diferenciados (ROONEY, 1959, PATNAIK et al., 1981b), embora tumores com alto grau de mitoses não sejam comuns (TRIGO et al., 1982).

A quantidade de estroma dos carcinomas hepatocelulares varia de escassa a acentuada, mas geralmente não é proeminente, principalmente em tumores trabeculares (ROONEY, 1959, PATNAIK et al., 1981b, TRIGO et al., 1982). Ocasionalmente (PATNAIK et al.,

1981b), são observados espaços vasculares dilatados (espaços cavernosos) nos carcinomas hepatocelulares que separam os agregados de células neoplásicas formando ilhas de diferentes tamanhos em meio às regiões de hemorragia. Esses espaços podem ser observados nos três subtipos do tumor (HEAD et al., 2003). O acúmulo de bile produzida pelas próprias células neoplásicas pode ser visto ocasionalmente nos canalículos biliares ou no citoplasma das células neoplásicas (ROONEY, 1959; PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982). Ductos biliares proliferados em meio aos hepatócitos tumorais (ROONEY, 1959) podem ocorrer como uma reação do fígado à agressão, e devem ser diferenciados de ductos neoplásicos (STALKER; HAYES, 2007).

Hepatocolangiocarcinomas são constituídos de duas variáveis histológicas: epitélio biliar e hepatócitos. Embora relatos desses tumores sejam raros em cães (PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982; SHIGA et al., 2001; AFIP, 2010), sabe-se que as características histológicas de cada uma das populações neoplásicas que compõe os hepatocolangiocarcinomas são semelhantes ao que já foi descrito anteriormente para carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas, respectivamente (CULLEN; POPP, 2002). Dependendo da forma de classificação do hepatocolangiocarcinoma, as duas populações celulares do tumor podem estar separadas em massas distintas (TRIGO et al., 1982) ou juntas na mesma massa tumoral (PATNAIK et al., 1981b; SHIGA et al., 2001; AFIP, 2010). Nesse último caso, áreas de transição entre as duas populações neoplásicas podem ou não estar presentes (PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982; SHIGA et al., 2001; AFIP, 2010).

A classificação dos tumores hepáticos quanto à sua origem histológica é de interesse não só para patologistas, mas também para clínicos veterinários. Em primeiro lugar, porque os alguns subtipos de tumores apresentam comportamentos biológicos distintos (PATNAIK et al., 1980). Carcinomas hepatocelulares, por exemplo, têm uma menor probabilidade de metastatizar, ao contrário de colangiocarcinomas (PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982; CULLEN; POPP, 2002). Em segundo lugar, porque cada tipo de tumor hepático é mais comumente associado a uma determinada apresentação macroscópica (PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982), o que influencia no prognóstico do paciente, visto que tumores massivos e solitários são mais facilmente retirados cirurgicamente quando comparados a tumores nodulares e múltiplos (CULLEN; POPP, 2002). Com base nesses dois parâmetros (comportamento biológico e apresentação macroscópica), os carcinomas hepatocelulares são mais frequentemente relacionados a um melhor prognóstico, visto que frequentemente atingem tamanhos grandes antes de metastatizar e apresentam-se mais comumente sob a forma de massas solitárias (PONOMARKOV; MACKAY, 1976; PATNAIK et al., 1981b;

TRIGO et al., 1982). Colangiocarcinomas, por sua vez, são geralmente associados a um prognóstico reservado a desfavorável, por terem uma maior taxa de metástases e por apresentarem-se mais comumente sob a forma nodular, frequentemente afetando todos os lobos hepáticos (PONOMARKOV; MACKEY, 1976; HEAD et al., 2003). Além desses fatores, a subclassificação histológica dos carcinomas hepatocelulares também parece ter relação com o prognóstico (PATNAIK et al., 1981b), embora esse fato não seja verdadeiro para a subclassificação de colangiocarcinomas (PATNAIK et al., 1981a).

Há alguns anos, a imuno-histoquímica tem sido aplicada no auxílio ao diagnóstico de tumores hepáticos de cães. De las Mulas et al. (1995) foram pioneiros ao aplicar a técnica a carcinomas hepáticos de cães, testando a imunoreatividade de alguns carcinomas para alfa-feto proteína (AFP), antígeno carcinoembriônico (CEA), citoqueratina e vimentina. O anticorpo para AFP demonstrou baixa sensibilidade e alta especificidade para carcinomas hepatocelulares, enquanto o marcador para CEA foi específico e sensível para colangiocarcinomas, embora o número de tumores testados tenha sido pequeno. O padrão de marcação de carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas para citoqueratina e vimentina foi variável.

O uso recente de Hepatocyte Paraffin 1 (Hep Par 1) em cães demonstrou alta especificidade e sensibilidade para hepatócitos normais, hiperplásicos e neoplásicos (RAMOS-VARA et al., 2001). No estudo anteriormente citado, a marcação das células com este anticorpo demonstrou um padrão citoplasmático, disseminado e granular. Apesar de Ramos-Vara et al. (2001) não terem observado nenhuma relação entre os graus de diferenciação celular e a sensibilidade do Hep Par 1, esta relação é relatada em humanos, uma vez que alguns tumores pouco diferenciados não marcam para o anticorpo (CHAN; YEH, 2010).

O uso de citoqueratinas (CK) em geral (DE LAS MULAS et al., 1995), incluindo CK7 (MONTEROS et al., 1999; RAMOS-VARA et al., 2001), já foi aplicado em estudos de THMP de cães. Tais estudos com CK7 demonstraram uma sensibilidade que variou de 67% (MONTEROS et al., 1999) a 77,7% (RAMOS-VARA et al., 2001) para colangiocarcinomas, e uma especificidade que chegou a 100% (RAMOS-VARA et al., 2001), embora MONTEROS et al. (1999) tenham demonstrado que esse anticorpo possa ocasionalmente marcar carcinomas extra-hepáticos. O padrão de marcação para CK7 foi caracterizado por Ramos-Vara et al. (2001) como “desuniforme”, com algumas células fortemente marcadas, e outras, não. Além disto, nesse trabalho, a marcação foi mais intensa na região adjacente à membrana plasmática e, por vezes, na região perinuclear.

Apesar de alguns carcinomas hepáticos apresentarem um padrão de marcação aberrante para CK's e Hep Par 1 (RAMOS-VARA et al., 2001), e de alguns carcinomas extra-hepáticos demonstrarem marcação positiva para CK7 (MONTEROS et al., 1999) e, raramente, para Hep Par 1 (RAMOS-VARA et al., 2001), o uso associado desses dois anticorpos foi eficiente na diferenciação de carcinomas hepáticos de cães (RAMOS-VARA et al., 2001). Provavelmente, a associação desses dois anticorpos seja a melhor forma de diferenciar carcinomas hepáticos com auxílio da imuno-histoquímica, visto que a maioria dos colangiocarcinomas é positiva para CK7, enquanto a positividade para Hep Par 1 é observada em grande parte dos carcinomas hepatocelulares (RAMOS-VARA et al., 2001).

Como já vimos, os dados a cerca da prevalência de THMP em medicina veterinária são escassos, e não há fatores de risco comprovadamente envolvidos no desenvolvimento espontâneo desses tumores (CULLEN; POPP, 2002). Diferentemente, em humanos, a prevalência de câncer hepático no mundo é conhecida e monitorada a cada ano, e a ocorrência da doença já foi relacionada a numerosos fatores de risco (CRAWFORD, 1999; JEMAL et al., 2011). O carcinoma hepatocelular é o tumor maligno mais comum em humanos, constituindo aproximadamente 90% dos casos de câncer hepático primário (CRAWFORD, 1999). Essa alta prevalência de carcinomas hepatocelulares contribui para a posição do câncer hepático de humanos como sexto neoplasma mais comum e terceira maior causa de morte associada a câncer no mundo (JEMAL et al., 2011). Apesar de ser considerado incomum em condições normais, o carcinoma hepatocelular tem uma alta prevalência em países expostos ao seu principal fator de risco: a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) (CRAWFORD, 1999; JEMAL et al., 2011). Conseqüentemente, a distribuição global desse tumor em humanos está relacionada à prevalência do HBV, que é notavelmente maior na África e sudeste da Ásia (CRAWFORD, 1999). Os carcinomas hepatocelulares não associados à infecção por HBV são mais comuns no oeste europeu e América do Norte. Nesses casos, os fatores predisponentes mais comuns são cirrose alcoólica e cirrose por outros agentes, como o vírus da hepatite C (HCV) (CRAWFORD, 1999; JEMAL et al., 2011). Alguns autores citam a aflatoxina como fator de risco para o desenvolvimento de CHC em países em desenvolvimento (MING et al., 2002). Colangiocarcinomas são neoplasmas muito menos comuns em humanos e são frequentemente associados a infecções crônicas por trematódeos hepáticos (*Opistorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*) e cálculos nas vias biliares (CRAWFORD, 1999; JEMAL et al., 2011).

Existem algumas teorias acerca de fatores de risco para o desenvolvimento de câncer hepático de cães. Entre os fatores de risco possivelmente associados a THMP, citamos a

infestação por parasitos hepáticos (BOTTI, 1954) e a exposição a determinados agentes químicos (HIRAO et al., 1974; NELSON; WOODWARD, 1953). Ainda assim, nenhum desses fatores tem impacto comprovado na prevalência mundial dos THMP em cães, e a maioria dos estudos publicados acerca do assunto (PATNAIK et al., 1981a; PATNAIK et al., 1981b; TRIGO et al., 1982; HAYES et al., 1983) demonstra a ausência de fatores de risco fisicamente visíveis (como cálculos biliares ou parasitos) associados aos tumores. Semelhantemente ao que ocorre em humanos, a carcinogênese de alguns vírus da família *hepadnaviridae* já foi demonstrada em animais, e associada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, como é o caso do hepadnavírus de esquilos do solo (GSHV) (MARION et al., 1986) e do hepadnavírus de marmotas (WHV) (POPPER et al., 1981). No entanto, não existe nenhum estudo publicado que demonstre alguma correlação entre infecções hepáticas virais crônicas e a ocorrência de câncer hepático em cães.

No Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM), a prevalência dos THMP de cães é nitidamente maior do que é relatado na literatura. Aqui, o câncer hepático é o terceiro tumor primário mais comum em cães e representa 8,5% do total de tumores e 0,66% das causas de morte e razões para eutanásia nessa espécie (FIGHERA, 2008). Além da alta prevalência de câncer hepático em cães, o estudo de Fighera (2008) também aponta o colangiocarcinoma como o tumor hepático primário mais prevalente, acompanhado de uma prevalência marcadamente menor de carcinomas hepatocelulares. Como já discutimos anteriormente, há poucos estudos que consideram o colangiocarcinoma como THMP mais prevalente em cães (MESSOW, 1952; ROONEY, 1959; BASTIANELLO, 1983). Assim, a situação epidemiológica dos tumores hepáticos de cães observada no LPV-UFSM diverge do que é descrito pela maioria dos estudos publicados (STROMBECK, 1978; PATNAIK et al., 1980; TRIGO et al., 1982; RAMOS-VARA et al., 2001). Apesar da alta frequência de ocorrência, não há estudos epidemiológicos e anatomopatológicos sobre tumores hepáticos em cães dessa região, como ocorre para tumores cutâneos (SOUZA et al., 2006), mamários (OLIVEIRA FILHO et al., 2010), ósseos (TROST et al., 2012) e renais (INKELMANN et al., 2011).

Com base nessa problemática, este estudo tem como objetivos: (1) estabelecer definitivamente a prevalência dos diferentes THMP de cães necropsiados na Região Central do RS; e (2) comparar os aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos casos de colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares diagnosticados no LPV-UFSM com o que é descrito na literatura, a fim de fornecer subsídios que visam melhor direcionar clínicos e patologistas veterinários no diagnóstico desses tumores.

2. CAPÍTULO 1

Prevalência e achados epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores hepáticos malignos primários de cães da Região Central do Rio Grande do Sul (1965-2012)

Mariana M. Flores, Ronaldo M. Bianchi, Glaucia D. Kommers, Luiz Francisco Irigoyen,
Claudio S.L. Barros e Rafael A. Fighera

Artigo submetido para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Trabalho XXXX PA

Prevalência e achados epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores hepáticos malignos primários de cães da Região Central do Rio Grande do Sul (1965-2012)¹

Mariana M. Flores², Ronaldo M. Bianchi³, Glaucia D. Kommers⁴, Luiz Francisco Irigoyen⁴,
Claudio S.L. Barros⁴ e Rafael A. Fighera^{4*}

ABSTRACT.- Flores M.M., Bianchi R.M., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Barros C.S.L. & Fighera R.A. 2013. [**Prevalence and epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of primary canine malignant hepatic tumors in Rio Grande do Sul, Brazil (1965-2012).**] Prevalência e achados epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores hepáticos malignos primários de cães da Região Central do Rio Grande do Sul (1965-2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00)00-00. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: anemiaveterinaria@yahoo.com.br

The prevalence and epidemiological and immunohistochemical aspects of primary hepatic malignant tumors (PHMT) were reviewed in dogs necropsied in a 48-year period (1965-2012). Out of those 7,373 dogs, 64 died due to PHMT, which corresponds to 0.9% of the dogs dying from any cause in the period; 7.8% of dogs which deaths were caused by tumors in general; and 33.5% of all dogs dying from hepatic tumors (primary and metastatic). Out of the 64 cases of PHMT, 51 were reviewed histologically and evaluated by immunohistochemistry; they were diagnosed as carcinomas (36 cholangiocarcinomas, 9 hepatocellular carcinomas and one hepatocholangiocarcinoma) and sarcomas (5 hemangiosarcomas). In those dogs in which the age was possible determined, 64.7% (cholangiocarcinomas) and 77.8% (hepatocellular carcinomas) were old. At necropsy examination cholangiocarcinomas were characterized mainly by a multinodular pattern (83.3%) while hepatocellular carcinomas occurred both as massive (44.4%) or nodular (44.4%) distribution. Extra-hepatic metastasis occurred respectively in 77.8% and 33.3% of the cases of cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas; metastatic cholangiocarcinomas affected mainly the lungs (52.8%), lymph nodes (50%) and peritoneum (19.4%). Ascites (22.2%) and icterus (22.2%) were observed frequently associated to both tumors. Histologically, most part of the cholangiocarcinomas (86.1%) and of the hepatocellular carcinomas (55.6%) presented respectively a tubular or trabecular type. Immunohistochemistry revealed that the majority (63.9%) of cholangiocarcinomas was positive for CK7 and none was marked for Hep Par 1. The majority (55.6%) of the hepatocellular carcinomas revealed positive reaction for Hep Par 1 and none was marked for CK7. The results presented here demonstrated a very high prevalence of PHMT, especially

¹ Recebido em 5 de março de 2013.

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

⁴ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900. *Autor para correspondência: anemiaveterinaria@yahoo.com.br

cholangiocarcinomas, in the dog. The necropsy, histological and immunohistochemical findings reported might be useful to help veterinary pathologists in the diagnosis of this common form of cancer in dogs of the Rio Grande do Sul, Brazil.

INDEX TERMS: Diseases of dogs, oncology, pathology, hepatic tumors, liver tumors, liver cancer.

RESUMO.- A prevalência e os aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores hepáticos malignos primários (THMP) em cães foram estudados. De 7.373 cães necropsiados em 48 anos (1965-2012), 64 morreram de THMP, o que corresponde a 0,9% do total de cães que morreram por qualquer causa, 7,8% do total de cães que morreram por tumores em geral e 33,5% do total de cães que morreram por tumores hepáticos. Desses 64 casos de THMP, 51 foram revistos histologicamente, avaliados imuno-histoquimicamente e reclassificados como carcinomas (colangiocarcinomas [n=36], carcinomas hepatocelulares [n=9] e hepatocolangiocarcinoma [n=1]) e sarcomas (hemangiossarcomas [n=5]). Dos cães com colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares em que a idade estava disponível nos protocolos, 64,7% e 77,8% eram idosos, respectivamente. Na necropsia, colangiocarcinomas caracterizaram-se principalmente por ocorrerem em um padrão multinodular (83,3%), enquanto carcinomas hepatocelulares ocorreram tanto de forma massiva (44,4%) quanto nodular (44,4%). Metástases extra-hepáticas foram vistas em 77,8% e 33,3% dos casos de colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares, respectivamente, e em relação aos colangiocarcinomas afetaram principalmente pulmões (52,8%), linfonodos (50%) e peritônio (19,4%). Ascite (22,2%) e icterícia (22,2%) foram achados associados ocasionalmente com ambos os tumores. Na histologia, a maior parte dos colangiocarcinomas (86,1%) e dos carcinomas hepatocelulares (55,6%) tinha padrão tubular e trabecular, respectivamente. Na imuno-histoquímica, a maioria (63,9%) dos colangiocarcinomas demonstrou imunomarcagem para CK7 e nenhum imunomarcou para Hep Par 1. A maioria (55,6%) dos carcinomas hepatocelulares demonstrou imunomarcagem para Hep Par 1 e nenhum imunomarcou para CK7. Os resultados aqui apresentados demonstram uma altíssima prevalência de THMP, principalmente colangiocarcinomas, e servem para auxiliar, através dos achados de necropsia, histologia e imuno-histoquímica, patologistas veterinários no diagnóstico dessa tão comum forma de câncer em cães da Região Central do RS, Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de cães, oncologia, patologia, tumores hepáticos, tumores de fígado, câncer hepático.

INTRODUÇÃO

Na rotina do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM), neoplasmas representam a segunda causa de morte ou razão para eutanásia de cães da Mesoregião do Centro Ocidental Rio-Grandense, popularmente conhecida como Região Central do Rio Grande do Sul (RS), atrás apenas das doenças infecciosas, perfazendo 7,8% dos casos (Figuera et al. 2008). Quando cães são avaliados por faixa etária, neoplasmas contribuem na morte de 32% dos idosos (Figuera et al. 2008). Os principais neoplasmas de cães diagnosticados em nossa rotina de necropsia incluem: mamários (29,9%), cutâneos (14,6%), hepáticos (10%), ósseos (8,1%) e renais (3,4%) (Figuera 2008). Apesar da alta frequência de ocorrência, não há estudos epidemiológicos e anatomopatológicos sobre tumores hepáticos em cães dessa região, como ocorre para tumores cutâneos (Souza et al. 2006), mamários (Oliveira Filho et al. 2010), ósseos (Trost et al. 2012) e renais (Inkelmann et al. 2011).

Neoplasmas hepáticos primários podem emergir de hepatócitos (carcinoma hepatocelular [ou hepatoma]), de células do epitélio biliar (colangiocarcinoma [ou adenocarcinoma biliar]), de células neuroendócrinas (carcinoide) ou de células do estroma (sarcomas) (Head et al. 2003). Nos últimos 40 anos, quase a totalidade dos autores aponta o carcinoma hepatocelular como o tumor hepático maligno primário (THMP) mais comum de cães (Strombeck 1978, Patnaik et al. 1980, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982, Ramos-Vara et al. 2001), entretanto, em nossa rotina, colangiocarcinomas são mais prevalentes (Figuera 2008).

Com base nessa problemática, este trabalho tem como objetivo principal estabelecer a prevalência dos diferentes THMP de cães necropsiados na Região Central do RS, como um primeiro passo para entender o porquê da tão alta frequência de ocorrência desses tumores no nosso meio. Este estudo visa também comparar os aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos casos de colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares diagnosticados no LPV-UFSM com o que é descrito na literatura, a fim de fornecer subsídios que visam melhor direcionar clínicos e patologistas veterinários no diagnóstico desses tumores.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos de necropsias de cães realizadas entre 1965 e 2012 no LPV-UFSM foram revisados em busca de THMP. O método de inclusão dos casos neste estudo foi o diagnóstico definitivo do tumor através de critérios histológicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores do fígado e do sistema biliar (Ponomarkov & Machey 1976) e pelo *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) para tumores do sistema alimentar (Head et al. 2003) e aplicados durante esse período a partir de consultas a diferentes edições do principal livro-texto de patologia de tumores em animais domésticos (Meuten 2002). Esses diagnósticos foram realizados por oito patologistas veterinários pertencentes ao LPV-UFSM em diferentes períodos de tempo, quatro dos quais são autores deste trabalho (R.A.F., C.S.L.B., G.D.K. e L.F.I.).

Este estudo foi dividido em quatro etapas: (1) separação e exame das fichas de necropsia referentes aos casos de THMP; (2) análise dos dados contidos nas fichas de necropsia; (3) reavaliação histológica dos THMP; e (4) validação dos diagnósticos de THMP com auxílio do perfil imuno-histoquímico.

Os protocolos de necropsia referentes aos casos THMP foram separados e examinados. Foram considerados para este estudo apenas casos em que os tumores que acometeram o fígado foram a causa da morte ou a razão para eutanásia do cão. Desses protocolos de necropsia foram retiradas informações referentes ao sexo, à idade, às raças e aos achados macroscópicos (padrão de distribuição no fígado e presença de metástases). Os cães foram classificados apenas como macho e fêmea, independentemente de serem castrados ou não. Foram ainda divididos em três categorias de idade, conforme publicado anteriormente (Figuera et al. 2008): filhotes (até 1 ano de idade), adultos (de 1 a 9 anos de idade) e idosos (10 anos de idade ou mais). Quanto às raças, os cães foram classificados em sem raça definida (SRD) ou de raça pura (RP). Cães mestiços, do cruzamento de duas RP, foram considerados como SRD. Todos os casos incluídos ocorreram no Município de Santa Maria, localizado na Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense, popularmente conhecida como Região Central do RS. Para fins de comparação, foram calculados os mesmos dados epidemiológicos (idade, sexo e raça) de toda a população de cães necropsiada no LPV-UFSM nesse mesmo período.

Macroscopicamente, os THMP foram classificados de acordo com sua distribuição em: 1) nodular (incluindo multinodular), 2) massivo e 3) difuso. Carcinomas hepatocelulares foram subdivididos nas três categorias (nodular, massivo e difuso) e colangiocarcinomas em apenas duas (multinodular e massivo). Na categoria “nodular” foram enquadrados todos os tumores que se apresentaram sob a forma de nódulos, únicos ou múltiplos (“multinodular”), com distribuição aleatória no parênquima hepático. Foram inseridos na categoria “massivo” os tumores que se apresentaram sob a forma de massas, geralmente solitárias, que envolviam, e por vezes substituíam, um lobo hepático. Casos em que esse padrão era acompanhado de invasão do lobo hepático adjacente também foram

incluídos nessa categoria. A categoria “difuso” englobou casos em que a tumoração afetava todo ou a maior parte do fígado e ocorria como aumento de volume difuso acompanhado de mudanças na cor e consistência do parênquima afetado. Esses critérios basearam-se naqueles descritos por Cullen & Popp (2002), Head et al. (2003) e Stalker & Hayes (2007) para carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma.

Foram reavaliados histologicamente todos os casos em que os blocos de parafina foram encontrados no Arquivo do LPV-UFSM. Casos em que os blocos de parafina não foram encontrados foram excluídos. Os achados histológicos reavaliados incluíram: (1) arranjo celular, (2) padrão estromal (escasso ou abundante), (3) índice mitótico (baixo grau ≤ 2 mitoses/cga] ou alto grau ≥ 3 mitoses/cga]), (4) atipia celular, (5) pleomorfismo celular, (6) invasão de vasos linfáticos, (7) necrose, hemorragia e inflamação em meio ao tumor, (8) alterações no parênquima hepático adjacente ao tumor e (9) características de benignidade e malignidade no mesmo tumor.

Os THMP foram classificados de acordo com a classificação histológica descrita por Ponomarkov & Mackey (1976) e Head et al. (2003) em colangiocarcinomas, carcinomas hepatocelulares, carcinoide ou sarcomas. Com base em publicações mais recentes (Shiga et al. 2001), hepatocolangiocarcinoma foi também considerado. Para colangiocarcinomas, os arranjos celulares incluíram os padrões tubular, sólido e cístico (cistadenocarcinoma biliar); para carcinomas hepatocelulares, os padrões foram trabecular, adenoide e sólido.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) empregada foi a imunomarcagem para hepatócitos em tecidos embebidos em parafina (*Hepatocyte Paraffin 1* [Hep Par 1]) e para células do epitélio biliar (citoqueratina 7 [CK7]), conforme protocolo descrito a seguir e baseado em Ramos-Vara et al. (2001). Após a desparafinização e reidratação dos tecidos, foi realizada a recuperação antigênica com proteinase K⁵ a 25°C, por 20 minutos para CK7 e cinco minutos para Hep Par 1. O bloqueio das peroxidases e avidinas endógenas foi feito com H₂O₂ comercial a 3% por dois tempos de dez minutos e leite em pó comercial diluído em tampão fosfato salino com detergente Tween 20 (PBST) por 15 minutos, respectivamente. Como anticorpo primário foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CK7⁶ e anti-Hep Par 1⁷ humanos produzidos em camundongos, diluídos a 1:40 e 1:80 em PBST, respectivamente, e incubados por 19 horas a 4°C. O anticorpo secundário (polímero)⁸ foi utilizado consecutivamente, incubado a 25°C por 30 minutos e marcado através da adição do cromógeno de tetracloro de 3-3' diaminobenzidina (DAB)⁹ por cinco minutos. As lavagens entre as etapas da técnica foram feitas com solução salina-tris com detergente Tween 20 (PBST) em pH 7,6. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris¹⁰. Como controles positivos foram utilizados os hepatócitos e os ductos biliares de áreas não afetadas pelo tumor nas mesmas seções histológicas (controle interno) e cortes de fígado normal de um cão adulto fixado em formol 10% por aproximadamente oito horas. Como controle negativo, as mesmas seções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por PBST.

Por fim, foram considerados como carcinomas hepatocelulares todos os THMP que preencheram critérios histológicos reconhecidos internacionalmente e que tiveram ou não suas células neoplásicas imunomarcadas para Hep Par 1, mas não para CK7. Foram considerados como colangiocarcinomas todos os THMP que preencheram critérios histológicos reconhecidos internacionalmente e que tiveram ou não suas células neoplásicas imunomarcadas para CK7, mas não para Hep Par 1. Foram considerados como hepatocolangiocarcinomas todos os THMP que preencheram critérios histológicos reconhecidos internacionalmente (dupla população) e que tiveram suas células neoplásicas imunomarcadas para Hep Par 1 (uma das populações) e que tiveram ou não suas células neoplásicas imunomarcadas para CK7 (outra população). Foram considerados como hemangiossarcomas: 1) todos os casos em que o neoplasma era primário do fígado (por ser solitário [ocorrer apenas no fígado] ou por ser primário com metástases apenas em linfonodos e peritônio); 2)

⁵ Dako Cytomation S3020[®], Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

⁶ Dako Cytomation M7018[®], Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

⁷ Dako Cytomation M7158[®], Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

⁸ Easy Path EP-12-20502[®], Erviegas, Rua Lacedemonia, 268, Jardim Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

⁹ Dako Cytomation K3468[®], Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

¹⁰ Easy Path EP-101071[®], Erviegas, Rua Lacedemonia, 268, Jardim Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

que preencheram critérios histológicos reconhecidos internacionalmente; e 3) que tiveram suas células neoplásicas imunomarcadas para o fator de von Willebrand, conforme previamente publicado por Flores et al. (2012).

A interpretação imuno-histoquímica foi realizada por três (M.M.F., R.A.F. e G.D.K.) patologistas veterinários e quantificada de acordo com a intensidade e número de células imunomarcadas em: 0 (sem marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação intensa) e 4 (marcação muito intensa) conforme o estudo prévio realizado por Ramos-Vara et al. (2001).

RESULTADOS

Dos 7.373 protocolos de necropsia, 823 (11,2%) correspondiam a tumores. Do total de tumores, em 191 (23,2%) o fígado estava afetado. Desses 191 casos de tumores que acometeram o fígado, 64 (33,5%) eram THMP e 127 (66,5%) eram secundários, sendo 63 (33%) metástases e 64 (33,5%) multicêntricos. Assim, THMP correspondem a 33,5% do total de cães que morreram por tumores hepáticos, 7,8% do total de cães que morreram por tumores em geral e 0,9% do total de cães que morreram por qualquer causa. Dos 64 THMP, 51 foram reavaliados histologicamente e avaliados através da imuno-histoquímica. Com base nos critérios estabelecidos no material e métodos, 46 tumores foram considerados carcinomas (colangiocarcinomas [n=36], carcinomas hepatocelulares [n=9] e hepatocolangiocarcinoma [n=1]) e cinco foram considerados sarcomas (hemangiossarcomas [n=5]). Os resultados referentes aos carcinomas hepáticos (carcinomas hepatocelulares, colangiocarcinomas e hepatocolangiocarcinoma) serão expressos separadamente a seguir. Os resultados referentes aos hemangiossarcomas constam de outra publicação (Flores et al. 2012).

Achados epidemiológicos (população geral)

Entre 1965 e 2012 foram realizadas 7.373 necropsias de cães no LPV-UFSM. Dessas, 53,1% correspondiam a machos e 46,9% a fêmeas. Do total de cães, 35,3% foram incluídos como filhotes, 49,4% como adultos e 15,3% como idosos. Dos cães em que dados sobre raça foram encontrados nos protocolos, 59,3% tinham raça definida e 40,7% eram SRD. Para fins de comparação, as raças a seguir correspondiam as seguintes prevalências: Pastor Alemão (10,8%), Poodle (5,4%), Boxer (4,3%), Dachshund (3,5%), Rottweiler (3,3%), Cocker Spaniel (2,5%), Collie (2,3%), Fila Brasileiro (1,7%), Husky Siberiano (0,8%), Beagle e São Bernardo (0,4%), Border Collie (0,3%), Old English Sheepdog e Setter Irlandês (0,2%).

Achados epidemiológicos (população com colangiocarcinoma)

Dos 36 cães com colangiocarcinoma, a idade não estava anotada nos protocolos de dois cães. Dos 34 cães em que a idade constava dos protocolos, 22 (64,7%) foram incluídos como idosos e 12 (35,3%) como adultos. Dos 36 cães com colangiocarcinoma, 18 (50%) eram machos e 18 (50%) eram fêmeas. Dos 36 cães com colangiocarcinoma, 15 (41,7%) eram SRD e 21 (58,3%) eram de RP, principalmente Pastor Alemão (5/36 [13,9%]), Boxer (4/36 [11,1%]), Poodle (3/36 [8,3%]), Fila Brasileiro (2/36 [5,5%]), mas também várias outras raças (Border Collie, Cocker Spaniel, Dachshund, Husky Siberiano, Rottweiler, São Bernardo e Old English Sheepdog (1/36 [2,8%])). Dos 36 cães afetados, 16 (44,4%) morreram espontaneamente e 20 (55,6%) foram submetidos à eutanásia.

Achados epidemiológicos (população com carcinoma hepatocelular)

Dos nove cães com carcinoma hepatocelular, sete (77,8%) foram incluídos como idosos e dois (22,2%) como adultos. Dos nove cães com carcinoma hepatocelular, quatro (44,4%) eram machos e cinco (55,6%) eram fêmeas. Dos nove cães com carcinoma

hepatocelular, três (33,3%) eram SRD e seis (66,7%) eram de RP, que incluíam Beagle, Collie, Husky Siberiano, Poodle, Rottweiler e Setter Irlandês (1/9 [11,1%]). Dos nove cães afetados, seis (66,7%) morreram espontaneamente e três (33,3%) foram submetidos à eutanásia.

Achados epidemiológicos (população com hepatocolangiocarcinoma)

O único cão diagnosticado com hepatocolangiocarcinoma não tinha idade informada, era fêmea, SRD e morreu espontaneamente.

Achados de necropsia (população com colangiocarcinoma)

Na necropsia (n=36), os colangiocarcinomas se apresentaram principalmente sob a forma multinodular (30/36 [83,3%]) (Fig.1) e menos frequentemente sob a forma massiva (6/36 [16,7%]) (Fig.2). Alguns casos (8/36 [22,2%]) interpretados como multinodulares tinham um lobo completamente substituído por uma massa focalmente extensa. Os tumores descritos como multinodulares caracterizavam-se por: 1) serem múltiplos e aleatórios, 2) afetarem a maioria ou todos os lóbulos hepáticos e 3) variarem de 0,1 a 10 cm de diâmetro. Frequentemente (19/36 [52,8%]) foram descritos como brancos ou amarelos, com ocasionais áreas vermelhas (4/36 [11,1%]), firmes (11/36 [30,6%]), umbilicados (14/36 [38,9%]) (Fig.3), por vezes com seus centros necrosados e repletos de pus, sangue, muco ou uma mistura desses (alguns referidos pelos patologistas como císticos) (11/36 [30,6%]). Os tumores descritos como massivos caracterizavam-se por: 1) serem únicos, 2) afetarem apenas um lóbulo hepático, principalmente o lobo lateral esquerdo (2/36 [5,6%]) e 3) variarem de 8 a 15 cm em seu maior eixo. Alguns foram descritos como firmes (6/36 [16,7%]), brancos ou amarelos, com áreas focais ou multifocais vermelhas (5/36 [13,9%]) (Fig.4), outros como “císticos” (idênticos aos descritos previamente como um dos padrões multinodulares) (1/36 [2,8%]) (Fig.5) e outros como borrachentos e homogeneamente pardacentos (1/36 [2,8%]) (Fig.6).

Alterações no parênquima adjacente ao tumor não foram comumente descritas nos protocolos, mas nos casos em que se fizeram presentes incluíram: hepatomegalia (7/36 [19,4%]); alterações na coloração (6/36 [16,7%]) (que incluíam fígados pálidos [2/36 {5,6%}], amarelos [2/36 {5,6%}], marrom-amarelados [1/36 {2,8%}] ou com áreas brancas, amarelas e vermelhas entremeadas [1/36 {2,8%}]); aumento da consistência (5/36 [13,9%]), superfície irregular (5/36 [13,9%]); e acentuação do padrão lobular (2/36 [5,6%]).

Havia metástases extra-hepáticas em 28 dos 36 casos (77,8%) de colangiocarcinoma incluídos neste estudo. Os órgãos afetados foram: pulmões (19/36 [52,8%]), linfonodos (18/36 [50%]), cavidade abdominal (omento, mesentério e peritônio parietal) (7/36 [19,4%]), músculo esquelético (diafragma) (7/36 [19,4%]), adrenais (5/36 [13,9%]), baço (4/36 [11,1%]), pâncreas (4/36 [11,1%]), coração (3/36 [8,3%]), rins (3/36 [8,3%]), bexiga (2/36 [5,6%]), esôfago (1/36 [2,8%]), ovário (1/36 [2,8%]), ureter (1/36 [2,8%]) e músculo esquelético (temporal) (1/36 [2,8%]). Além das metástases, outras lesões extra-hepáticas relacionadas ao tumor foram vistas em vários casos (21/36 [58,3%]) de colangiocarcinoma e incluíram: hemoperitônio (8/36 [22,2%]), icterícia (8/36 [22,2%]), ascite (5/36 [13,9%]), hidrotórax (4/36 [11,1%]), hemotórax (2/36 [5,6%]), peritonite (2/36 [5,6%]), palidez das mucosas (1/36 [2,8%]) e piotórax (1/36 [2,8%]).

Achados de necropsia (população com carcinoma hepatocelular)

Na necropsia (n=9), os carcinomas hepatocelular se apresentaram principalmente sob a forma massiva (4/9 [44,4%]) (Fig.7) ou nodular (4/9 [44,4%]) (Fig.8) e bem menos frequentemente sob a forma difusa (1/9 [11,1%]) (Fig.9). Em um caso (1/9 [11,1%]) interpretado como nodular havia um lobo completamente substituído por uma massa focalmente extensa. Os tumores descritos como massivos caracterizavam-se por: 1) serem

únicos, 2) afetarem apenas um lóbulo hepático, principalmente o lobo lateral esquerdo (3/9 [33,3%]) e 3) variarem de 8 a 18 cm em seu maior eixo. Foram descritos como brancos ou amarelos (3/9 [33,3%]), vermelhos (2/9 [22,2%]) (Fig.10) ou marrom-esverdeados (1/9 [11,1%]). A consistência variou de firme (2/9 [22,2%]) a macia (1/9 [11,1%]) e alguns foram descritos como friáveis (2/9 [22,2%]) ou com cavitações repletas de pus (2/9 [22,2%]). Os tumores descritos como nodulares caracterizavam-se por: 1) serem múltiplos e aleatórios, 2) afetarem vários ou todos os lóbulos hepáticos e 3) variarem de 1 a 2,5 cm de diâmetro. Frequentemente foram descritos como brancos ou amarelos (3/9 [33,3%]). Apenas um carcinoma hepatocelular foi descrito como difuso; neste caso, o fígado acometido estava aumentado de volume, era friável e tinha áreas brancas, amarelas e vermelhas entremeadas.

Alterações no parênquima adjacente ao tumor não foram comumente descritas nos protocolos, mas nos casos em que se fizeram presentes incluíram: hepatomegalia (2/9 [22,2%]); alterações na coloração (fígado “cor de tijolo”) (1/9 [11,1%]); e acentuação do padrão lobular (1/9 [11,1%]). Havia metástases extra-hepáticas em três dos nove (33,3%) casos de carcinoma hepatocelular incluídos neste estudo. Os órgãos afetados foram: pâncreas (2/9 [22,2%]), linfonodos regionais (2/9 [22,2%]) e pulmões (1/9 [11,1%]). Assim como as metástases, outras lesões extra-hepáticas relacionadas ao carcinoma hepatocelular foram vistas apenas incomumente (4/9 [44,4%]) e incluíram: hemoperitônio (2/9 [22,2%]), icterícia (2/9 [22,2%]) e palidez das mucosas (2/9 [22,2%]).

Achados de necropsia (população com hepatocolangiocarcinoma)

Na necropsia (n=1), o hepatocolangiocarcinoma ocorreu como uma massa multilobulada única (forma massiva), localizada no lobo lateral direito, firme, com cerca de 15 cm de diâmetro, e que tinha áreas vermelhas, amarelas, verdes e marrons entremeadas. Os múltiplos lóbulos que constituíam a massa variavam de tamanho e eram separados uns dos outros por septos de tecido conjuntivo fibroso. Não foram observadas metástases ou quaisquer alterações extra-hepáticas relacionadas a esse tumor.

Achados histopatológicos (população com colangiocarcinoma)

Na histologia (n=36), a maior parte dos colangiocarcinomas (31/36 [86,1%]) foi caracterizada pela formação de túbulos de diferentes tamanhos (padrão tubular) (Fig.11). Apenas em alguns casos (5/36 [13,9%]) não ocorreu formação de túbulos; nesses havia proliferação de células neoplásicas na forma de mantos (padrão sólido) (Fig.12). Alguns poucos casos (3/36 [8,3%]) demonstravam grandes áreas císticas, que lembravam favos de mel (padrão cístico [cistadenocarcinomas biliares]), em meio à proliferação tubular.

O estroma do tumor variou de escasso, no qual os feixes de tecido conjuntivo colagenoso eram quase imperceptíveis em meio às células neoplásicas, a esquisito, no qual era tão abundante que chegava a isolar grupos de células em pequenas ilhas (Fig.13). De acordo com essa classificação, a maioria dos tumores (25/36 [69,4%]) tinha estroma escasso e a minoria (11/36 [30,6%]) tinha estroma abundante.

A atipia e pleomorfismo celular foram observados em cerca de um terço dos casos (13/36 [36,1%]) (Fig.14) e o grau de mitoses predominante foi baixo (33/36 [91,7%]), já tumores de alto grau foram bem menos comuns (3/36 [8,3%]). Invasão de vasos linfáticos (Fig.15) foi uma característica proeminente, vista em cerca de dois terços dos casos (23/36 [63,9%]). Essa invasão era muitas vezes evidente a ponto de formar grupos sólidos de células neoplásicas no interior desses vasos, que ocasionalmente eram vistas na forma de pequenos túbulos. Áreas com quantidades variáveis de necrose (24/36 [66,7%]), hemorragia (8/36 [22,2%]), inflamação (7/36 [19,4%]) e presença de muco (4/36 [11,1%]) (Fig.16) também foram observadas. Em pelo menos um quarto dos casos (9/36 [25%]) havia áreas aparentemente benignas em meio ao infiltrado neoplásico maligno. Essas áreas eram

formadas por células neoplásicas bem diferenciadas, monomórficas e arrançadas em túbulos regulares de diferentes tamanhos (Fig.17). Em um caso (1/36 [2,8%]), o parênquima hepático adjacente ao neoplasma apresentava critérios que permitiram um diagnóstico de “cirrose hepática”. Esses achados histológicos incluíam: fibrose periportal acentuada associada à formação de pontes de colágeno entre os espaços porta (fibrose em ponte) e nódulos constituídos de hepatócitos bem diferenciados e sem espaços-porta (nódulos de regeneração hepatocelular).

Achados histopatológicos (população com carcinoma hepatocelular)

Na histologia (n=9), todos os carcinomas hepatocelulares tinham arranjo celular clássico, dos quais cerca da metade (5/9 [55,6%]) foi considerado como trabecular e outra metade (4/9 [44,4%]) como sólido. Os tumores trabeculares eram constituídos de múltiplos lóbulos formados por células bem diferenciadas e arrançadas em trabéculas com duas a 15 camadas de células (Fig.18). Nenhum carcinoma hepatocelular classificado como trabecular apresentou atipia e apenas um (1/9 [11,1%]) demonstrou pleomorfismo. Os tumores sólidos caracterizavam-se por serem desorganizados, ou seja, não formarem trabéculas, e eram compostos por células dispostas em mantos sólidos (Fig.19). Todos eles eram marcadamente pleomórficos e tinham quantidades variáveis de células que demonstravam intensa atipia (Fig.20), incluindo a ocorrência de células gigantes, por vezes multinucleadas, com núcleos grandes (cariomegalia) e nucléolos proeminentes.

Em todos os casos (9/9 [100%]) havia quantidade escassa de estroma, constituído de finos septos de tecido conjuntivo fibrovascular, baixo grau de mitoses e ausência de invasão linfática e de áreas aparentemente benignas em meio ao infiltrado neoplásico maligno. Outros achados histológicos incluíam: necrose e hemorragia (6/9 [66,7%]), degeneração gordurosa (4/9 [44,4%]), formação de espaços cavernosos repletos de sangue (3/9 [33,3%]), hematopoiese extramedular (3/9 [33,3%]) e infiltrado inflamatório supurativo (1/9 [11,1%]).

Achados histopatológicos (população com hepatocolangiocarcinoma)

Na histologia (n=1), o hepatocolangiocarcinoma era constituído de hepatócitos proliferados formando uma massa multilobulada, cujos lóbulos eram separados uns dos outros por finos septos de tecido conjuntivo fibroso. Esses hepatócitos estavam arrançados em trabéculas com uma a 17 camadas de células com graus variados de organização. Em meio à proliferação de hepatócitos, observava-se uma segunda população neoplásica, que formava túbulos em meio aos hepatócitos. Esses túbulos eram pequenos a médios, irregulares, repletos de muco e estavam isolados uns dos outros pelas trabéculas de hepatócitos neoplásicos ou por pequena quantidade de estroma fibrovascular. O índice mitótico era baixo e nenhum dos outros critérios avaliados foi observado.

Achados imuno-histoquímicos (população com colangiocarcinoma)

Na imuno-histoquímica (n=36), a maioria (23/36 [63,9%]) dos colangiocarcinomas demonstrou imunomarcagem para CK7 (Fig.21) e nenhum imunomarcou para Hep Par 1. Essa positividade foi altamente heterogênea, tanto em intensidade quanto em número de células imunomarcadas, inclusive em um mesmo corte. A imunomarcagem da maioria das células neoplásicas era mais intensa no citoplasma próximo à membrana plasmática, principalmente na porção apical (Fig.22). A minoria das células neoplásicas demonstrava imunomarcagem citoplasmática densa e difusa, dificultando a visualização do núcleo. Com base nesses achados, a imunomarcagem foi dividida quanto à intensidade em: fraca (5/36 [13,9%]), moderada (3/36 [8,3%]), intensa (8/36 [22,2%]) e muito intensa (7/36 [19,4%]). Essa heterogeneidade também foi observada nos controles internos (ductos biliares normais) positivos. Dos casos sem imunomarcagem para CK7 (13/36 [36,1%]), cerca da metade (7/13

[53,8%]) teve os seus controles internos (ductos biliares normais) negativos enquanto cerca da outra metade (6/13 [46,2%]) teve os seus controles internos positivos. Dos casos em que as células neoplásicas e dos ductos biliares normais falharam em imunomarcá-los, quase todos (6/7 [85,7%]) estavam autolisados. Dos casos em que as células neoplásicas falharam em imunomarcá-los, mas o controle interno foi positivo, apenas um (1/6 [16,7%]) demonstrou atipia celular.

Achados imuno-histoquímicos (população com carcinoma hepatocelular)

Na imuno-histoquímica (n=9), a maioria (5/9 [55,6%]) dos carcinomas hepatocelulares demonstraram imunomarcá-los para Hep Par 1 (Fig.23) e nenhum imunomarcou para CK7. Essa positividade foi homogênea, com intensidade e número de células imunomarcadas muito semelhantes entre várias regiões do mesmo tumor e entre tumores diferentes, o que facilitava muito sua visualização. A imunomarcá-los das células neoplásicas era citoplasmática, difusa e granular (Fig.24). Quanto à intensidade, a imunomarcá-los foi dividida em: moderada (3/9 [33,3%]), intensa (1/9 [11,1%]) e muito intensa (1/9 [11,1%]). Essa homogeneidade também foi observada nos controles internos (hepatócitos normais) positivos. Dos casos sem imunomarcá-los para Hep Par (4/9 [44,4%]), apenas um (1/9 [11,1%]) teve seu controle interno (hepatócitos normais) negativo enquanto os outros (3/9 [33,3%]) tiveram os seus controles internos positivos. Esse caso em que as células neoplásicas e os hepatócitos normais falharam em imunomarcá-los estava autolisado. Nos três casos em que as células neoplásicas falharam em imunomarcá-los, mas o controle interno foi positivo, havia atipia celular.

Achados imuno-histoquímicos (população com hepatocolangiocarcinoma)

Na imuno-histoquímica (n=1), o componente referente ao carcinoma hepatocelular demonstrou uma muito intensa imunomarcá-los para Hep Par 1, mas não para CK7. Essa positividade foi idêntica àquela descrita previamente para os carcinomas hepatocelulares. O componente referente ao colangiocarcinoma não demonstrou imunomarcá-los nem para CK7 nem para Hep Par 1.

DISCUSSÃO

Há poucos dados a respeito da real prevalência de tumores hepáticos em animais, principalmente quando comparamos essa situação à medicina humana (Crawford 1999, Cullen & Popp 2002, Jemal et al. 2011). Por esse motivo, revisar a prevalência de THMP em cães é difícil, principalmente porque os trabalhos publicados (Strombeck 1978, Patnaik et al. 1980, Trigo et al. 1982, Bastianello 1983) avaliam parâmetros diferentes uns dos outros, tornando complicado comparar seus resultados. Apesar disso, a maior parte da literatura (Strombeck 1978, Patnaik et al. 1980, Bastianello 1983) considera os THMP como incomuns em cães, pois correspondem a menos de 1% dos tumores nessa espécie (Bastianello 1983), uma prevalência muito menor do que aquela encontrada por nós (7,8% do total de cães que morreram por tumores em geral).

Outra diferença significativa que foi observada entre os nossos resultados e os dados já publicados na literatura é a percentagem de THMP em relação ao total de tumores de fígado. Segundo um estudo realizado no Reino Unido (Trigo et al. 1982), e que guia a maioria dos autores (Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003, Stalker & Hayes 2007), apenas 21% dos cânceres de fígado são primários, uma prevalência bem mais baixa do que a encontrada por nós (33,5% do total de cães que morreram por tumores hepáticos) e por Messow (1952) (58% do total de cães que morreram por tumores hepáticos). Apesar de existirem poucos trabalhos que apresentem parâmetros passíveis de serem comparados aos nossos resultados, a maioria dos autores concorda que THMP são incomuns e representam apenas uma pequena parcela das necropsias e dos neoplasmas diagnosticados em cães (Strombeck 1978, Trigo et al. 1982,

Bastianello 1983, Cullen & Popp 2002, Stalker & Hayes 2007, Cullen & Brown 2012). Em contrapartida, para esses mesmos autores, tumores secundários (metastáticos e multicêntricos) acometem o fígado mais frequentemente. Os resultados por nós descritos demonstram que na Região Central do RS há uma prevalência muito alta de THMP, o que faz deles uma causa bem mais comum de morte por tumores do que aquela vista em qualquer outra região do mundo em que estudos mais recentes já foram conduzidos e, conseqüentemente, diminui muito a relação entre tumores primários e secundários do fígado.

O carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma são os THMP mais comuns em cães, representando 70% a 91% desses tumores nessa espécie (Strombeck 1978, Patnaik et al. 1980, Trigo et al. 1982, Cullen & Popp 2002). Baseado em um número considerável de estudos (Strombeck 1978, Patnaik et al. 1980, Patnaik et al. 1981a, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982, Ramos-Vara et al. 2001), a maioria dos autores (Ponomarkov & Mackey 1976, Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003, Stalker & Hayes 2007) concorda que o carcinoma hepatocelular é o câncer hepático primário mais diagnosticado em cães. Em alguns desses estudos (Patnaik et al. 1980, Ramos-Vara et al. 2001), os colangiocarcinomas representam apenas uma pequena parcela dos THMP, ficando muito atrás dos carcinomas hepatocelulares. Patnaik et al. (1980) obtiveram uma relação de cerca de 71% *versus* 29% para carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas, respectivamente. Apesar disso, alguns autores (Trigo et al. 1982) demonstram uma diferença menor na relação entre esses dois tumores (58% *versus* 42%). Apenas um pequeno número de estudos (Messow 1952, Rooney 1959, Bastianello 1983), todos eles muito antigos, aponta o colangiocarcinoma como o câncer hepático mais prevalente em cães. Esses tumores chegaram a representar cerca de 87%, 69% e 57% dos THMP nos estudos de Messow (1952), Rooney (1959) e Bastianello (1983), realizados na Alemanha, Suécia e na África do Sul (esse último conduzido entre 1935 e 1974), respectivamente. Semelhantemente, em nossa rotina, a proporção de colangiocarcinomas para carcinomas hepatocelulares foi de 4:1 (80% *versus* 20%). O grande número de colangiocarcinomas aqui diagnosticados causa uma elevação na prevalência dos THMP do LPV-UFSM, o que explica o fato de 7,8% de todos os tumores de cães corresponderem a THMP. Além disso, o grande número de colangiocarcinomas aqui diagnosticados altera a proporção de tumores malignos primários e secundários. Isso explica o fato de termos um número bastante significativo de tumores primários do fígado (33,5%) quando comparado aos secundários (66,5%).

Baseado em um número razoável de estudos prévios (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981a, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982), acredita-se não existir nenhum tipo de predisposição sexual ou racial para o desenvolvimento de câncer hepático em cães, entretanto, pelo menos um estudo anterior (Hayes et al. 1983) demonstrou risco relativo maior de fêmeas castradas e de cães da raça Labrador Retriever. Neste estudo, as proporções de cães SRD e de RP e de machos e fêmeas afetados por colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares foram muito próximas às respectivas proporções na população geral de cães necropsiada no LPV-UFSM. Entretanto, quando os dados referentes a cada raça são comparados, nota-se que Boxers e Poodles contribuíram com 4,3% e 5,4% do total de necropsias no período avaliado e com 11,1% e 8,3% do total de colangiocarcinomas, respectivamente. Com exceção do estudo de Rooney (1959), o qual relatou um maior número de cães adultos acometidos por colangiocarcinoma, para a maioria dos autores, colangiocarcinomas (Patnaik et al. 1981a, Hayes et al. 1983) e carcinomas hepatocelulares (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b) afetam mais frequentemente cães acima de 10 anos de idade, ou seja, idosos. Apesar de cerca de um terço dos casos de colangiocarcinoma aqui descritos terem afetados adultos, semelhante ao observado por Rooney (1959), idosos representaram a grande maioria dos cães acometidos.

Segundo a maioria dos autores (Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003, Stalker & Hayes 2007), colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares têm aparência macroscópica

distinta. Colangiocarcinomas ocorrem mais frequentemente sob a forma de múltiplos nódulos branco-amarelados que afetam todos os lobos hepáticos (Rooney 1959, Rehmtulla 1974, Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982). Essa apresentação, denominada “multinodular” (Head et al. 2003), foi observada em aproximadamente 83% dos colangiocarcinomas incluídos neste estudo. Diferentemente, carcinomas hepatocelulares ocorrem mais frequentemente como massas grandes e solitárias, que substituem completamente um lobo hepático (Mulligan 1949, Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982). Essa apresentação, denominada “massiva” (Head et al. 2003), foi vista em aproximadamente 44% dos carcinomas hepatocelulares incluídos neste estudo. Menos frequentemente (Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982), colangiocarcinomas podem ocorrer como uma única massa que substitui um lobo hepático, um padrão massivo muito semelhante ao descrito para os carcinomas hepatocelulares. Essa apresentação foi observada por nós em cerca de 17% dos colangiocarcinomas. Também menos frequentemente (Mulligan 1949, Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b), carcinomas hepatocelulares podem ocorrer na forma de múltiplos nódulos que acometem vários ou todos os lobos hepáticos, um padrão nodular muito semelhante ao descrito para os colangiocarcinomas. Essa apresentação foi vista por nós em cerca de 44% dos carcinomas hepatocelulares.

A consistência firme e a coloração brancacenta, descritas em cerca de 31% e 53% dos nossos casos de colangiocarcinomas, respectivamente, são comentadas em outros estudos (Rehmtulla 1974, Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982) como características comuns e atribuídas à grande quantidade de estroma fibroso (Head et al. 2003). A ocorrência de depressão central (“nódulos umbilicados”), vista em cerca de 39% dos nossos casos, é outra característica marcante dos colangiocarcinomas, e tem sido atribuída a necrose (Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982, Head et al. 2003). Colorações esverdeadas, geralmente associadas ao acúmulo de pigmento biliar, não foram observadas, e realmente não são descritas em colangiocarcinomas (Trigo et al. 1982), pois as células neoplásicas não contribuem com a produção da bile (Crawford 1999). Diferentemente dos colangiocarcinomas, carcinomas hepatocelulares são quase sempre pigmentados (marrons, vermelhos, amarelos, cinzentos ou esverdeados) (Mulligan 1949, Rooney 1959, Trigo et al. 1982), macios, amolecidos ou friáveis (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982), colorações e consistências vistas em cerca de 33% dos casos deste estudo.

Colangiocarcinomas são considerados por muitos autores como os THMP mais metastáticos (Patnaik et al. 1980, Trigo et al. 1982, Cullen & Popp 2002). Metástases foram observadas à necropsia em cerca de 78% dos casos aqui descritos, um resultado semelhante ao descrito na literatura (77% [Trigo et al. 1982] a 88% [Patnaik et al. 1980]). Diferentemente dos colangiocarcinomas, carcinomas hepatocelulares são reconhecidos por serem menos metastáticos (Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982). Metástases foram observadas à necropsia em cerca de 33% dos casos aqui descritos, um resultado semelhante ao descrito na literatura (22% [Trigo et al. 1982] a 61% [Patnaik et al. 1981b]). Quanto aos órgãos afetados, nossos resultados confirmam o que ressaltam muitos autores (Rooney 1959, Rehmtulla 1974, Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982, Cullen & Popp 2002), que embora colangiocarcinomas possam metastatizar virtualmente para qualquer órgão, acometem com maior frequência os pulmões, os linfonodos e o peritônio, ou seja, os mesmos órgãos classicamente afetados por metástases de carcinomas hepatocelulares. Nossos achados dão conta de que realmente pulmões (cerca de 53% dos casos), linfonodos (50% dos casos) e cavidade abdominal (omento, mesentério e peritônio parietal) (cerca de 19% dos casos) são os órgãos mais frequentemente acometidos por metástases de colangiocarcinomas, entretanto, o baixo número de casos de carcinomas hepatocelulares em que ocorreram metástases dificulta a discussão desse ponto.

Em cerca de 11% e 22% dos casos de carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas, os padrões nodulares demonstravam pelo menos um lobo massivamente afetado. Se essa apresentação, que é interpretada por alguns autores (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981a, Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003) como metastatização intra-hepática, for também assim interpretada, o fígado pode ser considerado como um dos órgãos mais afetados por metástases desses dois THMP.

Estudos mais antigos têm citado casos de cirrose hepática canina em associação com carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas (Mulligan 1949, Ponomarkov & Mackey 1976, Patnaik et al. 1980, Trigo et al. 1982). Nossos resultados apontam para uma associação muito baixa (cerca de 2% dos casos) entre essas condições. Em humanos, estima-se que 50% a 90% dos casos de carcinoma hepatocelular sejam associados à cirrose hepática (Jemal et al. 2011). Isso ocorre principalmente porque na maioria dos casos a cirrose é fator predisponente ao desenvolvimento do tumor (Crawford 1999). O fato de cirrose ser um achado incomum em cães com THMP sugere que talvez a etiologia e/ou a patogênese dos neoplasmas hepáticos nessa espécie seja diferente da de humanos (Patnaik et al. 1981b).

Segundo a literatura, as principais alterações extra-hepáticas relacionadas a THMP incluem hemoperitônio (Rooney 1959), ascite (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981a, Patnaik et al. 1981b) e icterícia (Rooney 1959, Rehmtulla 1974, Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982). Hemoperitônio ou hemotórax em decorrência da ruptura de tumores primários ou metastáticos, respectivamente, foi observado em cerca de 28% dos casos de colangiocarcinomas e cerca de 22% dos casos de carcinomas hepatocelulares. Ascite ou hidrotórax foi observado em cerca de 14% e 11% dos casos de colangiocarcinomas, respectivamente, mas não em casos de carcinomas hepatocelulares. Tais acúmulos têm sido atribuídos principalmente ao aumento da pressão hidrostática intravascular (PHI) e, menos frequentemente, à insuficiência hepática crônica (Stalker & Hayes, 2007). Icterícia foi vista por nós em aproximadamente 22% dos casos e essa prevalência foi igual para colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares, um resultado distinto, pois a maioria dos autores (Rehmtulla 1974, Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982) ressalta que esse achado é mais frequente em casos de colangiocarcinoma. É possível que o baixo número de carcinomas hepatocelulares deste estudo tenha interferido nessa relação.

A aparência histológica dos carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas varia consideravelmente de acordo com o grau de diferenciação das células neoplásicas e com o arranjo do tumor (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981a, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982). Colangiocarcinomas bem diferenciados têm suas células arranjadas em um padrão tubular. À medida que se tornam pouco diferenciados, passam a apresentar um arranjo sólido, até que a presença de células organizadas em túbulos se torna incomum (Ponomarkov & Mackey 1976, Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003). Dos tumores incluídos neste estudo, cerca de 86% tinham arranjo tubular, enquanto cerca de 14% tinham arranjo sólido. Embora os colangiocarcinomas com padrão tubular possam ser mais comuns (Patnaik et al. 1981a), tumores com padrão predominantemente sólido ocasionalmente prevalecem (Rooney 1959) e podem ser um desafio ao diagnóstico com base apenas na histologia.

A classificação histológica mais utilizada para carcinomas hepatocelulares inclui os padrões trabecular, adenoide e sólido (Head et al. 2003) ou combinações desses (Patnaik et al. 1981b). Tumores trabeculares são os que mais se assemelham ao tecido hepático normal, enquanto tumores sólidos são frequentemente pouco diferenciados (Ponomarkov & Mackey 1976, Cullen & Popp 2002). Para a maioria dos autores (Mulligan 1949, Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982), o padrão trabecular é o mais comum em cães, à semelhança do que foi observado por nós.

Cerca de 70% e 100% dos colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares, respectivamente, demonstram padrão estromal escasso. Esses resultados são semelhantes ao

que foi descrito na literatura para carcinomas hepatocelulares por vários autores (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982) e embora colangiocarcinomas sejam frequentemente reconhecidos como neoplasmas esquisitosos, as principais referências acerca do assunto (Ponomarkov & Mackey 1976, Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003) apontam para variações na quantidade de estroma.

O grau de pleomorfismo e a atipia celular dos colangiocarcinomas e dos carcinomas hepatocelulares podem variar de acordo com o arranjo e com o grau de diferenciação, uma vez que tumores sólidos e, portanto, pouco diferenciados, geralmente têm alto grau de atipia e pleomorfismo quando comparados aos tumores tubulares (para colangiocarcinomas) e trabeculares ou adenoides (para carcinomas hepatocelulares) (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981b, Trigo et al. 1982, Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003). Todos os carcinomas hepatocelulares incluídos neste estudo e classificados como “sólidos” tiveram pleomorfismo e atipia presentes, enquanto os demais, classificados como “trabeculares”, não apresentaram tais critérios. Diferentemente, entre os colangiocarcinomas incluídos neste estudo, apenas 20% dos tumores classificados como sólidos tinha indícios de atipia e pleomorfismo, enquanto cerca de 40% dos tumores tubulares apresentaram tais critérios. Esses achados nos permitem inferir que há uma aparente correlação entre a presença de atipia/pleomorfismo e a subclassificação histológica dos carcinomas hepatocelulares, uma vez que esses dois critérios estavam presentes em todos os tumores sólidos e ausentes nos demais tumores, entretanto, tal correlação não pôde ser observada nos colangiocarcinomas.

Com base em estudos anteriores (Patnaik et al. 1981a, Trigo et al. 1982), alguns autores (Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003) afirmam que a abundância de figuras mitóticas é uma característica típica de colangiocarcinomas, e que, em razão disso, a avaliação do grau de mitoses poderia auxiliar na diferenciação entre colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares. Todos os carcinomas hepatocelulares incluídos neste estudo tinham baixo grau de mitoses, inclusive os tumores menos diferenciados. Em contrapartida, o baixo grau de mitoses também foi observado na grande maioria (cerca de 92%) dos colangiocarcinomas. Com base em nossos achados, podemos deduzir que o grau de mitoses não é um critério confiável para diferenciar carcinoma hepatocelular de colangiocarcinoma.

A invasão de vasos linfáticos pelas células neoplásicas é mencionada apenas em alguns estudos acerca de colangiocarcinomas (Rooney 1959), embora o típico “padrão de crescimento invasivo” seja citado por vários autores (Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003, Stalker & Hayes 2007). Em contrapartida, a característica de invasão parece ser menos pronunciada em carcinomas hepatocelulares (Cullen & Popp 2002). Alguns autores (Cullen & Popp 2002) relacionam o comportamento invasivo de colangiocarcinomas a sua marcada capacidade de metastatizar, principalmente quando comparado aos menores índices de metástases de carcinomas hepatocelulares. Dos colangiocarcinomas incluídos neste estudo, cerca de 64% demonstraram invasão de vasos linfáticos, enquanto nenhum carcinoma hepatocelular demonstrou essa mesma característica. De todos os casos de colangiocarcinomas que tinham invasão de vasos linfáticos na histologia, cerca de 83% tinham metástases extra-hepáticas. Com base nisso, podemos depreender que a visualização de invasão linfática na histologia está fortemente relacionada à ocorrência de metástases, embora a ausência deste critério histológico não descarte a possibilidade de metastatização, uma vez que, mesmo sem invasão linfática visível histologicamente, cerca de 33% dos carcinomas hepatocelulares metastatizaram, além de que 69% dos colangiocarcinomas sem invasão linfática também tinham metástases.

A presença de áreas bem diferenciadas, e até aparentemente benignas, intercaladas com áreas pouco diferenciadas no mesmo tumor é ocasionalmente descrita para colangiocarcinomas (Rooney 1959, Patnaik et al. 1981a), e foi observada em 25% dos tumores aqui incluídos. Alguns autores (Patnaik et al. 1981a) interpretam essa mescla de áreas

benignas e malignas como evidência de uma possível transformação neoplásica a partir de uma área benigna. No entanto, essa teoria não é comprovada (Head et al. 2003).

O uso de Hep Par 1 em THMP de cães é relatado apenas em um estudo (Ramos-Vara et al. 2001), o qual demonstrou alta sensibilidade (cerca de 93%) para carcinomas hepatocelulares. Diferentemente, apenas 56% dos nossos casos de carcinomas hepatocelulares imunomarcaram. Esta grande diferença foi por nós atribuída a três fatores principais: 1) baixo número de carcinomas hepatocelulares, pois no estudo Ramos-Vara et al. (2001) o *n* era 40; 2) presença de tumores em avançado grau de autólise, uma vez que todos os tumores em “pobre estado de conservação” foram excluídos do estudo de Ramos-Vara et al. (2001); e 3) presença de pouca diferenciação celular. Dos quatro carcinomas incluídos neste estudo e negativos para Hep Par 1, três estavam em avançado grau de autólise e um demonstrou marcada atipia e pleomorfismo. Sabidamente, autólise é um fator que pode interferir na conformação dos epítomos teciduais, e, portanto, na eficácia da imuno-histoquímica (Goldstein & Silverman 2002, Ramos-Vara 2005). Apesar de Ramos-Vara et al. (2001) não terem observado nenhuma relação entre os graus de diferenciação celular e a sensibilidade do Hep Par 1, esta relação é relatada em carcinomas hepatocelulares de humanos (Chan & Yeh 2010). Com base nesses achados, podemos depreender que o uso de Hep Par 1 em tumores autolisados ou pouco diferenciados pode ter sua eficácia limitada.

O uso de CKs em geral (Martín de las Mulas et al. 1995), incluindo CK7 (Espinosa de los Monteros 1999, Ramos-Vara et al. 2001), já foi aplicado em estudos de THMP de cães. Tais estudos com CK7 demonstraram uma sensibilidade que variou de 67% (Espinosa de los Monteros 1999) a 77,7% (Ramos-Vara et al. 2001) para colangiocarcinomas, semelhante à observada por nós (cerca de 64%). A marcação para CK7 é definida por alguns autores (Ramos-Vara et al. 2001) como sendo “desigual” e “eventualmente focal”, principalmente por apresentar um padrão heterogêneo, com algumas células e ductos fortemente marcados, e outros sem nenhuma marcação. Na maioria dos colangiocarcinomas incluídos neste estudo, a marcação para esse anticorpo foi muito semelhante à descrita por Ramos-Vara et al. 2001, tornando difícil a interpretação de algumas lâminas (21,7%), nas quais havia apenas raras células imunomarcadas. Apesar disto, em 65% dos nossos casos considerados positivos, foi possível visualizar mais de 50% de células imunomarcadas, semelhante ao estudo de Ramos-Vara et al. (2001), em que esse índice foi de 71%. Isto nos permite inferir que a maioria dos tumores positivos para CK7 é de fácil interpretação, visto que frequentemente a maioria das células desses tumores demonstra marcação positiva.

Em razão de alguns carcinomas extra-hepáticos demonstrarem marcação positiva para CK7 (Espinosa de los Monteros 1999) e, raramente, para Hep Par 1 (Ramos-Vara et al. 2001), a interpretação da imunomarcação para esses dois anticorpos deve ser feita com cautela, uma vez que existe a possibilidade dos tumores positivos terem uma origem metastática ao invés de primária. Além disto, eventualmente, alguns carcinomas hepáticos primários podem demonstrar padrões de marcação aberrantes para CK7 e Hep Par 1, como é o caso de carcinomas hepatocelulares positivos para ambos os anticorpos ou de colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares negativos para CK7 e Hep Par 1, respectivamente (Ramos-Vara et al. 2001).

O uso de controles internos foi de grande valia neste estudo, visto que eles nos possibilitaram diferenciar os casos em que houve falha na imunomarcação daqueles em que as células do tumor eram realmente negativas para o anticorpo. Eventuais variações no estado de conservação, no tempo de fixação e no processamento da amostra podem ocasionar falhas na imuno-histoquímica (Goldstein & Silverman 2002, Ramos-Vara 2005), como foi observado nos sete casos incluídos neste estudo, que também tinham seus controles internos negativos. Diante do fato de que em quase todos esses casos (6/7 [85,6%]) havia autólise acentuada, uma plausível explicação para essa negatividade é o péssimo estado de conservação das amostras.

No único caso (1/7 [14,3%]) em que não ocorreu autólise, é possível que tenha ocorrido exposição do tecido a temperaturas demasiadamente altas durante o processamento, o que reconhecidamente prejudica a conformação dos epítomos (Goldstein & Silverman 2002). Infelizmente, esta última teoria não pode ser confirmada pelo fato de que alguns tumores deste estudo foram diagnosticados com base em tecidos processados há mais de 20 anos.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram a frequente ocorrência de casos de THMP em cães da Região Central do RS, Brasil, principalmente carcinomas e, dentre esses, especialmente colangiocarcinomas. Dentre os fatores epidemiológicos relacionados ao desenvolvimento desse tipo de neoplasma, a idade avançada é sem dúvida o principal fator predisponente.

Os achados anatomopatológicos demonstram que mais comumente os colangiocarcinomas ocorrem de forma multinodular enquanto os carcinomas hepatocelulares são principalmente massivos, entretanto, o patologista não deve surpreender-se se, histologicamente, isso não se confirmar, pois a chance de um THMP caracterizado por apresentar múltiplos nódulos ser um carcinoma hepatocelular não é pequena, bem como a de um THMP com apresentação massiva ser um colangiocarcinoma não é tão insignificante. Se outros critérios macroscópicos, como coloração e consistência, forem analisados conjuntamente, a chance de confirmação histológica com base na macroscopia será maior.

Colangiocarcinomas são altamente metastáticos, muito mais metastáticos do que carcinomas hepatocelulares, e os principais sítios de metastatização incluem pulmões, linfonodos e cavidade abdominal. Lesões extra-hepáticas são comuns em ambos os tumores e incluem principalmente hemoperitônio e icterícia.

Na histologia, colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares apresentam principalmente padrão tubular e trabecular, respectivamente, mas tumores com padrão sólido não são incomuns e podem dificultar o diagnóstico se a imuno-histoquímica não estiver disponível. Nesses casos, critérios diferenciadores incluem principalmente invasão linfática e quantidade de estroma, mas não grau de mitose e atipia ou pleomorfismo.

A imuno-histoquímica é uma técnica complementar importante no diagnóstico dos THMP, entretanto, necessita ser utilizada de forma contextualizada, pois sua interpretação isolada pode dificultar o diagnóstico definitivo, visto que não é incomum a negatividade dos colangiocarcinomas para CK7 e dos carcinomas hepatocelulares para Hep Par 1. Assim, a interpretação desses resultados deve ser baseada não só na positividade de colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares para os seus respectivos marcadores, mas também na negatividade desses tumores para um marcador não-específico para eles, ou seja, a negatividade de colangiocarcinomas para Hep Par 1 e de carcinomas hepatocelulares para CK7 também auxilia muito no diagnóstico definitivo.

Agradecimentos.- Mariana Martins Flores é bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Bastianello S.S. 1983. A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the Republic of South Africa. VI. Tumours occurring in dogs. Onderstepoort J. Vet. Res. 50(3):199-220.
- Chan E.S. & Yeh M.M. 2010. The use of immunohistochemistry in liver tumors. Clin. Liver Dis. 14(4):687-703.
- Crawford J.M. 1999. O fígado e o trato biliar, p.759-808. In: Cotran R.S., Kumar V. & Collins T. (Eds), Robbins – Patologia estrutural e funcional. 6th ed. Saunders, Philadelphia.

- Cullen J.M. & Popp J.A. 2002. Tumors of the liver and gall bladder, p.483-508. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Ames.
- Cullen J.M. & Brown D.L. 2012. Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas, p.405-457. In: Zachary J.F. & McGavin M.D. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Elsevier, St Louis.
- Espinosa de los Monteros A., Fernández A., Millán M.Y., Rodríguez F., Herráez P. & De las Mulas J.M. 1999. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. *Vet. Pathol.* 36(3):179-190.
- Figuera R.A. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 172p.
- Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). *Pesq.Vet. Bras.* 28(4):223-230.
- Goldstein N.S. & Silverman J.F. 2002. Immunohistochemistry of the gastrointestinal tract, pancreas, bile ducts, gallbladder, and liver, p.333-406. In: Dabbs, D.J. (Ed.), *Diagnostic Immunohistochemistry*. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Hayes H., Morin M.M. & Rubenstein D.A. 1983. Canine biliary carcinoma: Epidemiological comparisons with man. *J. Comp. Path.* 93(1):99-107.
- Head K.W., Cullen J.M., Dubielzig R.R., Else R.W., Misdrop W., Patnaik A.K., Tateyama S. & van der Gaag I. 2003. *Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals..* Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, p.119-130.
- Inkelmann M.A., Kommers G.D., Figuera R.A., Irigoyen L.F., Barros C.S.L., Silveira I.P. & Trost M.E. 2011. Neoplasmas do sistema urinário em 113 cães. *Pesq.Vet.Bras.* 31(11):1102-1107.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. & Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *Cancer. J. Clin.* 61:69-90.
- Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Pérez J. & Mozos E. 1995. Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratin and vimentin. *Res. Vet. Sci.* 59(2):124-127.
- Messow C. 1952. Die Lebertumoren unserer Haussäugetiere. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin.* 2:121-152.
- Meuten D.J. 2002. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Ames. 788p.
- Mulligan R.M. 1949. Primary liver-cell carcinoma (hepatoma) in the dog. *Cancer Res.* 9:76-81.
- Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq.Vet. Bras.* 30(2):177-185.
- Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H. & Johnson G.F. 1981a. Canine bile duct carcinoma. *Vet. Pathol.* 18(4):439-444.
- Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H. & Johnson G.F. 1981b. Canine hepatocellular carcinoma. *Vet. Pathol.* 18(4):427-438.
- Patnaik A.K., Hurvitz A.I. & Lieberman P.H. 1980. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. *Vet. Pathol.* 17(5):553-564.
- Ponomarev V. & Mackey L.J. 1976. Tumours of the liver and biliary system. *Bull. World Health Organ.* 53(2):187-194.
- Ramos-Vara J.A., Miller M.A. & Johnson G.C. 2001. Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. *Vet. Pathol.* 38(6):636-643.

- Ramos-Vara J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42(4):405-426.
- Rehmtulla A.J. 1974. Bile duct carcinoma in a dog. *Can. Vet. Jour.* 15(11):331-334.
- Rooney J.R. 1959. Liver carcinoma in the dog. *Acta Path.* 45(4): 321-330.
- Shiga A., Shirota K. & Enomoto M. 2001. Combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 63(4):483-486.
- Souza T.M., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2006. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural* 36:555-560.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and Biliary System, p.348-353 In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Vol.1, 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Strombeck D.R. 1978. Clinicopathologic features of primary and metastatic neoplastic disease of the liver in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173(3):267-269.
- Trigo F.J., Thompson H., Breeze R.G. & Nash A.S. 1982. The pathology of liver tumours in the dog. *J Comp Pathol.* 92(1):21-39.
- Trost M.E., Kommers G.D., Brown C.C., Barros C.S.L., Irigoyen L.F., Figuera R.A., Inkelmann M.A. & Silva T.M. 2012. Primary bone neoplasm in dogs: 90 cases. *Pesq. Vet. Bras.* 32(12): 1329-1335.

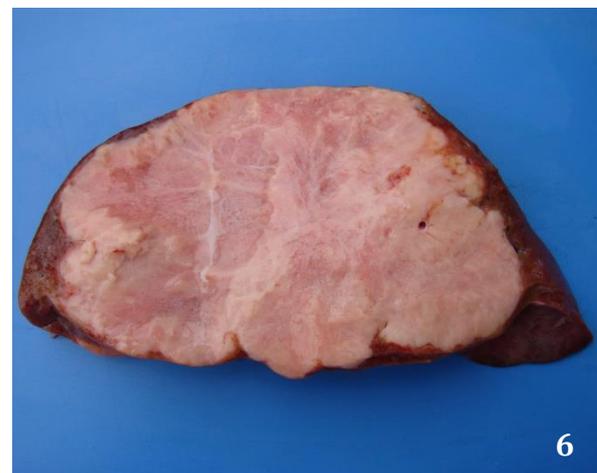
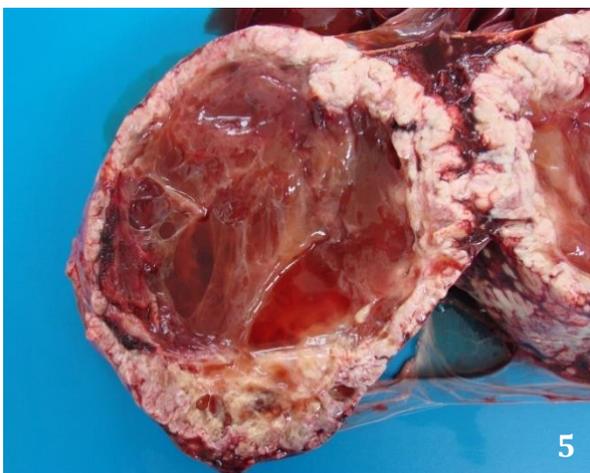
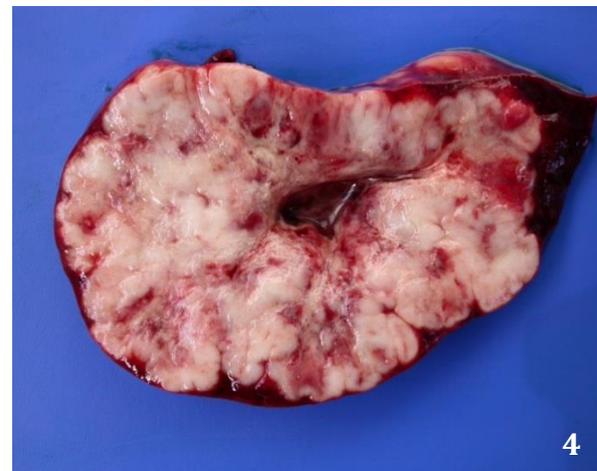
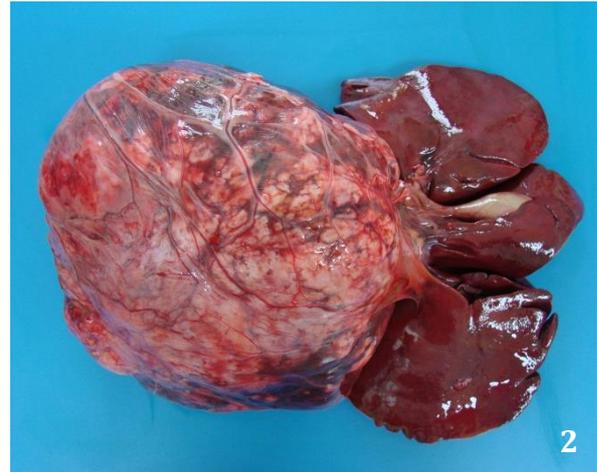
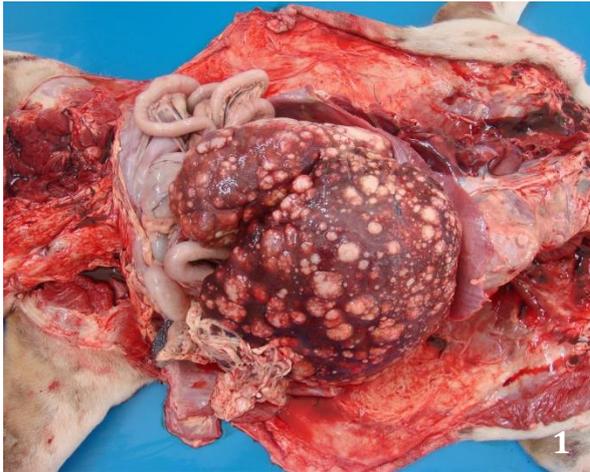


Fig.1. Cadáver, fígado. Marcada hepatomegalia decorrente da infiltração neoplásica na forma de múltiplos nódulos multifocais e coalescentes (padrão multinodular) em um cão com colangiocarcinoma.

Fig.2. Fígado. Uma grande massa, maior que o próprio fígado, substitui completamente o lobo caudado (padrão massivo) em um cão com colangiocarcinoma.

Fig.3. Fígado, superfície de corte. Múltiplos nódulos, alguns dos quais coalescem, brancos, levemente umbilicados e francamente radiados (forma de roseta) estão distribuídos aleatoriamente nesse lobo hepático de um cão com colangiocarcinoma de padrão multinodular.

Fig.4. Fígado, superfície de corte. Massa brancocenta única com múltiplas pequenas áreas vermelhas de hemorragia e necrose que substitui completamente o lobo lateral esquerdo em um cão com colangiocarcinoma de padrão massivo.

Fig.5. Fígado, superfície de corte. Uma grande “massa cística” repleta de muco misturado com sangue substitui totalmente o tecido hepático afetado em um cão com colangiocarcinoma de padrão de padrão massivo.

Fig.6. Fígado, superfície de corte. Massa pardacenta única que substitui parcialmente o lobo lateral esquerdo em um cão com colangiocarcinoma de padrão massivo. Esse “padrão cárneo” de apresentação lembra macroscopicamente um leiomiossarcoma.

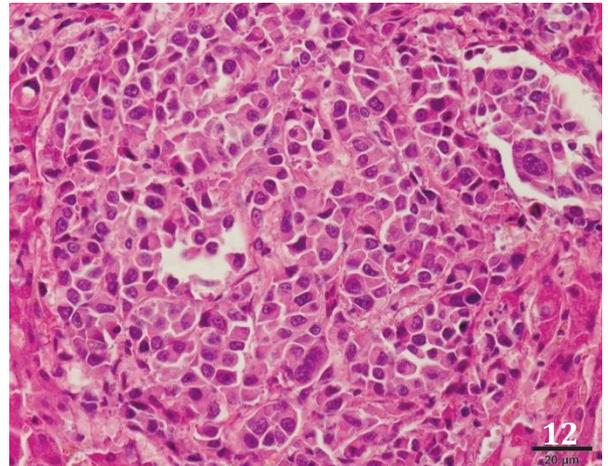
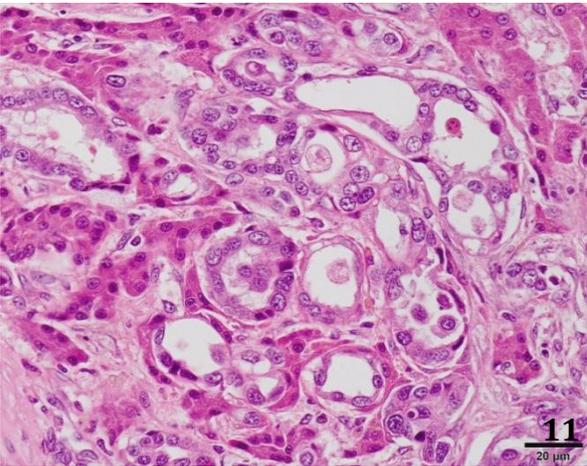
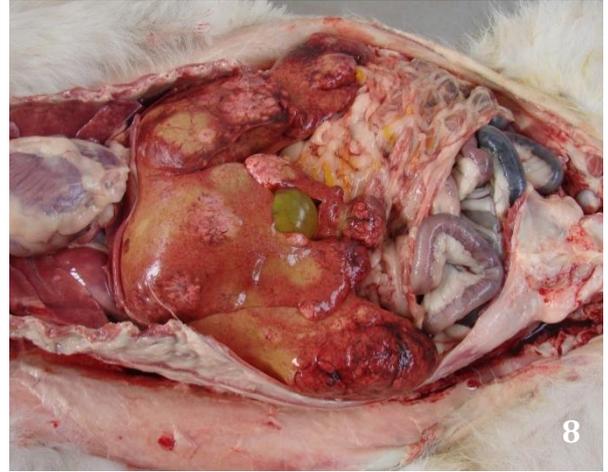


Fig.7. Cadáver, fígado. Uma grande massa, recoberta pelo omento, substitui completamente o lobo lateral esquerdo (padrão massivo) em um cão com carcinoma hepatocelular.

Fig.8. Cadáver, fígado. Marcada hepatomegalia decorrente da infiltração neoplásica na forma de múltiplos nódulos multifocais (padrão nodular) em um cão com carcinoma hepatocelular. Note o amarelamento difuso do órgão decorrente da deposição de gordura (lipidose hepática).

Fig.9. Fígado. Distorção da arquitetura hepática normal em decorrência da infiltração difusa do órgão por células neoplásicas (padrão difuso). Note a marcante irregularidade da superfície natural dos lobos hepáticos.

Fig.10. Fígado, superfície de corte. Massa intensamente vermelha e friável com área focalmente extensa mais clara (necrose) que substitui completamente o lobo hepático medial direito de um cão com carcinoma hepatocelular de padrão massivo.

Fig.11. Fígado. Infiltrado neoplásico de células epiteliais que forma túbulos (padrão tubular) de diferentes tamanhos em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

Fig.12. Fígado. Proliferação de células epiteliais na forma de um manto (padrão sólido) que infiltra e substitui os cordões de hepatócitos em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

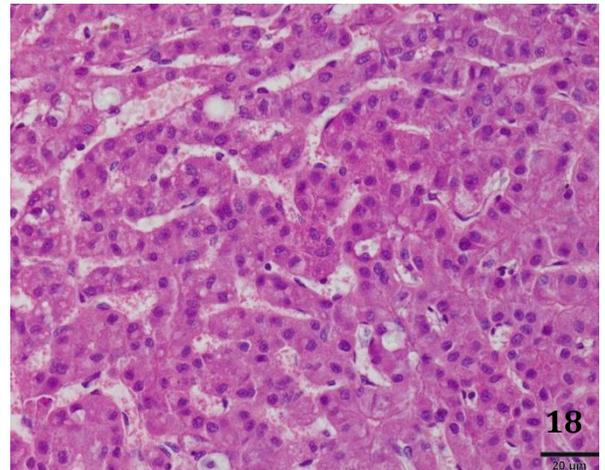
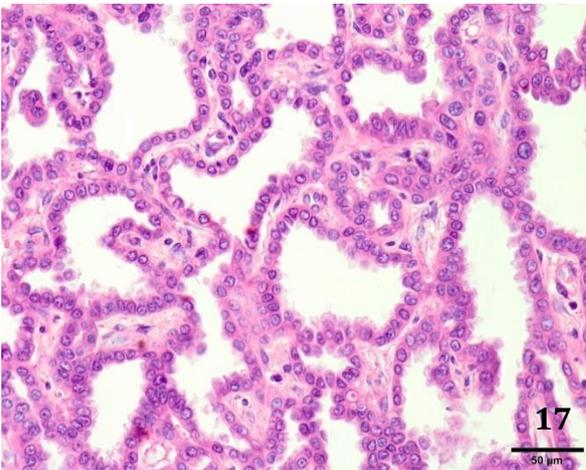
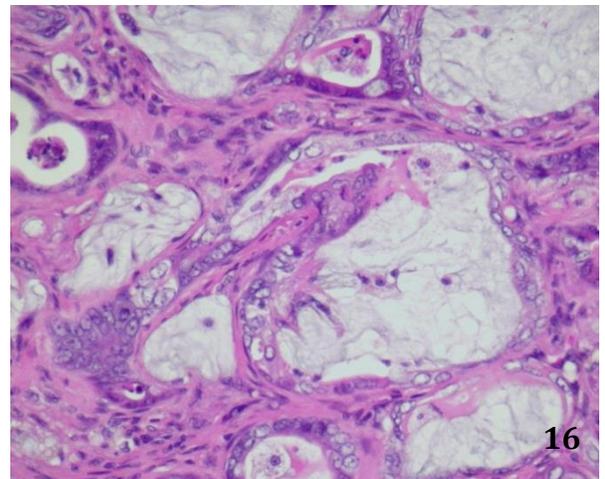
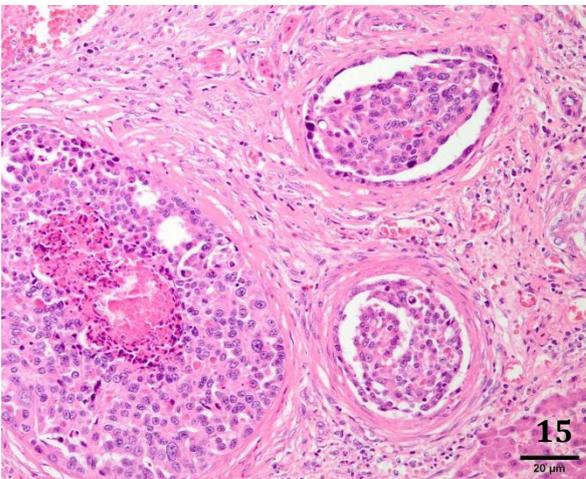
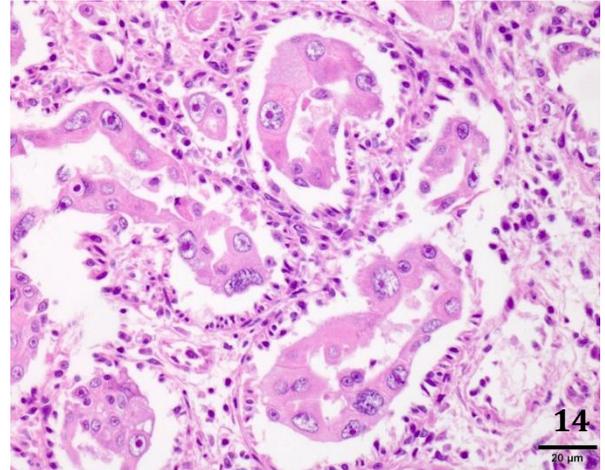
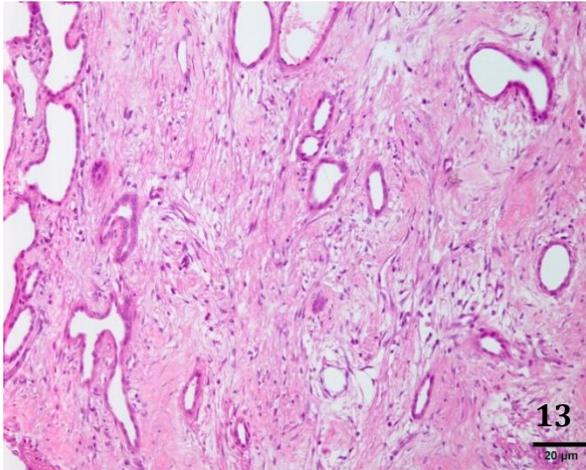


Fig.13. Fígado. Tecido fibrovascular maduro que substitui o parênquima hepático e encerra alguns poucos túbulos neoplásicos em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

Fig.14. Fígado. Marcada atipia celular em um cão com colangiocarcinoma. Note a anisocitose, a anisocariose e os nucléolos conspícuos em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

Fig.15. Fígado. Múltiplos vasos linfáticos invadidos e parcialmente obliterados por células epiteliais neoplásicas, alguns das quais se agrupam na forma de túbulos em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

Fig.16. Fígado. Túbulos neoplásicos repletos de muco em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

Fig.17. Fígado. Múltiplos túbulos neoplásicos distendidos e perfeitamente diferenciados, uma marca registrada dos colangiomas, em um cão com colangiocarcinoma. HE, obj.20x.

Fig.18. Fígado. Infiltrado neoplásico constituído de hepatócitos bem diferenciados e arranjados em trabéculas (padrão trabecular) em um cão com carcinoma hepatocelular. HE, obj.20x.

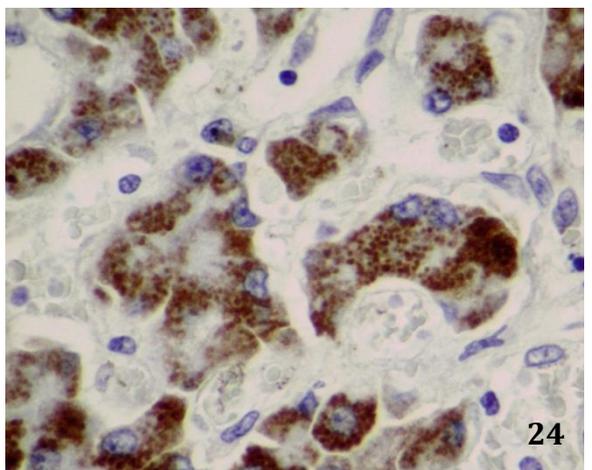
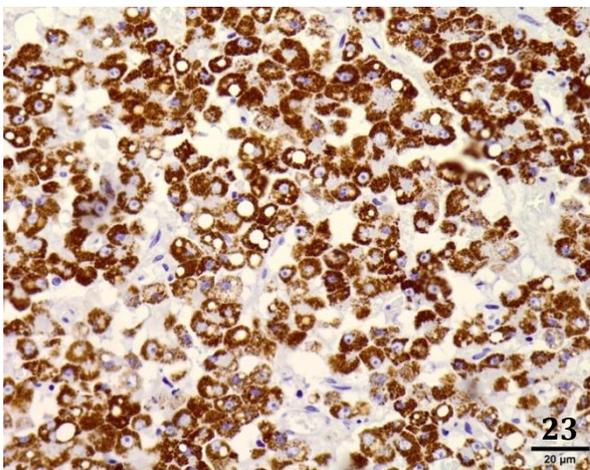
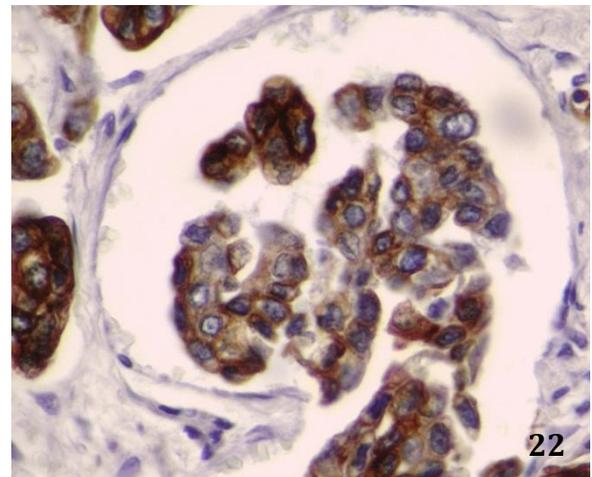
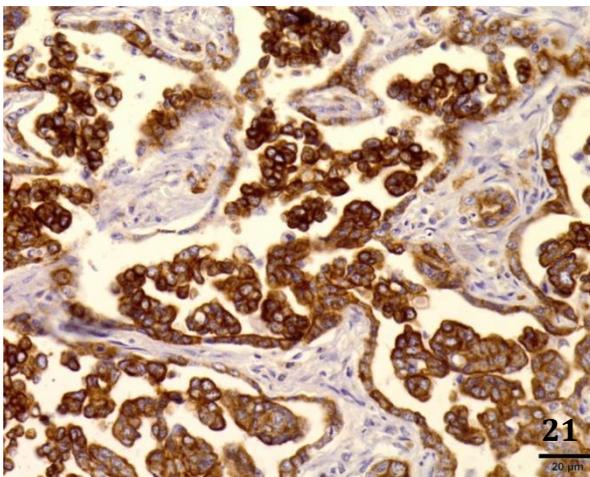
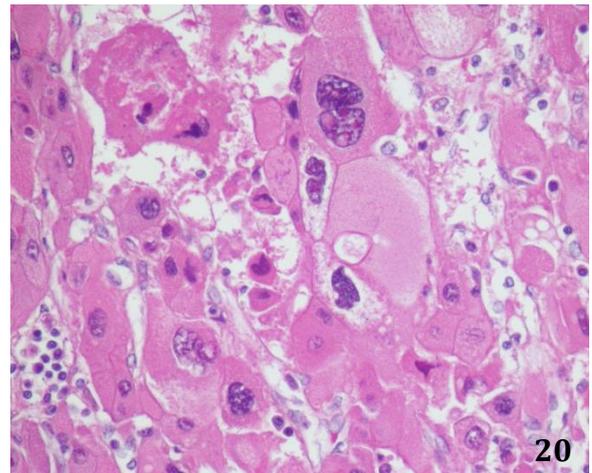
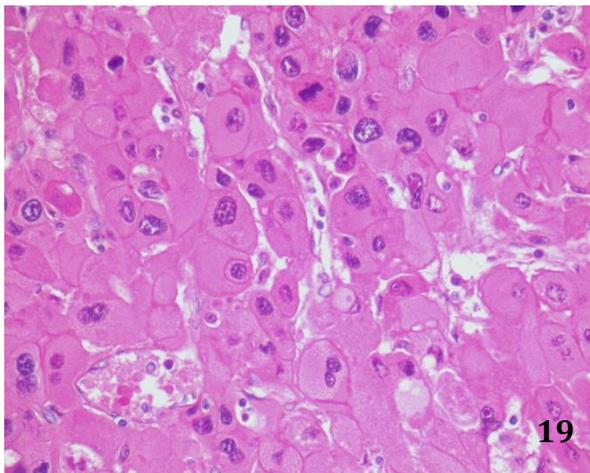


Fig.19. Fígado. Infiltrado neoplásico constituído de hepatócitos menos diferenciados e com distribuição mais densa (padrão sólido) em um cão com carcinoma hepatocelular. HE, obj.20x.

Fig.20. Fígado. Marcada atipia celular em um cão com carcinoma hepatocelular. Note a célula binucleada, a anisocitose, a anisocariose, os nucléolos conspícuos e as pseudo-inclusões de citoplasma no núcleo de um dos hepatócitos neoplásicos em um cão com carcinoma hepatocelular. HE, obj.40x.

Fig.21. A imunorreatividade para CK7 é observada na forma de uma marcação citoplasmática difusa das células neoplásicas que formam os túbulos nesse cão com colangiocarcinoma. Imuno-histoquímica (sistema de amplificação por polímero-HRP [não biotilado]), obj.20x

Fig.22. A marcação para CK7 pode ser mais bem visualizada no citoplasma apical próximo à membrana plasmática desse cão com colangiocarcinoma. Imuno-histoquímica (sistema de amplificação por polímero-HRP [não biotilado]), obj.40x.

Fig.23. A imunorreatividade para Hep Par 1 é forte e homogênea, o que facilitou muito o diagnóstico do carcinoma hepatocelular nos cães. Imuno-histoquímica (sistema de amplificação por polímero-HRP [não biotilado]), obj.20x.

Fig.24. A marcação para Hep Par 1 pode ser mais bem visualizada difusamente no citoplasma dos hepatócitos neoplásicos desse cão com carcinoma hepatocelular. Imuno-histoquímica (sistema de amplificação por polímero-HRP [não biotilado]), obj.40x.

3. REFERÊNCIAS

AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) 2010. 11th Wednesday Slide Conference, November 17th, case I: SP-09-2326 (AFIP3162243). Enviado pela Michigan State University, Diagnostic Center for Population and Animal Health, USA.

BASTIANELLO, S. S. A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the Republic of South Africa. VI. Tumours occurring in dogs. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 50, p. 199-220, 1983.

BOTTI, L. Adenocarcinomatosi epatica in cane, associate ad infestione massiva da opistorchis felinus, rivotta 1884. **Atti della Soc. Italiana delle Scienze Veterinarie**, v. 3, p. 523-526, 1954.

CHAN, E. S.; YEH, M. M. The use of immunohistochemistry in liver tumors. **Clinics in Liver Disease**, v. 14, p. 687-703, 2010.

CRAWFORD, J. M. 19. The liver and the biliary tract. In: COTRAN R. S., KUMAR V., COLLINS, T (org.). **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999, p. 759-808.

CULLEN, J. M.; POPP, J. A. Tumors of the liver and gall bladder. In: Meuten, D. J. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Ames: Iowa State Press, 2002, p. 483-508.

DE LAS MULAS, J. M. et al. Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratin and vimentin. **Research in Veterinary Science**, v. 59, p. 124-127, 1995.

FIGHERA, R. A. **Causas de morte e razões para eutanásia de cães**. 2008. 172 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

FLORES, M. M. et al. Aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p. 1319-1328, 2012.

HIRAO, K. et al. Primary neoplasms in dog liver induced by diethylnitrosamine. **Cancer Research**, v. 34, p. 1870-1882, 1974.

HAYES, H.; MORIN, M. M.; RUBENSTEIN, D. A. Canine biliary carcinoma: epidemiological comparisons with man. **Journal of Comparative Pathology**, v. 93, p. 99-107, 1983.

HEAD, K. W. et al. Histological classification of tumors of the liver and gallbladder of domestic animals. In: HEAD, K. W. et al. (Eds.). **Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2003, p. 119-130.

INKELMANN, M. A. et al. Neoplasmas do sistema urinário em 113 cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1102-1107, 2011.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69-90, 2011.

MARION, P. L. et al. Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 83, p. 4543-4546, 1986.

MING, L. et al. Dominant Role of Hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxina in hepatocarcinogenesis in quidong, China. **Hepatology**, v. 36, p. 1214-1220, 2002.

MESSOW, C. Die Lebertumoren unserer Haussäugetiere. **Wissenschaftliche Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin. Gesellschafts-und**, v. 2, p. 121-152, 1952.

MONTEROS et al. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 179-190, 1999.

MULLIGAN, R. M. Primary liver-cell carcinoma (hepatoma) in the dog. **Cancer Research**, v. 9, p. 76-81, 1949.

NELSON, A. A.; WOODWARD, G. Tumors of the urinary bladder, gall bladder and liver in dogs fed o-aminoazotoluine and p-dimethylaminoazobenzene. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 13, p. 1479-1509, 1953.

OLIVEIRA FILHO, J.C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185, 2010.

PATNAIK, A. K. et al. Canine bile duct carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 439-444, 1981a.

PATNAIK, A. K. et al. Canine hepatocellular carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 427-438, 1981b.

PATNAIK, A. K. et al. Canine hepatic carcinoids. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 445-453, 1981c.

PATNAIK, A. K.; HURVITZ, A. I.; LIEBERMAN, P. H. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. **Veterinary Pathology**, v. 17, p. 553-564, 1980.

PONOMARKOV, V.; MACKEY, L. J. XIII. Tumours of the liver and biliary system. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 53, p. 187-194, 1976.

POPPER, H. et al. Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations. **Hepatology**, v. 1, p. 91-98, 1981.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; JOHNSON, G. C. Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 636-643, 2001.

REHMTULLA, A. J. Bile duct carcinoma in a dog. **Canine Veterinary Journal**, v. 15, p. 331-334, 1974.

ROONEY, J. R. Liver carcinoma in the dog. **Acta Path**, v. 45, p. 321-330, 1959.

SHIGA, A; SHIROTA, K.; ENOMOTO, M. Combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma in a dog. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, p. 483-486, 2001.

SOUZA, T. M. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, p. 555-560, 2006.

STALKER, M. J.; HAYES, M. A. Liver and Biliary System. In: MAXIE, M. G. (Ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. New York: Saunders, 2007. v.1, p.348-353.

STROMBECK, D. R. 1978. Clinicopathologic features of primary and metastatic neoplastic disease of the liver in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, p. 267-269.

TRIGO, F. J. et al. The pathology of liver tumours in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 92, p. 21-39, 1982.

TROST, M. E. et al. Primary bone neoplasm in dogs: 90 cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1329-1335, 2012.