

Rita Moreira Furtado de Carvalho Fernandes

**A Utilidade da Reticulina no Diagnóstico do  
Carcinoma Hepatocelular num Modelo de Murganho  
e a sua Aplicação à Espécie Canina.**

Orientador: Professor Doutor Pedro Faísca

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias  
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

Rita Moreira Furtado de Carvalho Fernandes

# A Utilidade da Reticulina no Diagnóstico do Carcinoma Hepatocelular num Modelo de Murganho e a sua Aplicação à Espécie Canina.

**Dissertação defendida em provas públicas para a  
obtenção do Grau de Mestre em Medicina  
Veterinária no curso de Mestrado Integrado em  
Medicina Veterinária conferido pela Universidade  
Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 28 de  
Setembro de 2017, com o Despacho Reitoral 288/2017,  
com a seguinte composição de Júri:**

**Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso**

**Arguente: Professora Doutora Ana Faustino**

**Orientador: Professor Doutor Pedro Faísca**

**Vogal: Professora Doutora Margarida Alves**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias  
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

There is an art to science, and a science in art;  
the two are not enemies, but different  
aspects of the whole. – Isaac Asimov

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar ao professor Pedro Faísca, que desde o início do curso sempre foi uma referência e sempre me incentivou ao longo de todos estes anos, e que teve muita paciência comigo nestes últimos meses de redação da tese. Agradeço ainda pelo fornecimento dos blocos de parafina usados para obtenção das lâminas da dissertação e por todo o apoio prestado ao longo da construção da mesma e também durante o estágio curricular no Instituto Gulbenkian de Ciência.

À Inês Carvalho da DNAtch, que prontamente se disponibilizou para me fazer os cortes dos blocos quando me viu em dificuldades e que por isso estarei eternamente agradecida. À Marta e à Joana do Instituto Gulbenkian de Ciência por se mostrarem sempre disponíveis para me ajudar a fazer os cortes nos blocos de parafina e a fixar as lâminas. Muito obrigada pela vossa paciência.

Agradeço a toda a equipa do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária do Tennessee pelo carinho com que me acolheram e pela sincera disponibilidade para ensinar e transmitir conhecimentos durante o meu estágio curricular. Ao pessoal do Instituto Gulbenkian de Ciência, especialmente ao grupo da histopatologia, por me mostrar um pouco de como se faz investigação nos dias que correm. Um especial agradecimento também dirigido a toda a equipa do Hospital Veterinário de Berna pelos fantásticos três meses de estágio extracurricular onde aprendi tudo o que pude, não só sobre oncologia mas também sobre todos os outros ramos da Medicina Veterinária.

Às minhas amigas de curso Ana Sofia, Marta, Sofia e Melissa, que transformaram os meus dias destes últimos anos numa aventura cheia de diversão que guardo carinhosamente no coração e que estiveram sempre presentes para me apoiar.

À Marie por desde o início me incentivar e por ser a melhor das melhores amigas e à Catarina por me aturar há vinte anos.

Finalmente, e não menos importante, agradeço aos meus pais e avós pelo apoio moral e financeiro, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse realizar os meus sonhos e ser quem hoje sou. À minha Amora e Oreó, as minhas cadelas lindas. Sem vocês não teria sido a mesma coisa.



## Resumo

Os tumores hepáticos são a segunda causa de morte relacionada com cancro em seres humanos. Já no cão, o carcinoma hepatocelular é raro mas o prognóstico é igualmente mau.

Os critérios histopatológicos para o diagnóstico do carcinoma hepatocelular não estão bem estabelecidos, especialmente no caso dos tumores bem diferenciados, podendo-se tornar estes casos um desafio. Por esse motivo, o papel da reticulina no diagnóstico de carcinomas hepatocelulares na Medicina Humana já é utilizado de forma relativamente recorrente.

O presente trabalho teve como objetivo determinar qual a utilidade da reticulina no diagnóstico do carcinoma hepatocelular num modelo de murganho e qual a sua aplicação à espécie canina.

Avaliou-se de forma qualitativa e quantitativa a capacidade da reticulina para diferenciar os tumores dos focos de displasia e fígado saudável em murganhos. No cão foi comparado o padrão de reticulina apresentado por carcinomas hepatocelulares, hiperplasias nodulares e cirrose.

Verificou-se que no murganho as fibras coradas a negro estão empurradas para a periferia do tumor, comprimidas de encontro ao tecido adjacente, formando uma rede compacta que permite estabelecer limites bastante precisos do anterior.

No cão, os padrões apresentados nas mais variadas lesões assemelham-se ao que está descrito na literatura em Medicina Humana.

A reticulina pode assim ser um importante auxílio na diferenciação do carcinoma hepatocelular de lesões benignas, devendo no entanto ser utilizada com cautela e suportar o diagnóstico feito pela hematoxilina e eosina.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular, reticulina, displasia hepática, hiperplasia nodular.

## **Abstract**

Hepatic tumors are the second leading cause of cancer-related death in humans. In the dog, hepatocellular carcinoma is rare but the prognosis is equally bad.

Histopathological criteria for the diagnosis of hepatocellular carcinoma are not well established. For this reason, the role of reticulin in the diagnosis of this tumor in human medicine has been gaining ground.

The aim of the present study was to determine the usefulness of reticulin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma in a mouse model and its application to the canine species.

The ability of reticulin to differentiate tumors from foci of dysplasia and healthy liver in mice was qualitatively and quantitatively evaluated. In the dog the reticulin pattern presented by hepatocellular carcinomas, nodular hyperplasia and cirrhosis was compared.

It was noted that in the mouse the fibers are pushed to the periphery of the tumor, compressed against the adjacent tissue, forming a compact net that allows establishing quite precise limits of the carcinomas. In the dog, the patterns presented in the most varied lesions resemble what is described in the literature in human medicine.

Reticulin may thus be an important aid in the differentiation of hepatocellular carcinoma from benign lesions, but should be used with caution and support the diagnosis made by hematoxilin and eosin.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma, reticulin, dysplasia foci, nodular hyperplasia.

## **Abreviaturas, siglas e símbolos**

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AHC – Adenoma hepatocelular

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CFL – Carcinoma fibrolamelar

CHC – Carcinoma hepatocelular

CLE – Carcinoma linfoepitelial

DEN – Dietilnitrosamina

Fig. – Figura

GS – Glutamina sintetase

GPC-3 – Glypican 3

HE – Hematoxilina e eosina

HSP70 - Proteína de choque térmico 70

Obj. – Objetiva

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

RM – Ressonância magnética

TC – Tomografia computadorizada

## Índice Geral

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	11
INDICE DE TABELAS.....	12
CASUÍSTICA DOS ESTÁGIOS CURRICULARES.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Epidemiologia.....	18
1.1.1 Idade.....	18
1.1.2 Raça.....	19
1.1.3 Género.....	19
1.1.4 Localização.....	19
1.2 Etiologia.....	20
1.3 Apresentação clínica.....	21
1.4 Diagnóstico.....	21
1.4.1 Aspeto macroscópico.....	23
1.4.2 Princípios da hepatocarcinogénese e lesões precursoras.....	24
1.4.3 Histopatologia.....	24
1.5 Diagnósticos diferenciais.....	27
1.5.1 Hiperplasia nodular.....	27
1.5.2 Nódulos regenerativos.....	28
1.5.3 Adenomas hepatocelulares.....	28
1.6 Outros tumores hepáticos.....	29
1.6.1 Adenoma colangiocelular.....	29

1.6.2 Carcinoma colangiocelular.....	30
1.6.3 Tumores carcionóides.....	31
1.7 Neoplasias mesenquimatosas primárias do fígado.....	31
1.8 Metástases hepáticas.....	32
1.9 Reticulina.....	32
1.10 Os murganhos como modelo de carcinoma hepatocelular de seres humanos.....	35
1.10 Objetivos.....	35
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
2.1 Murganhos e processamento histológico.....	37
2.1.1 Coloração com Reticulina.....	39
2.1.2 Avaliação da Coloração.....	40
2.1.3 Análise Estatística.....	40
2.2 Cão.....	40
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina em fígados controlo de murganho.....	42
3.2 Avaliação qualitativa da capacidade da coloração da reticulina em diferenciar focos de displasia de carcinomas hepatocelulares.....	42
3.3 Avaliação quantitativamente da capacidade das fibras de reticulina em delimitar os tumores e ajudar a medir a sua área.....	46
3.4 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no fígado controlo de cão.....	51
3.5 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no caso de hiperplasia nodular canina.....	51
3.6 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no caso de hepatite crónica canina.....	52

3.7 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no caso de carcinoma hepatocelular canino.....	54
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÃO.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7. ANEXOS.....	I

### **Índice de Figuras**

Figura 1: Contagem de nódulos no parênquima hepático de murganho. A) Formação nodular clara que se projeta da superfície hepática. B) Displasia em que não se observa qualquer formação nodular e não existe nenhuma superfície sub-macroscópica irregular).....	38
Figura 2: Marcação da reticulina num fígado saudável de murganho.....	42
Figura 3: Disposição das fibras de reticulina em casos de focos de displasia hepatocelular em murganho.....	43
Figura 4: Os tumores hepatocelulares em murganhos são na sua maioria bem diferenciados graças à rede de fibras de reticulina que é empurrada para a periferia dos nódulos.....	44
Figura 5: A) Carcinoma hepatocelular em murganho onde se observa uma quase total ausência de fibras de reticulina no interior do tumor. B) Carcinoma hepatocelular em murganho onde se observa uma disposição das fibras de reticulina no interior do tumor semelhante ao tecido hepático adjacente.....	45
Figura 6: A) Dois nódulos visíveis no parênquima hepático. B) Mesmo corte da imagem anterior. Presença de estrutura nodular mal delimitada.....	47
Figura 7: Marcação da reticulina num fígado saudável de cão.....	51

Figura 8: A) Disposição das fibras de reticulina em casos de hiperplasia nodular hepatocelular em cão. B) Disposição das fibras de reticulina em casos de hiperplasia nodular hepatocelular em cão.....52

Figura 9: Zonas de necrose na hepatite crónica canina. A) Com a coloração de hematoxilina e eosina é possível observar as áreas necróticas, com deposição de macrófagos “ceroid-laden”. B) Com a coloração de Gordon & Sweet observa-se uma ausência de fibras de reticulina nessas mesmas zonas.....53

Figura 10: Zonas de fibrose na hepatite crónica canina. A) Com a H&E é possível observar que as zonas onde há maior deposição de fibrose são a nível central-central. B) Observa-se um colapso das fibras de reticulina nas áreas de fibrose.....54

Figura 11: Disposição anormal das fibras de reticulina no carcinoma hepatocelular bem diferenciado no cão.....55

Figura 12: Disposição das fibras de reticulina no carcinoma hepatocelular indiferenciado no cão.....56

## Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição do tempo dedicado a cada rotação no John and Ann Tickle Small Animal Hospital.....14

Gráfico 2: Distribuição dos tumores observados durante a rotação de Oncologia em cães.....15

Gráfico 3: Distribuição dos tumores observados durante a rotação de Oncologia em gatos.....15

Gráfico 4: Distribuição relativa das consultas assistidas durante a rotação de Medicina Interna em cães.....16

Gráfico 5: Distribuição relativa das consultas assistidas durante a rotação de Medicina Interna em gatos.....16

Gráfico 6: Distribuição relativa das consultas assistidas durante a rotação de Neurologia em cães.....17

Gráfico 7: Contagem de nódulos por lobos hepáticos com a coloração hematoxilina e eosina.....48

Gráfico 8: Contagem de nódulos por lobos hepáticos com a coloração da reticulina.....48

### **Índice de Tabelas**

Tabela 1: Área ocupada pelos nódulos no parênquima hepático de murganho nas lâminas coradas a hematoxilina e eosina.....49

Tabela 2: Área ocupada pelos nódulos no parênquima hepático de murganho nas lâminas coradas com reticulina.....50



## **Casuística dos Estágios Curriculares**

A primeira metade do estágio curricular foi realizado no John and Ann Tickle Small Animal Hospital na Universidade do Tennessee, Estados Unidos. Esta experiência teve a duração de 12 semanas, de 06 de Novembro de 2016 a 29 de Janeiro de 2017, e permitiu um total de 660 horas de contacto.

Este estágio foi dividido em rotações com diferentes durações, o que levou a um contacto com diversos serviços e especialidades do mundo da veterinária, tornando assim possível consolidar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo dos últimos cinco anos de curso e entender melhor a dinâmica de uma grande infraestrutura de referência.

As rotações nas quais participei incluíram quatro semanas de Oncologia, três semanas de Anestesia, duas semanas de Imagiologia e Neurologia e uma semana de Medicina Interna. A rotação de Oncologia foi a mais longa uma vez que se trata da minha principal área de interesse (Gráfico 1).

Durante o estágio era nossa responsabilidade a realização do primeiro contacto com os pacientes, recolha de história clínica e exame físico, proposta de exames complementares e apresentação de um plano de diagnóstico ou tratamento aos médicos e acompanhamento dos pacientes durante a realização de tais exames sempre que possível. O contacto constante com os donos era primariamente realizado pelos estagiários e o tratamento dos animais internados era da nossa responsabilidade às sete da manhã e às sete da tarde, e sempre que se justificasse. A administração de fármacos quimioterápicos em Oncologia era opcional para os alunos mas por diversas vezes administrei tais medicações sob a orientação das auxiliares de enfermagem. A redacção de folhas de alta, solicitação de exames complementares e acompanhamento da evolução dos pacientes também se encontrava sob a nossa responsabilidade.

Na área da Anestesia era nossa obrigação apresentar um protocolo sensato para cada caso e foi-nos permitido utilizar uma variedade imensa de combinações de fármacos. A colocação de catéteres, intubação e monitorização constante durante a anestesia, bem como o registo de todos os eventos eram realizados pelos estagiários, sempre com orientação de médicos veterinários e auxiliares. A realização de epidurais e outros bloqueios nervosos também foi possível durante este estágio.

Na área da Imagiologia eram pontos de especial atenção o posicionamento dos pacientes no caso das radiografias e a discussão de casos clínicos nas modalidades de radiografia, ecografia, TC, RM e cintigrafia.

Todos os dias em todas as rotações eram discutidos os casos desse mesmo dia e era abordado um determinado tema ou doença.

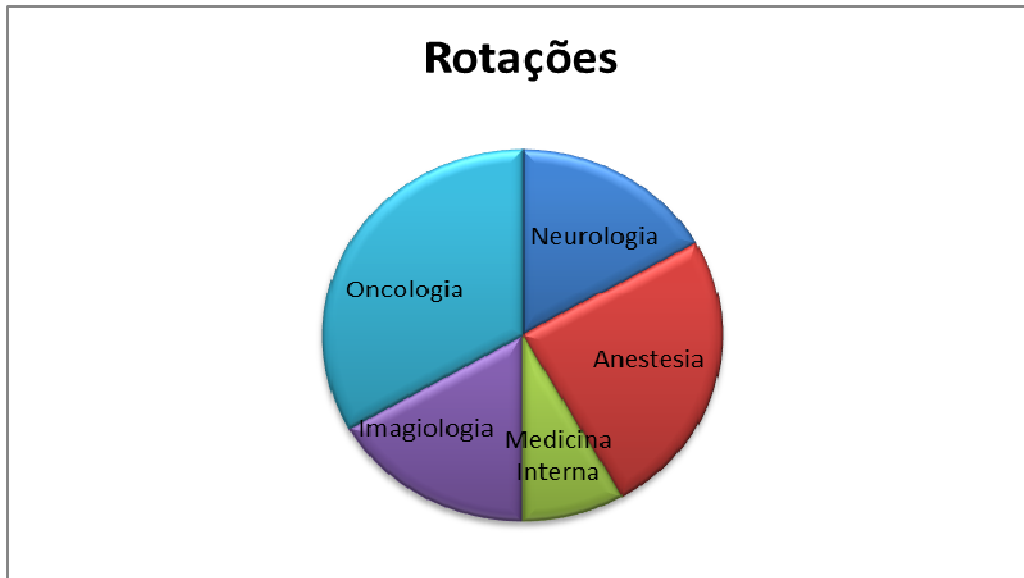


Gráfico 1 – Distribuição do tempo dedicado a cada rotação no John and Ann Tickle Small Animal Hospital.

Os gráficos 2 e 3 fazem referência às neoplasias mais frequentes em cães e gatos, respetivamente. Já os gráficos 4 e 5 mostram a distribuição das consultas assistidas durante a rotação de Medicina Interna em cães e em gatos, respetivamente. O gráfico 6 faz alusão às consultas assistidas durante a rotação de Neurologia.

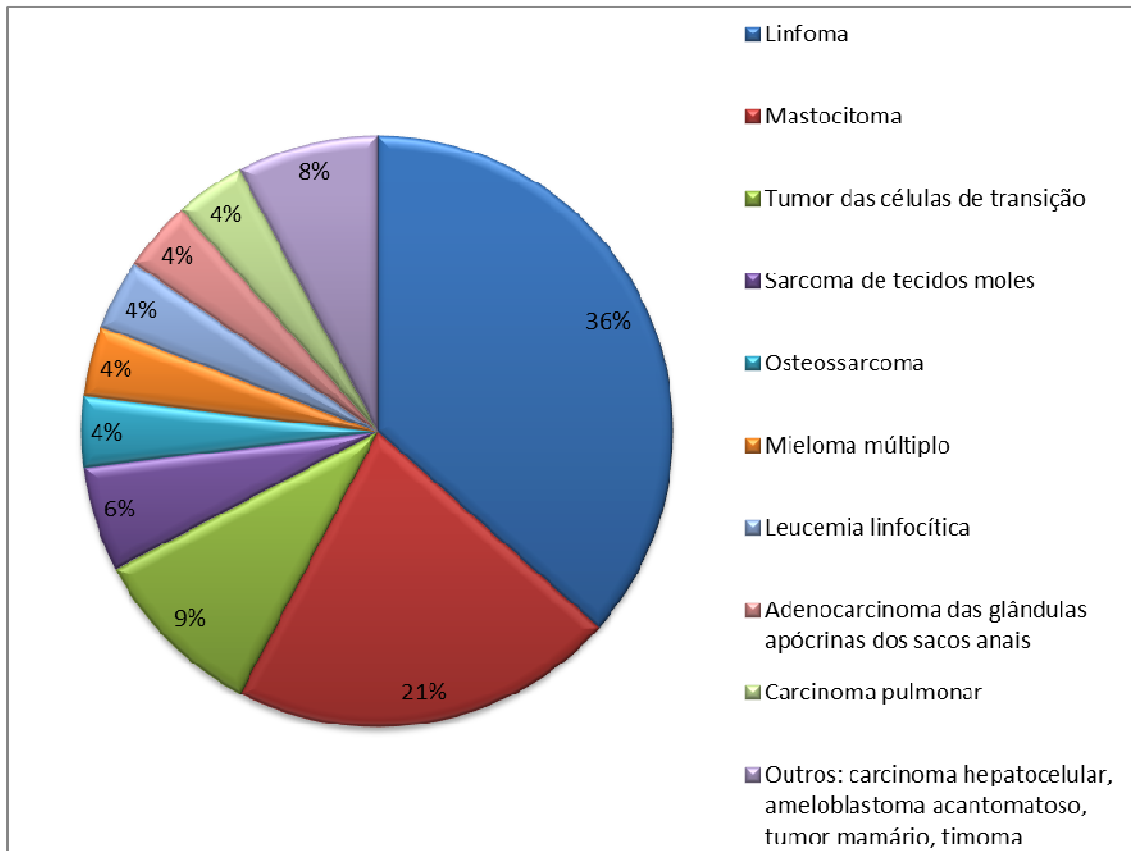


Gráfico 2 – Distribuição das neoplasias observadas durante a rotação de Oncologia em cães.

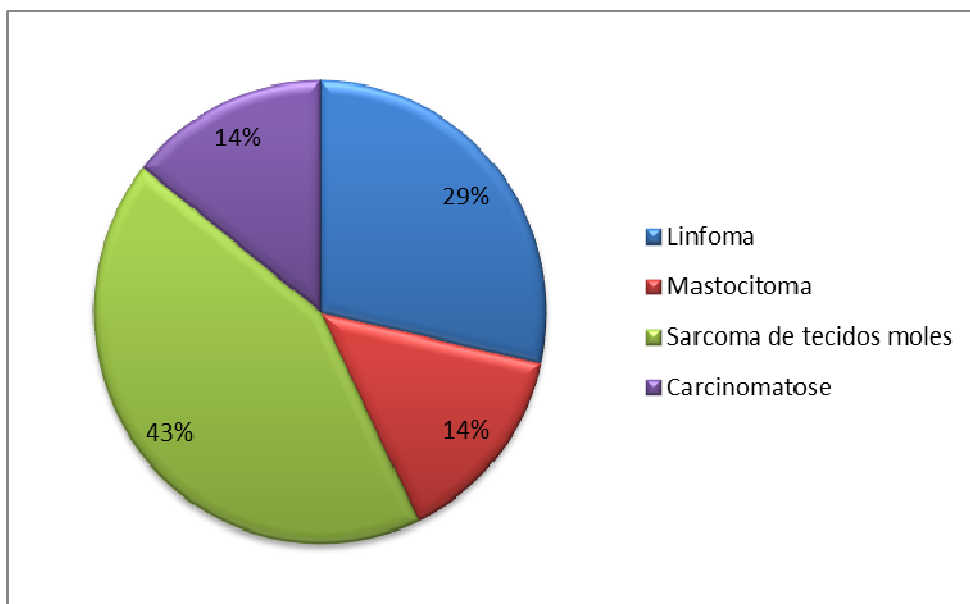


Gráfico 3 – Distribuição das neoplasias observadas durante a rotação de Oncologia em gatos.

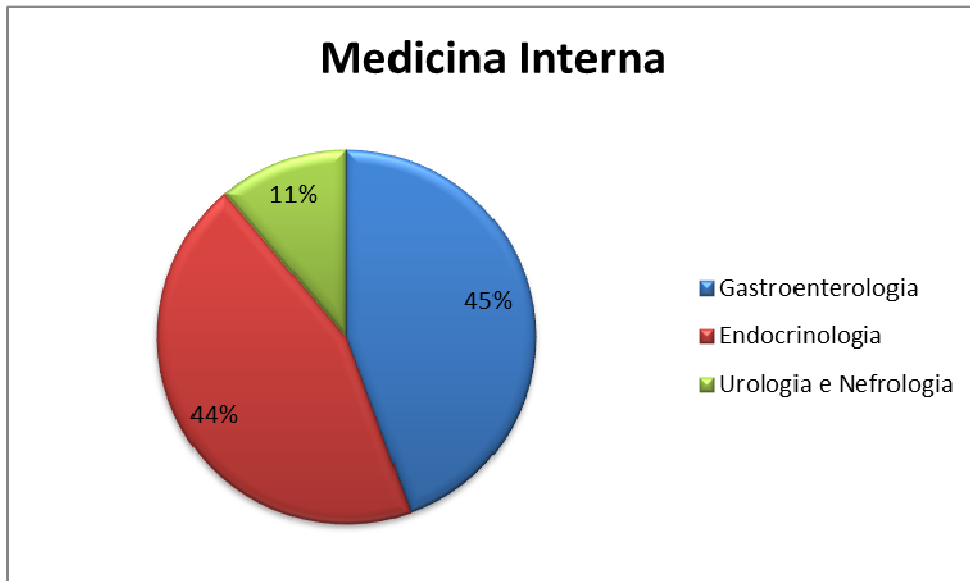


Gráfico 4 – Distribuição relativa das consultas assistidas durante a rotação de Medicina Interna em cães.

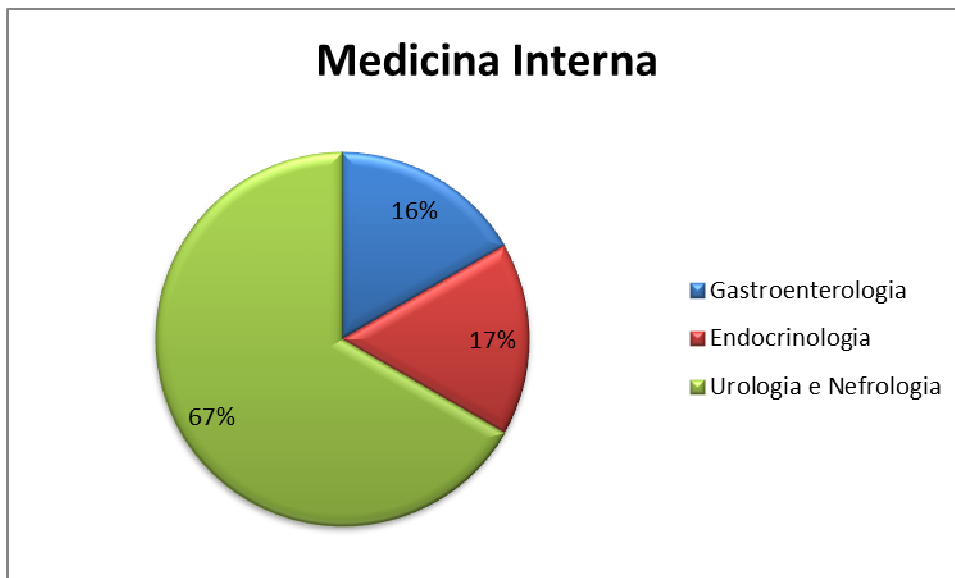


Gráfico 5 – Distribuição relativa das consultas assistidas durante a rotação de Medicina Interna em gatos

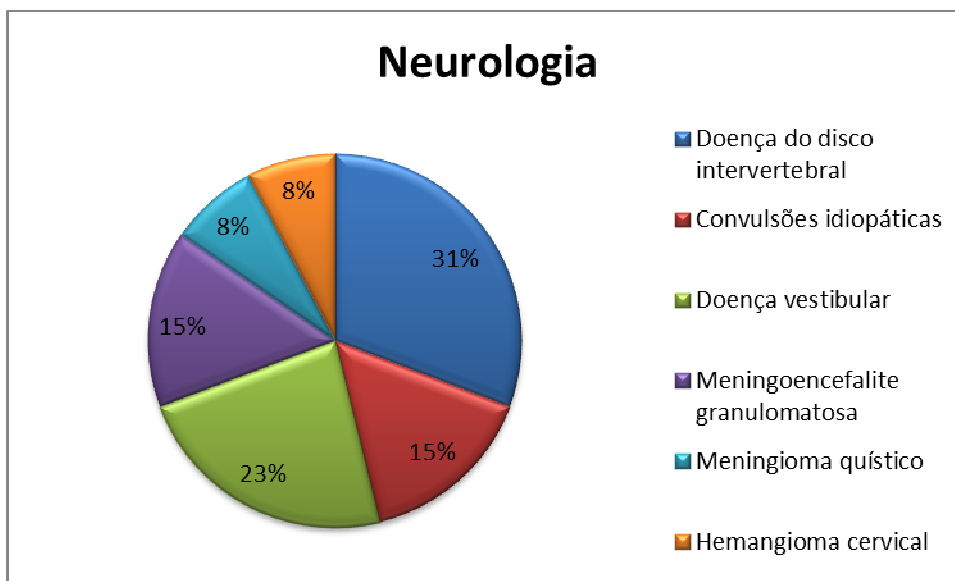


Gráfico 6 – Distribuição relativa das consultas assistidas durante a rotação de Neurologia em cães

Durante a rotação de Neurologia apenas foi consultado um gato com síndrome vestibular periférica.

A segunda metade do estágio curricular decorreu no Instituto Gulbenkian de Ciência, na área da Histopatologia, numa vertente mais inclinada para a investigação científica. O estágio teve a duração de 14 semanas com um horário de trabalho de dois dias e meio por semana, perfazendo um total de 240 horas de contacto.

Durante este estágio foram estudados a nível histopatológico diversos órgãos de modelos de rato para diferentes doenças, nomeadamente, modelos de sépsis, de carcinomas hepatocelulares (CHC), transformação de tecido adiposo branco em tecido adiposo castanho, modelos de miocardite imunomediada, modelos de auto-imunidade, isquémia renal com reperfusão posterior, modelos de colites e modelos de infecções pulmonares. Também foram avaliadas alterações histopatológicas em modelos de peixe zebra mutantes para pesquisa de inflamação ou outros sinais de doença. A *Drosophila melanogaster* foi igualmente um modelo utilizado para avaliar a presença de vacúolos e o tamanho do cérebro em animais jovens e adultos, com ou sem mutação.

## **1. Introdução**

Os tumores de fígado são a quinta doença mais prevalente e a segunda causa de morte relacionada com cancro em seres humanos no mundo inteiro. Caracterizados com uma alta taxa metastática e de recorrência, baixa taxa de detecção para os estadios curáveis e opções terapêuticas ineficazes, os tumores de fígado, na sua maioria CHC, são consensualmente consideradas neoplasias com mau prognóstico (Torre *et al.*, 2015).

Devido às semelhanças fisiológicas e genéticas entre roedores e humanos, a curta vida útil, a capacidade de reprodução e a variedade de métodos de manipulação, os roedores são frequentemente utilizados para a investigação na área da oncologia. No entanto, apesar de estar disponível uma vasta gama de modelos de roedores para o estudo do cancro do fígado, a universalidade de cada modelo é limitada por vários factores tais como a complicada etiologia dos processos neoplásicos ou a capacidade que cada modelo tem para mimetizar na íntegra todas etapas da carcinogénese dos tumores hepáticos a nível do ser humano (He *et al.*, 2015).

Os tumores primários do fígado são incomuns em cães e representam apenas 0,6% a 1,3% de todas as neoplasias caninas (Patnaik *et al.*, 1980). O tumor primário mais comum do fígado é o carcinoma hepatocelular (CHC), embora outros tumores malignos possam ocorrer, incluindo o carcinoma do ducto biliar e sarcomas (Magne e Withrow, 1985).

A hiperplasia nodular é um diagnóstico relativamente comum em cães mais velhos, sendo que é uma lesão benigna e sem evidência de ser neoplásica (Liptak, 2013).

### **1.1 Epidemiologia**

#### **1.1.1 Idade**

Na maioria das populações ocidentais de baixo risco, as taxas mais elevadas de neoplasias hepáticas ocorrem em pessoas com 75 anos ou mais. Um padrão semelhante é observado entre a maioria das populações asiáticas de alto risco (por exemplo, Hong Kong). Em contraste, as taxas masculinas em populações africanas de alto risco (por exemplo, Gâmbia, Mali) tendem a atingir o pico entre os 60 e os 65 anos antes de

diminuir. As taxas femininas atingem um pico entre 65 e 70 anos antes de decrescerem (Nordenstedt *et al.*, 2010).

A idade média dos cães com carcinoma hepatocelular num estudo de Patnaik *et al.* em 1981 foi de 11 anos; 80% dos animais tinham 10 anos ou mais.

### **1.1.2 Raça**

Na mesma amostra de Patnaik *et al.* (1981), as neoplasias hepáticas foram distribuídas entre 18 raças diferentes sem ter sido encontrada nenhuma predominância de raça. Os schnauzers em miniatura estão no entanto sobre-representados em alguns estudos (Patnaik *et al.*, 1980; Liptak *et al.*, 2004).

### **1.1.3 Género**

A nível dos seres humanos, em quase todas as populações, existe uma maior prevalência de tumores de fígado em homens do que em mulheres, sendo que os rácios masculino: feminino geralmente se situam entre 2: 1 e 4: 1. Tal pode ser explicado por haver prevalências mais elevadas de neoplasias em homens em geral e pelo facto das cirroses alcólicas, uma das principais etiologias do CHC, serem mais prevalentes entre a população masculina (Nordenstedt *et al.*, 2010).

No cão, observa-se igualmente uma predominância em machos, com uma proporção feminina de 1.7:1 (Patnaik *et al.*, 1981). Os cães machos estão também sobre-representados em outros estudos, apesar de não ser conhecida nenhuma predisposição relativamente ao género do animal (Evans, 1987).

### **1.1.4 Localização**

A morfologia dos CHC está descrita como podendo ser maciça em 53 a 83% dos casos, nodular em 16 a 25% das lesões ou difusa em até 19% das ocorrências (Cullen *et al.*, 2002). As diferenças entre estas três apresentações encontram-se no facto do carcinoma maciço ser um nódulo único e grande, o nodular se apresentar como múltiplos nódulos mais pequenos e o difuso se caracterizar por nódulos indistintos distribuídos um pouco por todo o parênquima hepático (Watson *et al.*, 2010).

No estudo de Patnaik *et al.* (1981) que incluiu 55 exemplares de CHC, 61% dos cães tinham lesões maciças envolvendo um único lobo, mais comumente o lobo lateral esquerdo. Em 80% destes, havia lesões em outros lobos também. Os lobos lateral direito e central também apresentavam lesões maciças.

As lesões eram nodulares em 29% dos casos e difusas em 10% . Vários lobos hepáticos estavam envolvidos em ambos os tipos de lesões. As neoplasias eram desde acinzentadas a castanho e apresentavam extensas áreas de hemorragia e necrose. Embora os tumores estivessem bem delineados na maioria dos casos com lesões não difusas, muitas vezes era difícil distinguir o tecido normal do fígado das áreas neoplásicas (Patnaik *et al.*, 1981).

Noutro estudo mais recente, verificou-se que estes lobos, que incluem os lobos laterais e médios esquerdos e o processo papilar do lobo caudado, estão envolvidos em mais de dois terços dos CHC maciços (Liptak, 2013).

Outro estudo radiográfico de lesões hepáticas sugere que a maior parte das massas do fígado se localizam ventralmente do lado direito (Evans, 1987).

## 1.2 Etiologia

As principais etiologias do CHC estão bem definidas nos seres humanos. A hepatite viral crónica B, C e D, toxinas (por exemplo, álcool, aflatoxinas), doenças hepáticas metabólicas hereditárias (por exemplo, hemocromatose hereditária, deficiência de  $\alpha$ -1-antitripsina), hepatite auto-imune, esteatohepatites não alcoólicas ou doença do fígado gordo não alcoólica estão entre as principais causas de desenvolvimento do CHC (Blum, 2005).

Entre outros fatores conhecidos também se incluem um índice de massa corporal elevado, em especial nos homens, e a diabetes mellitus (Mittal *et al.*, 2013).

No entanto, o principal fator de risco clínico para o desenvolvimento de CHC é a cirrose hepática, uma vez que 70-90% dos carcinomas se desenvolvem em fígados cirróticos. A maioria dos CHCs ocorre após muitos anos de hepatite crónica. Esta fornece ambientes propícios a mutações que precipitam alterações genéticas aleatórias, resultando na transformação maligna de hepatócitos e no desenvolvimento do CHC (Blum, 2005).



Nos cães, não foi comprovada a existência de fatores etiológicos e a cirrose é rara em cães com CHC (Liptak, 2013).

### **1.3 Apresentação clínica**

Os tumores hepatobiliares são sintomáticos em aproximadamente 75% dos cães, especialmente em animais com tumores malignos. Os sinais de apresentação mais comuns são muitas vezes inespecíficos (Morrison, 2002). A hepatomegalia, letargia, fraqueza, anorexia e vômitos são os sinais clínicos mais comuns encontrados em animais com CHC. Outros sinais vistos com menos frequência incluem diarreia, icterícia, ascite, dispneia, perda de peso, convulsões, mielopatia, melena e anemia (Patnaik *et al.*, 1981). A fraqueza, a ataxia e as convulsões são incomuns e podem ser causadas por encefalopatia hepática, hipoglicemia paraneoplásica ou por metástases no sistema nervoso central (Liptak, 2013).

O hemoperitoneu secundário à ruptura de CHC maciço foi relatado em dois cães (Arohson *et al.*, 2009).

As metástases para linfonodos regionais, peritoneu e pulmão são mais comuns em cães com carcinoma nodular ou difuso, comparativamente ao carcinoma maciço, no qual existe apenas uma lesão única. Outros locais metastáticos incluem o coração, rins, glândulas adrenais, pâncreas, intestinos, baço e bexiga (Cullen, 2002). A taxa metastática varia de 0% a 37% para cães com CHCs maciços e 93% a 100% para cães com CHCs nodulares e difusos (Liptak, 2013).

### **1.4 Diagnóstico**

Nos seres humanos, a laparoscopia está recomendada para estadiamento local, uma vez que até 20% dos casos não seguem para cirurgia de abdómen aberto por causa de tumores nodulares ou difusos não ressecáveis. No entanto, para massas hepáticas solitárias e sólidas, a ressecção cirúrgica pode ser realizada sem uma biópsia pré-operatória porque tanto o diagnóstico como o tratamento podem ser alcançados num único procedimento (Liptak, 2013).

Técnicas avançadas de imagem, como TC e RM, são preferidas em humanos para o diagnóstico e estadiamento de tumores hepáticos (Bartlett *et al.*, 2005). Ao

contrário do que acontece na ecografia, a aparência da imagem pode fornecer uma indicação do tipo de tumor. Além disso, a TC e a RM são mais sensíveis para a deteção de pequenas lesões hepáticas e determinam a relação de massas hepáticas com estruturas vasculares e de tecidos moles adjacentes (Liptak, 2013). As lesões de CHC geralmente são hipocogénicas em relação ao tecido circundante quando menores de 3 cm. As lesões maiores geralmente são hiperecóticas com um padrão de infiltração ou mosaico que pode estar rodeado por uma fina cápsula fibrótica hipocótica (Bialecki, 2005).

Uma massa abdominal cranial é palpável em até três quartos dos cães com tumores hepáticos, embora a palpação possa ser enganadora uma vez que a silhueta hepática pode estar normal nas formas nodulares e difusas de tumores hepáticos ou o seu aumento pode não ser perceptível devido à posição cranial do fígado (Liptak, 2013). As alterações hematológicas e bioquímicas séricas geralmente não são específicas. A leucocitose, anemia não regenerativa leve e trombocitose são comuns em cães com tumores hepáticos (Moulton, 1990). As enzimas hepáticas estão comumente elevadas em cães com tumores hepatobiliares (Morrison, 2002). O aumento da atividade das enzimas hepáticas provavelmente reflete danos hepatocelulares ou estase biliar e não é específico para neoplasia hepática. Também não há correlação entre o grau de envolvimento hepático e a magnitude das alterações enzimáticas (Thamm, 2001). O tipo de enzima hepática aumentada também pode permitir suspeitar de um determinado tumor hepático ou de metástases. Enquanto a fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) estão geralmente aumentadas em cães com tumores hepáticos primários, a aspartato aminotransferase (AST) e a bilirrubina estão elevadas de forma mais consistente em cães com tumores metastáticos do fígado (Liptak, 2013). Além disso, uma relação AST/ALT inferior a 1 é consistente com CHC ou carcinoma do ducto biliar, enquanto que um tumor neuroendócrino ou um sarcoma é mais provável quando a proporção é maior que 1 (Liptak, 2013). Em geral, no entanto, as elevações das enzimas hepáticas não são específicas para o diagnóstico de doenças hepatobiliares (Thamm, 2001).

Outras alterações no perfil bioquímico em cães com tumores hepáticos podem incluir hipoglicemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e aumento de ácidos biliares pré e pós-prandiais (Liptak, 2013).

Num estudo realizado em 1981 por Patnaik *et al.*, 66% dos cães da amostra tinham leucocitose e foram observadas baixas contagens de glóbulos vermelhos com baixos valores de hemoglobina em 54% dos casos. Os testes de função hepática eram anormais em quase todos os cães. A ALP sérica estava elevada em 89% dos casos, ALT em 80%, AST em 56% e desidrogenase láctica em 38%. A bilirrubina total estava superior ao normal em 28%, e os valores de proteína total encontravam-se elevados em 26%. Apenas um cão deste estudo teve hipoglicémia (Patnaik *et al.*, 1981).

A radiografia, ecografia e imagiologia avançada podem ser usadas para o diagnóstico, estadiamento e planeamento cirúrgico de cães com tumores hepatobiliares. Uma massa abdominal cranial, com deslocamento caudal e lateral do estômago, é frequentemente observada em radiografias abdominais de gatos e cães com tumores hepáticos maciços (Feeney *et al.*, 1984).

A ecografia abdominal é o método preferido para identificar e caracterizar tumores hepatobiliares em gatos e cães. O exame ecográfico é útil na determinação da presença de massa hepática e na definição do tumor como maciço, nodular ou difuso (Vörös, 1991).

A punção por agulha fina (PAAF) guiada por ecografia ou a biópsia por *tru-cut* de massas hepáticas é uma técnica útil e minimamente invasiva para obter amostras de células ou tecidos para fins de diagnóstico. Um diagnóstico correto é obtido em até 60% dos aspirados hepáticos e 90% das biópsias com *tru-cut*. Técnicas mais invasivas, como a laparoscopia ou cirurgia convencional, também podem ser usadas para a biópsia e estadiamento de animais com suspeita de tumores hepáticos (Liptak, 2013).

A  $\alpha$ -fetoproteína, uma glicoproteína oncofetal, é utilizada no diagnóstico, monitorização de resposta ao tratamento e prognóstico de CHC em seres humanos. Em cães, os níveis séricos de  $\alpha$ -fetoproteína aumentam em 75% dos casos aquando destes tumores e em 55% em casos de carcinomas do ducto biliar (Yamada *et al.*, 1999). Contudo, a  $\alpha$ -fetoproteína tem um valor limitado no diagnóstico e monitorização do tratamento do CHC canino uma vez que os níveis séricos desta proteína também se apresentam aumentados noutros tipos de tumores hepáticos, como o carcinoma e o linfoma do ducto biliar, bem como na doença hepática não neoplásica (Hahn e Richardson, 1995).

### **1.4.1. Aspeto macroscópico**

O CHC humano forma tipicamente massas de aparência macroscópica heterogénea, com focos de hemorragia ou necrose. Podem ser individuais ou múltiplas, com um tamanho que varia de menos de 1 cm a mais de 30 cm. Geralmente, em casos de cirrose, o tamanho do CHC é menor em comparação com os desenvolvidos no fígado não fibrótico (Paradis, 2013).

Ao contrário do carcinoma em cães, a morfologia do CHC em seres humanos é frequentemente nodular ou difusa, o que torna o tratamento definitivo mais problemático (Liptak, 2013).

### **1.4.2 Princípios da hepatocarcinogénese e lesões precursoras**

Nos seres humanos, cerca de 90% dos casos de CHC surgem como complicações de doença, isto é, cirrose hepática crónica com a fibrose a desempenhar um importante papel predisponente. O CHC geralmente ocorre após uma sequência de vários passos de lesões morfológicamente reconhecíveis (Farazi e DePinho, 2006).

O processo hepatocarcinogénico é caracterizado principalmente pelo aparecimento de lesões displásicas (fase displásica) sob a forma de focos microscópicos (com alterações celulares mais ou menos evidenciáveis) e nódulos displásicos macroscópicos (baixo e alto grau) (Grupo de Consenso Internacional para Neoplasia Hepatocelular, 2009). Esta fase é muito importante porque os pacientes portadores destas lesões estão em maior risco de desenvolver CHC, permitindo a deteção precoce do tumor e consequentemente aumentando o tempo de sobrevivência. A possibilidade de desenvolvimento de CHC sem antecedentes pré-malignos é rara, mas não pode ser excluída (Roncalli *et al.*, 2010).

A vigilância de pacientes cirróticos com deteção precoce de CHC mostrou que os nódulos displásicos de alto grau são os precursores mais avançados deste carcinoma e que os CHC pequenos e bem diferenciados com margens indistintas (carcinomas precoces) são as primeiras e mais pequenas formas de CHC reconhecidas e têm geralmente menos de 2 cm (Roncalli *et al.*, 2010).

### 1.4.3 Histopatologia

Na histologia, a característica principal do CHC humano é a sua semelhança com o fígado normal. O CHC é geralmente um tumor hipervascularizado que mostra diferentes graus de diferenciação hepatocelular variando de bem a pouco diferenciado. Esta diferenciação baseia-se nas características arquitetónicas e citológicas. Diferentes padrões histológicos podem ser observados: o padrão de crescimento trabecular em que os hepatócitos tumorais estão dispostos em placas de várias espessuras, separadas por espaços vasculares sinusóides, o padrão acinar ou pseudoglandular, no qual se observa uma dilatação dos canálculos do tipo glandular entre células tumorais ou degenerescência central das trabéculas (lúmen contendo principalmente fibrina) e o padrão compacto ou sólido composto de trabéculas espessas comprimidas numa massa sólida (Paradis, 2013).

É cada vez mais reconhecido que os subtipos morfológicos do carcinoma do fígado vão muito para além das óbvias distinções entre o hepatocelular e o colangiocarcinoma. Os subtipos comumente aceites são o carcinoma fibrolamelar (CFL), o carcinoma esquirroso, o carcinoma sarcomatóide e o chamado carcinoma inflamatório ou carcinoma linfoepitelial (CLE) (Brunt, 2012).

As diretrizes internacionais atuais recomendam a biópsia do fígado para provar a malignidade de nódulos de 1-2 cm que são equívocos aquando da realização de exames imagiológicos. A histologia precoce do CHC é a de uma neoplasia hepatocelular bem diferenciada com aumento da densidade celular em relação ao ambiente e um padrão trabecular irregular e ocasionalmente pseudoglandular. Esta histologia coloca, particularmente na biópsia hepática, problemas de diagnóstico diferencial, principalmente com antecedentes imediatos, isto é, nódulos displásicos de alto grau. Estes diagnósticos diferenciais podem ser posteriormente analisados para exclusão ou confirmação dos mesmos, tanto em espécimes cirúrgicos como na biópsia hepática, utilizando para tal a morfologia histológica, a histoquímica e imunocitoquímica (Roncalli *et al.*, 2010).

O mesmo autor refere que actualmente existem três ferramentas para fazer o diagnóstico de CHC precoce e excluir outros diagnósticos diferenciais. Nestas incluem-

se a redução ou perda da estrutura típica das fibras de reticulina, a invasão do estroma e a imunorreatividade usando determinados biomarcadores.

As considerações diagnósticas diferenciais dos nódulos no fígado dependem em grande parte do estado do fígado que não apresenta tumor. As lesões potencialmente mais desafiantes para os patologistas poderem distinguir de CHC em fígados cirróticos são nódulos displásicos e, em fígados não cirróticos, adenomas hepatocelulares (AHC) (Kojiro e Roskams, 2005; Park, 2011). Foram feitas propostas para permitir o correto diagnóstico do primeiro tipo, incluindo a análise detalhada de várias características histológicas de rotina, como espessura das trabéculas, a invasão vascular e capsular e características nucleares, ou utilização de imunomarcadores com proteína de choque térmico 70 (HSP70), glutamina sintetase (GS) e Glypican-3 (GPC-3) em várias combinações (Di Tommaso *et al.*, 2007). Um grupo sugeriu o uso da anexina-2 (Longerich *et al.*, 2011).

Di Tommaso *et al.* (2009) mostraram que em todos os nódulos displásicos em fígados cirróticos estudados, a positividade para os três (HSP70, GS e GPC-3) nunca foi observada, mas a combinação dos três marcadores identificou corretamente 43,7% carcinomas hepatocelulares.

Ao contrário do que acontece com o CHC avançado, o CHC precoce não apresenta um crescimento destrutivo e expansivo, mas substitui discretamente o parênquima cirrótico, a partir de um foco ou nódulo displásico pré-existente. Normalmente não é envolvido por uma cápsula verdadeira, a menos que ocorra num estadio avançado de cirrose. Neste caso, alguns espaços porta ainda podem ser detectados dentro da lesão. Uma característica importante, particularmente enfatizada pelos autores orientais e menos conhecida pelos patologistas ocidentais, é a esteatose macrovesicular, relatada em menos de metade dos CHCs precoces (40%) (Roncalli *et al.*, 2010).

No cão, histologicamente, os CHC formam trabéculas irregulares separadas por capilares sinusoides, por vezes marcadamente dilatados, e por lesões quísticas com conteúdo sanguinolento ou seroso, podendo também formar estruturas acinares ou sólidas. As características citológicas dos hepatócitos em CHC são variáveis e, tal como nos humanos, estes podem ser bem ou mal diferenciados. Estes tumores malignos podem ser diferenciados dos AHC pelo seu crescimento infiltrativo na periferia do

tumor, por presença regional ou difusa de pleomorfismo celular, às vezes com células atípicas ou bizarras e até células atípicas multinucleadas. A variação do tamanho celular e nuclear, um ou vários nucléolos de tamanho variável e a presença frequente de figuras mitóticas são também características histológicas de malignidade (Charles, 2006).

Muitas vezes, são observadas zonas de lipidose focal ou generalizada ou acumulação de glicogénio dos hepatócitos neoplásicos. Às vezes, podem ser observados focos de hematopoiese extramedular e macrófagos com pigmentos de ferro no seu interior (Charles, 2006).

Tanto os CHC como os AHC podem desenvolver uma extensa necrose central, o que pode conduzir a abscessos secundários (Charles, 2006).

## **1.5 Diagnósticos diferenciais**

O diagnóstico deste carcinoma baseia-se primeiro no achado de evidências histológicas de que a neoplasia é de origem hepatocelular. Embora as características hepatocelulares sejam fáceis de reconhecer em neoplasias mais diferenciadas, essa distinção é muitas vezes difícil em tumores mal diferenciados (Moulton, 1990).

### **1.5.1 Hiperplasia nodular**

A hiperplasia nodular é uma lesão proliferativa muito comum em cães com mais de 8 anos e afeta quase todos os canídeos com mais de 14 anos de idade. Estas lesões não têm significado clínico, e por isso devem ser distinguidas de massas neoplásicas. A hiperplasia nodular é rara noutras espécies e é caracterizada por múltiplas massas distintas distribuídas aleatoriamente pelo fígado (Bergman, 1985).

Os nódulos são esféricos a ovais e a superfície de corte é bem delineada do parênquima normal adjacente. A lesão pode ser visivelmente mais pálida ou mais escura do que o parênquima hepático adjacente, dependendo da quantidade de vacuolização hepatocelular, do número de hepatócitos afetados e do grau de congestão. Ocasionalmente, as lesões são difíceis de detectar devido à sua semelhança com o parênquima normal. Os nódulos variam em tamanho de 2 mm a 3 cm de diâmetro (Cullen e Poop, 2007).

Histologicamente, a hiperplasia nodular é caracterizada por um nódulo expansivo de hepatócitos que retém a arquitetura lobular normal. Os espaços porta e as veias centrais podem estar mais separados do que o normal, mas a arquitetura lobular pode ser discernida. Apesar de muitas vezes comprimirem o tecido normal adjacente e levarem a que haja uma zona condensada de reticulina, os nódulos nunca são encapsulados e não existe aumento na quantidade de tecido fibroso dentro do mesmo (Baba *et al.*, 2007).

Os hepatócitos estão dispostos em fiadas de uma a duas células de largura. Dentro do nódulo, a vacuolização, quando presente, pode ser difusa ou focal. Geralmente, os hepatócitos estão hipertrofiados devido ao aumento do citoplasma ou por causa da vacuolização extensa. Os nucléolos estão ocasionalmente aumentados. As figuras mitóticas são incomuns mas podem ser mais frequentes do que as encontradas no fígado normal (Cullen, 2007).

### **1.5.2 Nódulos regenerativos**

Os nódulos de hiperplasia regenerativa são distintos da hiperplasia nodular. Os nódulos regenerativos ocorrem em algumas espécies, a maioria nos cães, como resultado de lesões crónicas. Muitas vezes, a etiologia é desconhecida (Baba *et al.*, 2007).

É improvável que os nódulos regenerativos sejam confundidos com a hiperplasia nodular, uma vez que os nódulos regenerativos surgem em resposta a danos no fígado e a fibrose significativa e a incidência não está relacionada com a idade. Uma vez que estas lesões são presumidas como resultantes da proliferação de hepatócitos sobreviventes, geralmente há apenas um único espaço porta dentro dos nódulos regenerativos (Rothuizen *et al.*, 2006).

Os nódulos regenerativos podem ser difíceis de distinguir dos adenomas hepatocelulares com base apenas na histologia, embora algumas características distintivas o permitam fazer. Os nódulos regenerativos são compostos de fiadas de hepatócitos que não possuem mais de duas células de espessura e os adenomas podem ter fiadas mais espessas. Os adenomas hepatocelulares são mais propensos a ser lesões solitárias e, geralmente, não surgem em caso de lesão hepática e fibrose (Cullen, 2007).



### 1.5.3 Adenomas hepatocelulares

Os AHC são neoplasias benignas do fígado. Provavelmente durante anos foram subdiagnosticados pelos patologistas veterinários, e muitas vezes classificados como hiperplasias nodulares ou até CHC, embora a sua prevalência seja ainda hoje muito baixa (Cullen, 2007).

As neoplasias geralmente são massas únicas, não encapsuladas, de tamanho variável, vermelho ou castanho que comprimem o parênquima adjacente. São tipicamente esféricas, mas podem ser pediculadas (Eves, 2004).

Compõem-se de hepatócitos bem diferenciados, que formam placas uniformes que podem ser de duas a três células de espessura (Rothuizen *et al.*, 2006).

Os critérios diagnósticos para distinguir os AHC e a hiperplasia nodular hepatocelular podem ser um pouco subjetivos porque ambos surgem em fígados sem anormalidades de fundo, ao contrário dos nódulos regenerativos que surgem nos fígados danificados. Histologicamente, os adenomas são caracterizados por apenas um ou muito poucos espaços porta, enquanto que os nódulos hiperplásicos mantêm os elementos normais da arquitetura lobular, embora os traçados do portal estejam mais separados do que o normal. Noutros casos, pode ser difícil distinguir os adenomas hepatocelulares de carcinomas hepatocelulares bem diferenciados (Cullen, 2007).

Embora uma sequência típica de adenoma-carcinoma não represente uma via frequente na carcinogénese hepática, o AHC pode raramente atuar como uma lesão precursora do CHC (Fattovich *et al.*, 2004). Nos seres humanos ocorre predominantemente em pacientes do sexo feminino que usam contraceptivos orais, mas também tem sido descrito em pacientes do sexo feminino com diabetes do tipo 3. Nos homens, é descrito em pacientes com doença de armazenamento de glicogénio ou tratamento com androgénios (Chang *et al.*, 2013).

Em alguns casos, nenhuma etiologia pode ser determinada para o desenvolvimento do AHC. A distinção entre um CHC bem diferenciado e um adenoma hepático pode ser desafiante, especialmente quando tumores histologicamente semelhantes aos AHC ocorrem em condições pouco usuais ou apresentam atipia citológica ou arquitetónica (Schlageter *et al.*, 2014).

## 1.6 Outros tumores hepáticos

### **1.6.1 Adenoma colangiocelular**

Os adenomas dos ductos biliares são incomuns na maioria das espécies. São geralmente pequenos e assintomáticos, muitas vezes descobertos como um achado acidental à necropsia. Os adenomas biliares são não encapsulados, irregulares, branco pálidos a cinza, massas multiloculares caracterizadas pela formação de ácinos redondos, ductos biliares ou espaços expandidos revestidos com células epiteliais biliares bem diferenciadas (Cullen, 2007).

A camada única de células de revestimento pode ter forma cilíndrica, oval ou achatada. O citoplasma geralmente é pálido eosinofílico e ocasionalmente granular. Os núcleos tendem a ter uma orientação basal com nucléolos proeminentes. As mitoses são incomuns (Rothuizen *et al.*, 2006).

### **1.6.2 Carcinoma colangiocelular**

Os carcinomas colangiocelulares são neoplasias malignas do epitélio biliar, que geralmente surgem dos ductos intra-hepáticos, embora os ductos biliares extra-hepáticos também possam ser afetados. Estas neoplasias ocorrem em todas as espécies. Os tumores têm frequentemente um aspecto lobulado, particularmente quando protudem pela cápsula do fígado circundante. Ao corte, a coloração destes tumores varia de branco para amarelo acastanhado. Os bordos das lesões são geralmente bem delineados do parênquima hepático adjacente (Aslan *et al.*, 2014).

As áreas de necrose, caracterizadas por amolecimento do tecido e descoloração avermelhada, podem ser encontradas nas regiões centrais dos tumores nodulares, bem como nas áreas focais de grandes neoplasias únicas. As áreas quísticas que contêm fluido viscoso estão geralmente distribuídas aleatoriamente ao longo do colangiocarcinoma (Cullen, 2007).

Os tumores são compostos de células que mantêm uma semelhança com o epitélio biliar. Estes carcinomas bem diferenciados estão organizados num arranjo tubular ou acinar. Em neoplasias menos diferenciadas, alguns arranjos acinares podem ser detectados entre massas sólidas de células neoplásicas. Os carcinomas pouco diferenciados são compostos por ilhotas ou cordões, e podem ser observadas áreas de diferenciação escamosa (Aslan *et al.*, 2014).

Os componentes epiteliais dos colangiocarcinomas geralmente são separados por tecido conjuntivo fibroso. A quantidade de tecido conjuntivo varia entre os tumores, mas uma deposição abundante de colagénio é relativamente comum e é responsável pela textura firme destas neoplasias. As margens dos colangiocarcinomas são caracterizadas por múltiplos locais de invasão local por células tumorais do parênquima hepático circundante (Cullen, 2007).

Os múltiplos locais de necrose hepática também são comuns no parênquima adjacente (Aslan *et al.*, 2014).

As metástases para os locais extra-hepáticos são comuns, particularmente para os gânglios linfáticos adjacentes do abdómen cranial, pulmões ou cavidade abdominal (Cullen e Poop, 2002).

### **1.6.3 Tumores carcinóides**

Os carcinóides são tumores incomuns (Rothuizen *et al.*, 2006). Acredita-se que surjam de células neuroendócrinas que se encontram no epitélio biliar ou no parênquima hepático (Cullen, 2007).

Podem formar-se dentro do sistema biliar intra-hepático ou extra-hepático. Muitas vezes formam uma massa única, mas múltiplos nódulos podem desenvolver-se, provavelmente secundários a metástases intra-hepáticas (Rothuizen *et al.*, 2006).

As células tendem a ser pequenas, alongadas ou fusiformes e os tumores são altamente vasculares. A deteção imuno-histoquímica de marcadores neuroendócrinos, como a cromogranina A podem ser usados para confirmar o diagnóstico em alguns casos, mas não há marcadores definitivos (Rothuizen *et al.*, 2006).

## **1.7 Neoplasias mesenquimatosas primárias do fígado**

As neoplasias primárias podem surgir a partir de qualquer um dos constituintes celulares normais do fígado, incluindo neoplasias mesenquimatosas derivadas do tecido conjuntivo do fígado, incluindo fibrossarcoma, leiomiossarcoma, e osteossarcoma (provavelmente secundário a outro tumor mesenquimatoso) e endotélio (hemangioma e hemangiossarcoma). O hemangiossarcoma hepático primário está bem descrito em cães, embora o fígado seja um local de origem relativamente incomum para esta neoplasia em

comparação com a pele e o baço. As neoplasias mesenquimatosas primárias do fígado devem ser distinguidas das metástases. A presença de massas disseminadas ao longo do fígado é mais típica dos sarcomas metastáticos do que dos sarcomas hepáticos primários (Cullen, 2007).

## 1.8 Metástases hepáticas

O fígado é um dos dois locais mais comuns para a disseminação metastática de neoplasias malignas, a par com o pulmão (Rothuizen *et al.*, 2006).

Uma necrópsia completa e história médica ou cirúrgica são necessárias para distinguir neoplasias metastáticas de neoplasia primária do tecido hepatobiliar. É importante, portanto, aquando da avaliação de uma neoplasia hepática, procurar também noutros locais do corpo por um potencial tumor primário. Algumas neoplasias metastáticas têm uma aparência típica no fígado. Por exemplo, os melanomas são frequentemente negros por causa da presença de melanina, e os hemangiosarcomas geralmente são vermelho escuro a castanho por causa do sangue (Cullen, 2007).

O linfoma maligno é a neoplasia metastática mais comum encontrada no fígado na maioria, se não em todas as espécies. Segue-se o hemangiosarcoma e tumores do tecido epitelial, particularmente do pâncreas (Rest, 2008).

As neoplasias hematopoiéticas, como o linfoma e os distúrbios mieloproliferativos podem expandir o fígado de forma difusa e podem ter variáveis infiltrativas e nodulares. Essa aparência característica do envolvimento difuso é atribuível à degeneração hepatocelular centrolobular devido à anemia e devido à localização específica das acumulações de células neoplásicas.

## 1.9 Reticulina

A coloração da reticulina usa uma impregnação de prata para detetar fibras de reticulina, que são feitas de colagénio tipo 3. As fibras aparecem pretas contra um fundo cinza a rosa claro. No fígado, tais fibras estão presentes como parte da matriz extracelular no espaço de Disse. Ao evidenciar essas fibras, a coloração ajuda na avaliação da arquitetura das placas hepáticas, como a sua expansão em condições regenerativas e neoplásicas, compressão de placas em hiperplasia regenerativa nodular e

colapso da estrutura de reticulina na necrose. A coloração também é usada para avaliar estas fibras noutros tecidos, como medula óssea e rim (Krishna, 2013).

Segundo alguns autores, a reticulina é usada de forma mais segura quando é possível a comparação com fígados não neoplásicos. É uma coloração facilmente mal interpretada que nem sempre permite distinguir adenomas e outras lesões benignas de CHC (Brunt, 2012).

Por vezes, é possível ver com a coloração de HE as características clássicas da neoplasia, como a hipercromasia, o aumento da relação núcleo/citoplasma, figuras de mitose, entre outras. No entanto, o CHC pode ser muito bem diferenciado, e essas características estarem ausentes na coloração de rotina. Nestes casos, e segundo alguns autores, a coloração da reticulina pode tornar-se bastante útil. A arquitetura hepática normal tem uma ou duas placas de espessura de células entre cada bordo endotelial. Se o tecido é displásico, as células que se dividem já não reconhecem os seus limites, e o que se pode observar com a coloração da reticulina são várias fiadas de células entre as fibras coradas a negro ou até mesmo uma ausência das mesmas (Journal of Online Hepatology, 2011).

Segundo Kocjan, a coloração da reticulina é um dos testes acessórios mais úteis para o diagnóstico do CHC bem diferenciado. Um padrão anormal de reticulina, geralmente caracterizado pela ausência da mesma, está altamente associada à presença deste tumor no fígado. Os carcinomas bem diferenciados e pequenos num estadio inicial podem no entanto apresentar um padrão normal e nem sempre podem ser distinguidos de casos de displasia. Uma outra armadilha na interpretação desta coloração prende-se com o facto da esteatose marcada poder causar um resultado falso negativo (Kocjan *et al.*, 2010).

Existem vários estudos que referem uma redução do número de fibras de reticulina presentes nestes tumores (Dowman *et al.*, 2014; Serizawa *et al.*, 2015) e também uma descontinuidade das mesmas (Schmidt *et al.*, 2008) noutras espécies animais que incluem canídeos e roedores.

Em Medicina Humana, na maioria dos casos de hiperplasia nodular não se observam alterações relativamente à presença das fibras de reticulina nem tão pouco à sua disposição clássica por entre fiadas de hepatócitos, apesar de por vezes zonas de

esteatose apresentarem um maior número de cordões de hepatócitos entre as fibras do que seria de esperar (Swanson *et al.*, 2015).

A coloração de reticulina é agora considerada mais fiável e consistente do que qualquer um dos anticorpos, enzimas ou imunomarcadores na distinção de CHCs bem diferenciados de lesões hepáticas benignas (Yang *et al.*, 2004).

A perda da estrutura de reticulina, a invasão do estroma e uma positividade de pelo menos 2 de 3 marcadores (HSP70, GS, Glypican 3) são considerados os parâmetros mais marcantes no diagnóstico de CHC precoce em biópsias hepáticas (Schlageter *et al.*, 2014).

Já em 1993, Ferrell *et al.* declararam que a redução ou ausência de um padrão de reticulina intacta é um critério importante para a malignidade na sua proposta de critérios padronizados para o diagnóstico de lesões hepatocelulares benignas, limítrofes e malignas que surgem na doença hepática avançada crónica. No ano anterior, já haviam relatado que a perda de reticulina geralmente era muito útil na diferenciação de nódulos macrorregenerativos de carcinomas de pequeno tamanho no fígado cirrótico (Ferrell *et al.*, 1992).

É preciso no entanto referir que existem casos descritos em se observam padrões de reticulina normais em CHC, tal como Wilkens descreve em 2006 num case report e Hong, novamente, em 2011. Estes casos colocam em questão a fiabilidade da coloração da reticulina no que toca ao diagnóstico destes tumores por haver preservação da estrutura típica das fibras (Wilkens *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2011).

A técnica de Gordon & Sweet consiste numa impregnação de prata amoniacal. Inicialmente, devido à baixa afinidade das fibras de reticulina para os sais de prata, faz-se um pré-tratamento denominado de oxidação (as fibras de reticulina são oxidadas para revelarem a sua argirofilia). Assim, ocorre a oxidação dos grupos glicol da hexose na reticulina em grupos aldeído. De seguida, ocorre a impregnação através da formação de um composto metal-orgânico com o tecido, que é subsequentemente substituído pela prata. Os complexos diamina-prata são reduzidos a prata metálica pelos grupos aldeído (processo insuficiente não produzindo reação adequadamente visível). A solução de formol a 10% vai então reduzir os complexos diamina prata residuais a prata metálica, nas porções de tecido seletivamente impregnadas. A prata não-reativa é removida pelo

tiosulfato de sódio. Neste tipo de técnica o contraste é opcional e pode ser efetuado com Nuclear Fast Red, Verde Luz, entre outros (Carson e Freida, 1997).

### **1.10 Os murganhos como modelo de carcinoma hepatocelular de seres humanos**

Para esclarecer a patogénese do CHC e investigar os efeitos de potenciais terapias, uma série de modelos animais têm sido desenvolvidos. Os modelos de xenotransplante subcutâneos têm sido amplamente utilizados nas últimas décadas. Também os modelos de murganho geneticamente modificados têm facilitado muito os estudos sobre a função dos genes no desenvolvimento do CHC (Heindryckx *et al.*, 2009).

Vários reagentes químicos induzem a formação de tumor quando administrados em altas doses e duração adequada. Existem dois tipos de agentes carcinogénicos: compostos genotóxicos que são caracterizados pela sua capacidade de induzir mutações de DNA estrutural e os compostos de promoção, que não possuem capacidade genotóxica direta, mas promovem o desenvolvimento tumoral após a iniciação com recurso a um composto hepatotóxico (Pitot e Dragan, 1991).

A vantagem dos modelos quimicamente induzidos é a semelhança com o ciclo que envolve lesão, fibrose e malignidade, observado em humanos. Este facto torna os modelos quimicamente induzidos favoritos para o estudo do CHC (Heindryckx *et al.*, 2009).

A dietilnitrosamina (DEN) é frequentemente utilizada como agente carcinogénico. O órgão alvo no qual a DEN induz tumores malignos é específico da espécie mas não de forma exclusiva, podendo também estar dependente da idade do animal, da dose administrada, da frequência e da via de administração. Os murganhos desenvolvem principalmente tumores no fígado, mas também neoplasias gastrointestinais, cutâneas, respiratórias e tumores hematopoiéticos. A capacidade carcinogénica da DEN reside na sua capacidade de alquilar estruturas de ADN (Heindryckx *et al.*, 2009). A capacidade carcinogénica da DEN é reforçada pelo fenobarbital (Tamano *et al.*, 1994).

## 1.11 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo primário determinar qual a real utilidade da reticulina no diagnóstico do CHC num modelo de murganho e qual a sua aplicação à realidade da Medicina Veterinária utilizando algumas amostras de lesões hepáticas caninas para tal.

Como outros objetivos pretendeu-se:

- Caracterizar do ponto de vista clínico-patológico e histopatológico as lesões a nível hepático e fazer uma breve comparação entre seres humanos, murganhos e cães.
- Avaliar a capacidade de coloração das fibras de reticulina em fígados saudáveis e em lesões hepáticas de murganhos e canídeos.
- Realizar uma comparação visual entre lâminas coradas com hematoxilina e eosina com a coloração da reticulina.
- Comparar de forma objectiva a disposição das fibras de reticulina em CHC e zonas displásicas em murganhos e transpôr a técnica para a espécie canina, comparando o CHC com uma amostra de hepatite crónica e uma de hiperplasia nodular benigna.
- Avaliar quantitativamente a capacidade das fibras de reticulina em delimitar os tumores e ajudar a medir a sua área.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Murganhos e processamento histológico

No âmbito de um projecto de investigação com um grupo residente no Instituto Gulbenkian de Ciência, o serviço de histopatologia foi requisitado para avaliar e quantificar o número e o tamanho de neoplasias induzidas quimicamente num modelo de CHC em murganho. Estes animais foram injectados com dietilnitrosamina e fenobarbital seguindo um protocolo de carcinogénese química bem estabelecido (Kato *et al.*, 1993). Neste protocolo, os tumores são iniciados pelo fármaco genotóxico dietilnitrosamina (DEN) às 4 semanas de idade e promovido pelo promotor tumoral fenobarbital a partir das 8 semanas de idade (Eferl *et al.*, 2003). Os animais foram sacrificados aos dez meses, tendo este projeto de investigação sido aprovado pela comissão de ética do Instituto Gulbenkian de Ciência

Foram utilizados onze fígados e analisados todos os respectivos lobos hepáticos. Como controlo foi utilizado um fígado de um murganho saudável pertencente a um outro estudo.

O material enviado para o serviço da histopatologia foi previamente fixado em formaldeído tamponado a 10%, sendo que o tempo de fixação variou entre 48 horas e uma semana, e foi posteriormente processado e incluído em parafina. Os cortes de 4 micra (efetuados no micrótomo Leica RM 2255) foram corados com HE.

Para a avaliação dos tumores, foi selecionada a secção mais representativa de cada lobo (a que apresentava o maior número de nódulos), na qual foram contados os tumores e medidas as suas áreas. Para esta etapa recorreu-se ao microscópio ótico com câmara para a contagem dos tumores. No caso destes serem visualizados na totalidade com a menor amplificação (40x), tiraram-se fotografias aos mesmos para posteriormente realizar as medições de áreas. No caso dos tumores não caberem na sua totalidade no campo de visão, recorreu-se à lupa e tiraram-se fotografias dos mesmos numa ampliação menor (2x). A delimitação dos carcinomas foi feita com a ajuda do software informático Image J.

Apenas quando os nódulos eram evidentes e bem delimitados foram considerados como sendo CHC, segundo o modelo proposto por Schlageter *et al.* em 2014. Os CHC caracterizavam-se pela sua formação nodular distinta e elevada que se projeta da superfície hepática. As células neoplásicas dentro do nódulo estavam

dispostas em toalha e as células neoplásicas eram maiores quando comparadas com as células hepáticas, com polarização dos núcleos. As figuras mitóticas não eram numerosas. No caso das displasias, os hepatócitos eram maiores com polarização dos núcleos, mas não foi observada formação nodular. Não foi observada nenhuma superfície sub-macroscópica irregular (Figura 1).

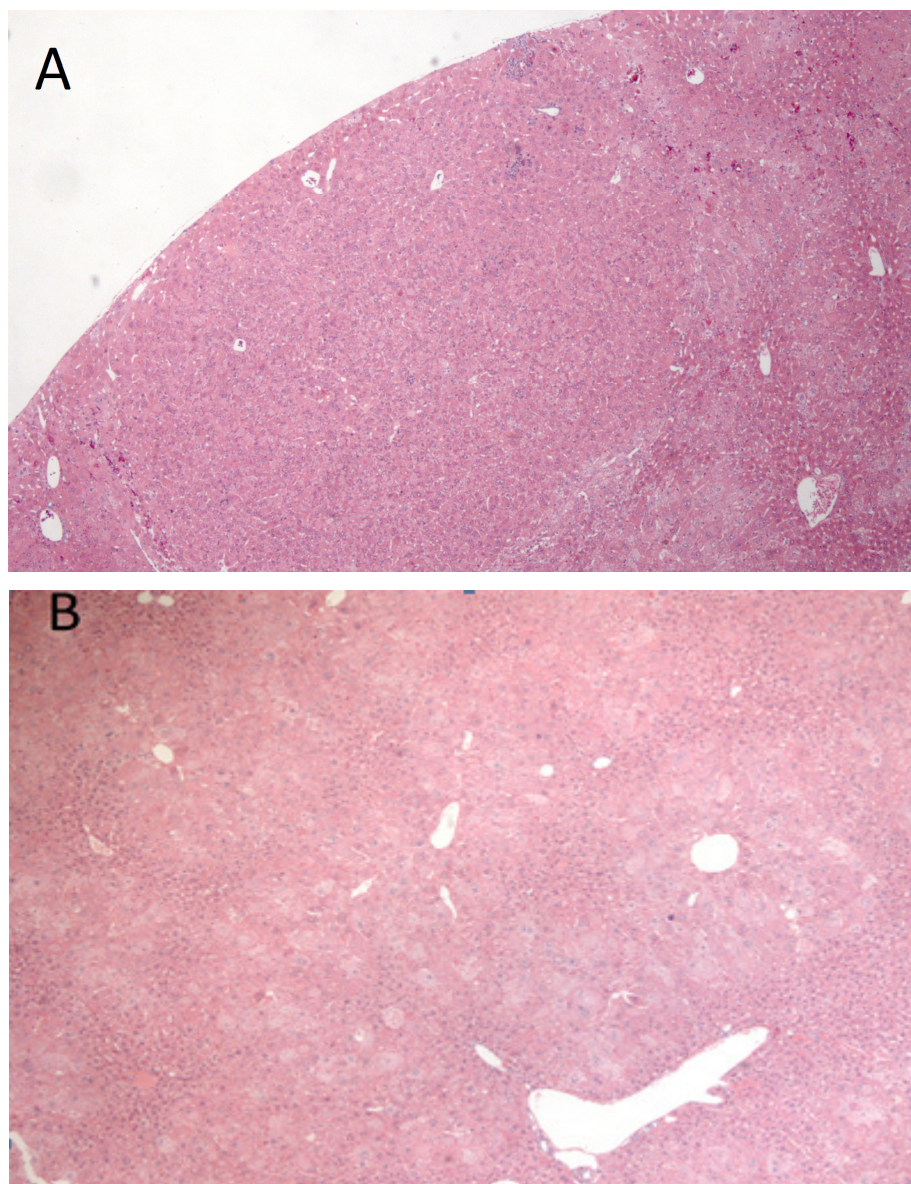


Figura 1: Contagem de nódulos no parênquima hepático de murganho. A) Formação nodular clara que se projeta da superfície hepática (Hematoxilina e eosina, 40x). B) Displasia em que não se observa qualquer formação nodular e não existe nenhuma superfície sub-macroscópica irregular (H&E, 40x).

### 2.1.1 Coloração com Reticulina

A técnica utilizada para este trabalho foi a de Gordon & Sweet (1936), cujo protocolo é o seguinte:

1. Desparafinação das lâminas em xilol durante 20 minutos.
2. Hidratação das lâminas em álcoois com percentagem decrescente de concentração; 100% > 95% > 80% > 70%, durante cerca de 5 minutos cada. Passagem das lâminas por água destilada.
3. Oxidação com solução de Permanganato de Potássio acidificado durante 5 minutos – até os cortes ficarem castanhos.
4. Lavagem em água corrente.
5. Descoloração com solução de Ácido Oxálico – 1 minuto.
6. Lavagem em água corrente
7. Solução de Sulfato de Amónio Férrico (mordante) – 15 minutos.
8. Lavagem em água destilada (várias lavagens).
9. Solução de Nitrato de Prata filtrada durante 5 minutos – até os cortes ficarem amarelos escuros.
10. Lavagem em água destilada (várias lavagens).
11. Redução com solução de Formol 10% durante 1 a 2 minutos (os cortes devem ficar castanhos claros).
12. Solução de Cloreto de Ouro – 5 minutos.
13. Lavagem em água destilada.
14. Solução de Tiosulfato de Sódio – 5 minutos.
15. Lavagem em água destilada.
16. Contraste com Neutral Red – 1 minuto.
17. Desidratação das lâminas com passagem por álcoois com percentagem crescente de concentração, 95% I > 95% II > 100% I > 100% II, finalizando com a diafanização em xilol.
18. Montagem das lâminas.

### **2.1.2 Avaliação da Coloração**

A avaliação da marcação pela reticulina nos murganhos em fígado normal foi feita de forma qualitativa e comparada posteriormente com os dados fornecidos pela literatura em relação à espécie humana. Igualmente qualitativa foi a avaliação visual da capacidade das fibras de reticulina em diferenciar os tumores dos focos de displasia e fígado normal, sendo que ulteriormente foi realizada uma avaliação quantitativa da mesma em diferenciar os tumores recorrendo à contagem dos nódulos com a coloração de Gordon & Sweet e comparando com o número obtido com a coloração de HE. Esta contagem foi feita de forma cega e não seriada para não influenciar as contagens entre as duas colorações de uma mesma lâmina.

Procedeu-se depois a uma avaliação quantitativa da capacidade das fibras de reticulina em delimitar os tumores e ajudar a medir a sua área, visto ser esta uma das medidas de eleição para fazer contagens em estudos de HCC, e por fim a uma análise global sobre o potencial do uso da reticulina no diagnóstico de displasias hepatocelulares e de CHC. Nesta etapa foram apenas contabilizadas as áreas tumorais que eram observadas com ambas as colorações.

### **2.1.3 Análise estatística**

Após ter sido determinada a área ocupada pelos tumores no fígado, tentou-se verificar se existia alguma significância estatística em relação às diferenças encontradas entre áreas, utilizando para tal o coeficiente de correlação de Pearson. Este passo foi realizado com a ajuda do programa informático SPSS.

## **2.2 Cão**

As amostras de fígado de cão provieram dos arquivos do Laboratório de Investigação Científica e Análises Moleculares (DNAtech), em Lisboa, tendo todas elas sido fixadas em solução de formalina a 10% e incluídas em parafina entre o dia 1 de Janeiro de 2016 e o dia 31 de Dezembro de 2016.

A avaliação das lesões presentes foi realizada através da observação direta ao microscópio ótico, com coloração de HE, pelo patologista da DNAtech nesse mesmo ano, e reiterada para a realização deste trabalho.

Para este estudo foram feitos cortes de 5 micra aos blocos seleccionados (micrótomo Microm HM 430) e as quatro amostras foram coradas com H&E e também com a técnica de Gordon & Sweet para colocar em evidência as fibras de reticulina. Foram utilizadas duas amostras de CHC, uma de hepatite crónica e uma hiperplasia nodular benigna.

Como controlo foi utilizado uma amostra de fígado de cachorro saudável proveniente da mesma base de dados.

O protocolo para a coloração das fibras de reticulina com a técnica de Gordon & Sweet foi igual à utilizada nas lâminas de murganho (Gordon e Sweet, 1936). Foi realizada uma avaliação qualitativa relativamente à capacidade de coloração das fibras de reticulina em fígado saudável e à sua disposição nos casos de carcinomas hepáticos, hiperplasia nodular e hepatite crónica.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina em fígados controle de murganho**

A marcação das fibras de reticulina no fígado saudável de murganho mostra um padrão relativamente homogêneo em toda a extensão do parênquima, sendo mais marcada na área centrolobular e nos vasos sanguíneos, essencialmente juntos aos espaços porta. Apesar das fibras de reticulina não estarem coradas em toda a sua extensão e por isso não apresentarem o padrão típico que se visualiza muitas vezes no parênquima hepático de humanos, é possível concluir que está presente entre as fiadas de hepatócitos de forma regular, sendo que não existem mais do que um ou dois cordões de células entre cada limite endotelial (Fig. 2).



Figura 2: Marcação da reticulina num fígado saudável de murganho (Reticulina, 100x).

#### **3.2 Avaliação qualitativa da capacidade da coloração da reticulina em diferenciar focos de displasia e fígado saudável de CHC**

Em relação à capacidade das fibras de reticulina em diferenciar os tumores dos focos de displasia e fígado normal, constata-se que nos murganhos o padrão exibido



pelas fibras de reticulina nos casos de displasia é semelhante ao padrão que elas apresentam num fígado normal, sendo que em algumas zonas do parênquima hepático estas não são visíveis (Fig. 3).

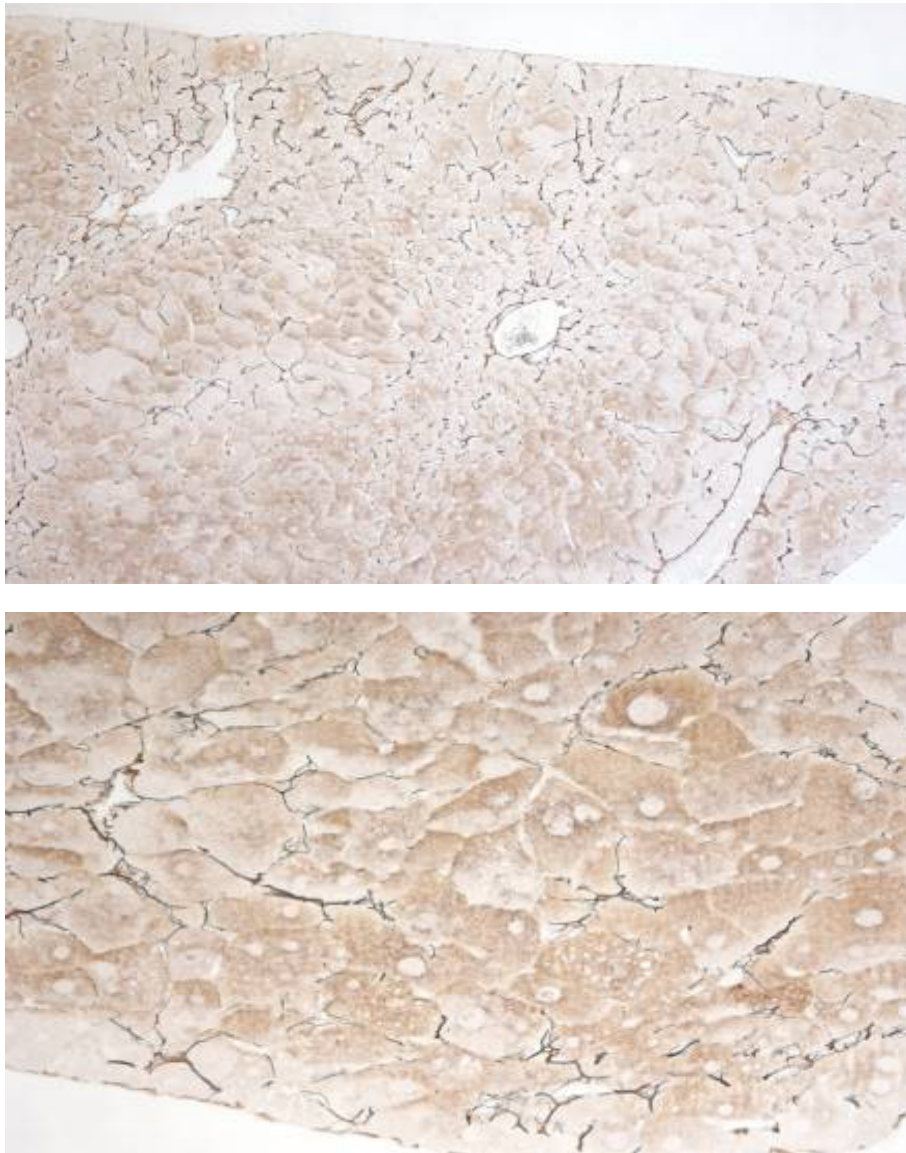


Figura 3: Disposição das fibras de reticulina em casos de focos de displasia hepatocelular em murganho (A - Reticulina, 100x), (B – Reticulina 200x).

Na maioria dos casos, os CHC dos murganhos formam com a coloração da reticulina nódulos bem evidentes. Algumas vezes é possível distinguir um tumor de forma mais clara com esta coloração que com a HE tem uma aparência extremamente

duvidosa, e que por isso não poderá nesta categoria ser considerado um CHC. O que torna estes nódulos muito demarcados com esta coloração é o facto de as fibras coradas a negro estarem empurradas para a periferia do tumor, comprimidas de encontro ao tecido adjacente, formando uma rede compacta que permite estabelecer limites bastante precisos entre os carcinomas e o tecido hepático saudável (Figura 4).

No entanto, a disposição das fibras dentro desses mesmos nódulos varia de uma forma muito heterogénea, podendo existir um padrão bastante semelhante ao observado em tecidos normais ou haver uma completa ausência de fibras de reticulina. A figura 5 mostra os diferentes padrões de reticulina encontrados no interior dos carcinomas hepatocelulares neste estudo.



Figura 4: Os tumores hepatocelulares em murganhos são na sua maioria bem diferenciados graças à rede de fibras de reticulina que é empurrada para a periferia dos nódulos (Reticulina, 100x).



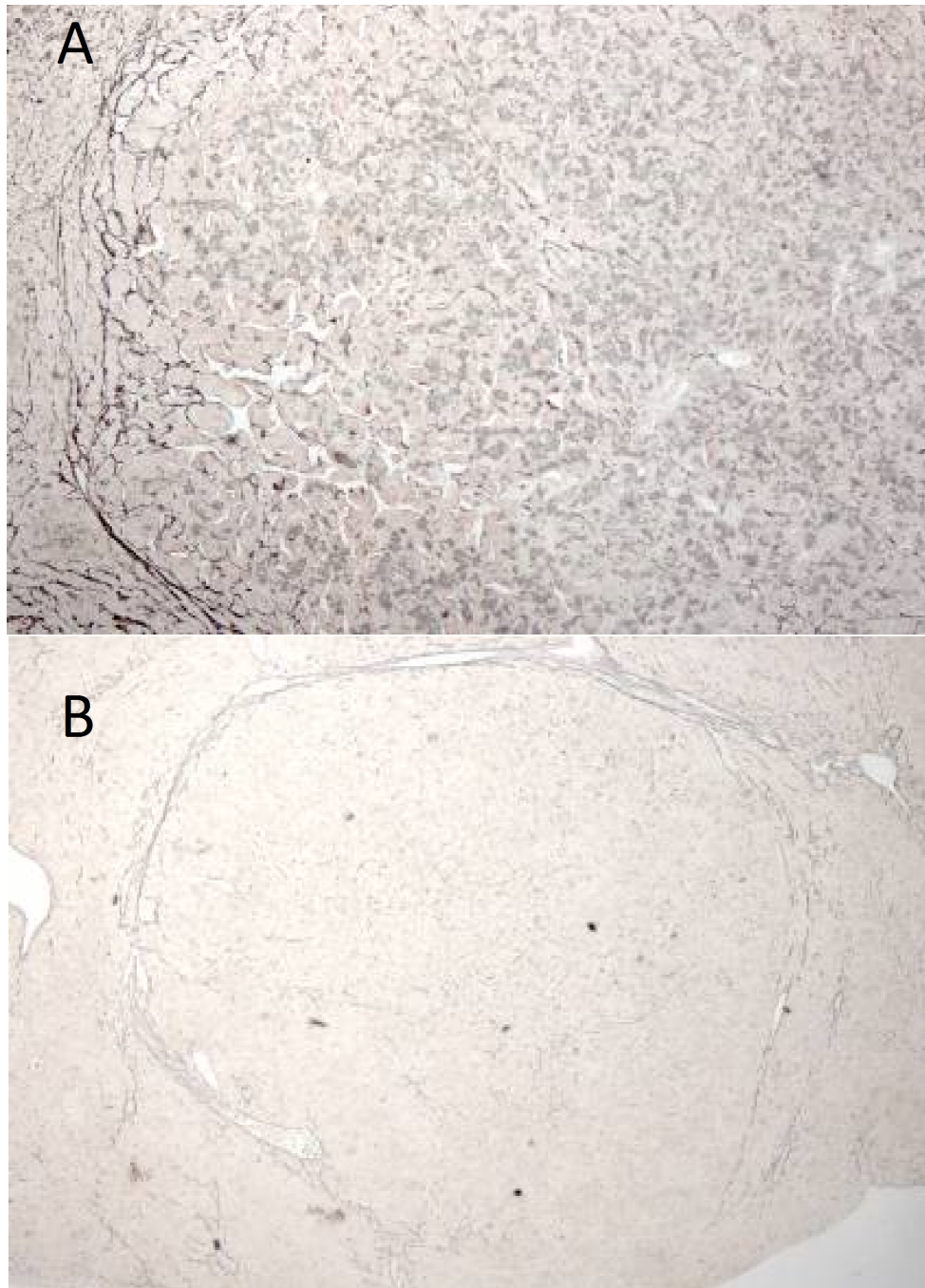


Figura 5: A) CHC em murganho onde se observa uma quase total ausência de fibras de reticulina no interior do tumor (Reticulina, 100x). B) CHC em murganho onde se observa uma disposição das fibras de reticulina no interior do tumor semelhante ao tecido hepático adjacente (Reticulina, 40x).

### **3.3. Avaliação quantitativa da capacidade das fibras de reticulina em delimitar os tumores e ajudar a medir a sua área**

Nem sempre os nódulos identificados em HE são mais evidentes com a técnica da reticulina, como se pode observar na figura 6.

A contagem de CHC com a coloração de HE foi diferente da contagem dos mesmos tumores com a coloração da reticulina. Com a primeira destacaram-se de forma evidente 44 nódulos no total dos 44 lobos hepáticos analisados. Já utilizando a técnica de Gordon & Sweet, contaram-se 47 tumores nas mesmas amostras. O gráfico 7 mostra as contagens de tumores efetuados com a coloração HE, divididos por lobos hepáticos. O gráfico 8 mostra as contagens efetuadas com a coloração da reticulina no mesmo molde.

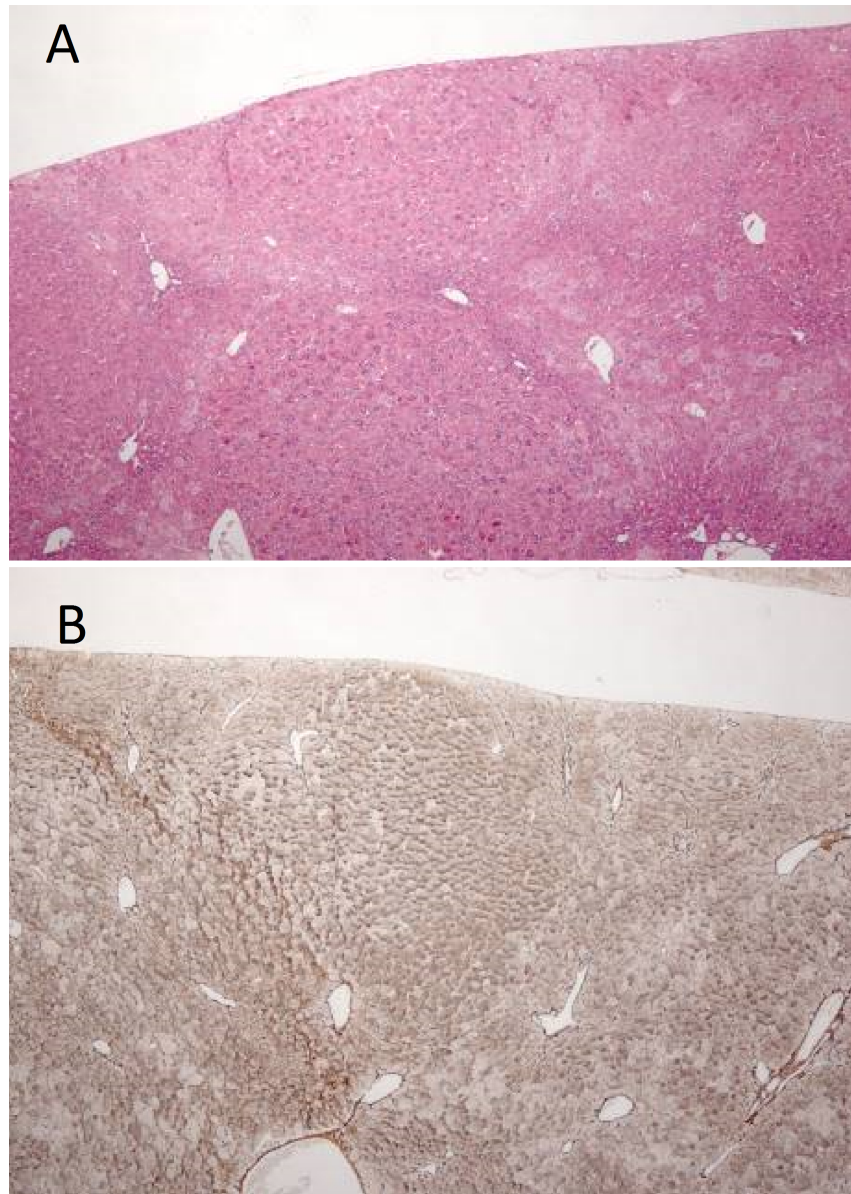


Figura 6: A) Dois nódulos visíveis no parênquima hepático (H&E, 40x). B) Mesmo corte da imagem anterior. Presença de estrutura nodular mal delimitada (Reticulina, 40x).

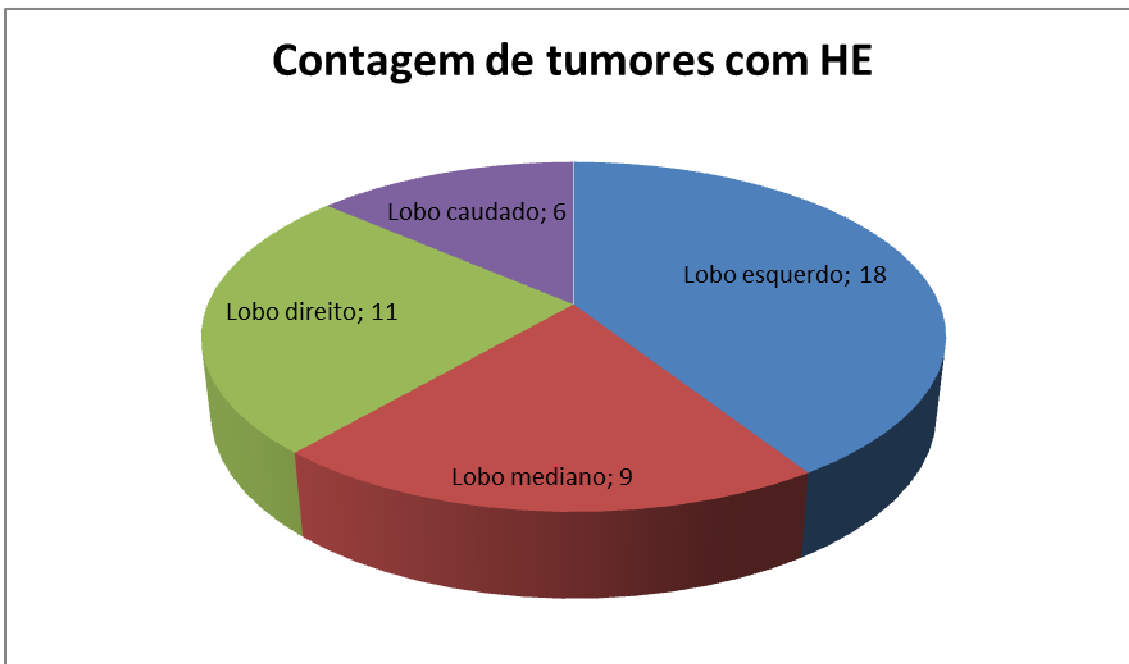


Gráfico 7 – Contagem de nódulos por lobos hepáticos com a coloração de HE

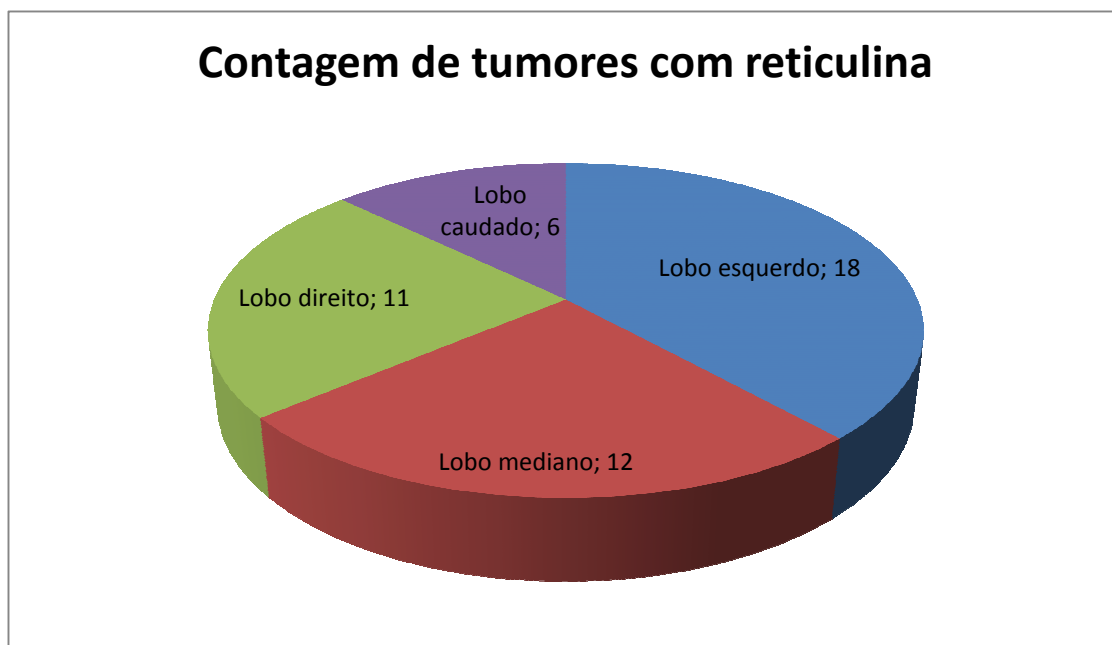


Gráfico 8 – Contagem de nódulos por lobos hepáticos com a coloração da reticulina

A diferença encontra-se não só no facto de alguns nódulos serem mais facilmente identificados como CHC com a reticulina mas também na identificação de vários nódulos microscopicamente visíveis dentro do que, com a HE, aparentava ser

apenas um tumor. De notar que um dos CHC observados com a HE não foi classificado como tal com a coloração da reticulina.

Por ser uma medida importante para fazer contagens em estudos de CHC, mediram-se as áreas dos tumores que podiam ser observados com ambas as colorações e verificou-se que, mesmo nos lobos onde a contagem de tumores era idêntica, as áreas acabavam por ser ligeiramente superiores na coloração com H&E (Tabela 1 e 2). Os tumores que apenas eram observados numa destas colorações não foram contabilizados nas áreas a medir.

Tabela 1: Área ocupada pelos nódulos no parênquima hepático de murganho nas lâminas coradas com HE.

	Área de tumor por órgão (mm <sup>2</sup> )
Fígado 1	2,37
Fígado 2	0
Fígado 3	43,89
Fígado 4	0
Fígado 5	1,30
Fígado 6	24,50
Fígado 7	20
Fígado 8	77,20
Fígado 9	19,50
Fígado 10	0
Fígado 11	n.m
<b>Total</b>	<b>189 mm<sup>2</sup></b>

Legenda: n.m. – área não medida

Tabela 2: Área ocupada pelos nódulos no parênquima hepático de murganho nas lâminas coradas com reticulina.

	Área de tumor por órgão (mm <sup>2</sup> )
Fígado 1	2,30
Fígado 2	0
Fígado 3	39,10
Fígado 4	0
Fígado 5	1,38
Fígado 6	23,53
Fígado 7	18,70
Fígado 8	72,40
Fígado 9	17
Fígado 10	0
Fígado 11	n.m
<b>Total</b>	<b>174 mm<sup>2</sup></b>

Legenda: n.m. – área não medida

De forma a perceber se existia alguma significância estatística nas diferenças encontradas entre áreas, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson. Uma correlação significativa ( $p < 0,05$ ) acima de 90% (0,9) permitiria uma forte indicação de que as duas colorações permitem delimitar áreas idênticas.

É isso mesmo que se verifica neste caso ( $r = 0,999$ ,  $n = 10$ ,  $p > 0,0001$ ) - apesar das áreas de tumor serem quase sempre superiores quando observadas com a HE, existe uma correlação quase perfeita entre os dois métodos.



### **3.4 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no fígado controle de cão**

No cão, não parecem haver diferenças na coloração negra da reticulina consoante as zonas de parênquima hepático e as fibras coram de uma forma mais intensa. As fibras surgem a preto contra um fundo cinzento a rosa claro, estando presentes como parte da matriz extracelular no espaço de Disse (Fig. 7).

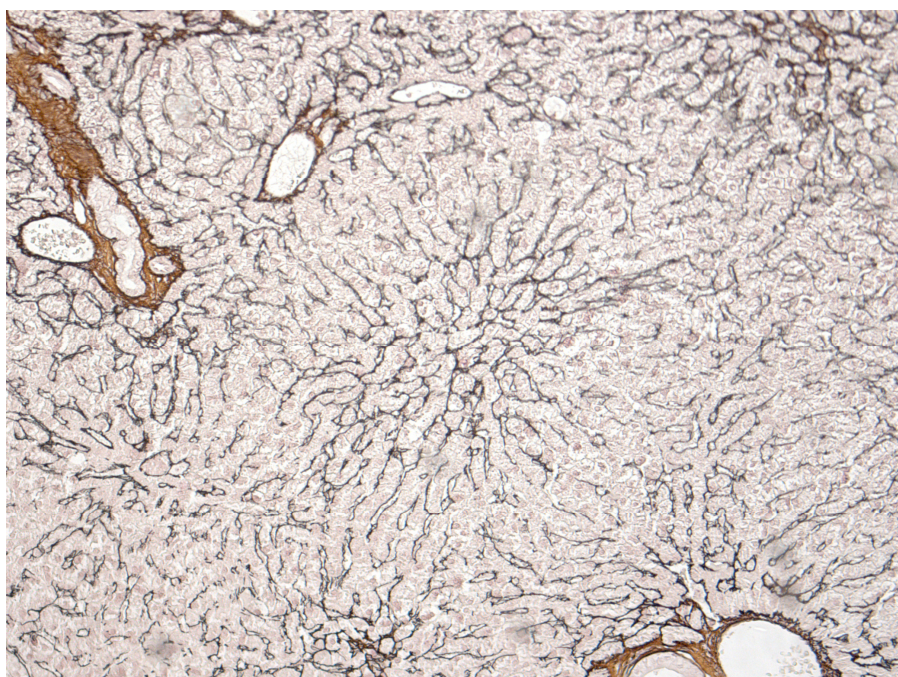


Figura 7: Marcação da reticulina num fígado saudável de cão (Reticulina, 100x).

### **3.5 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no caso de hiperplasia nodular canina**

Na imagem histológica de fígado do cão, as fibras de reticulina exibem o seu padrão normal. No entanto, nas zonas nodulares hiperplásicas observa-se uma ténue redução na intensidade da coloração, tornando-se as fibras menos visíveis e surgindo de forma descontínua ao longo do parênquima (Fig. 8).

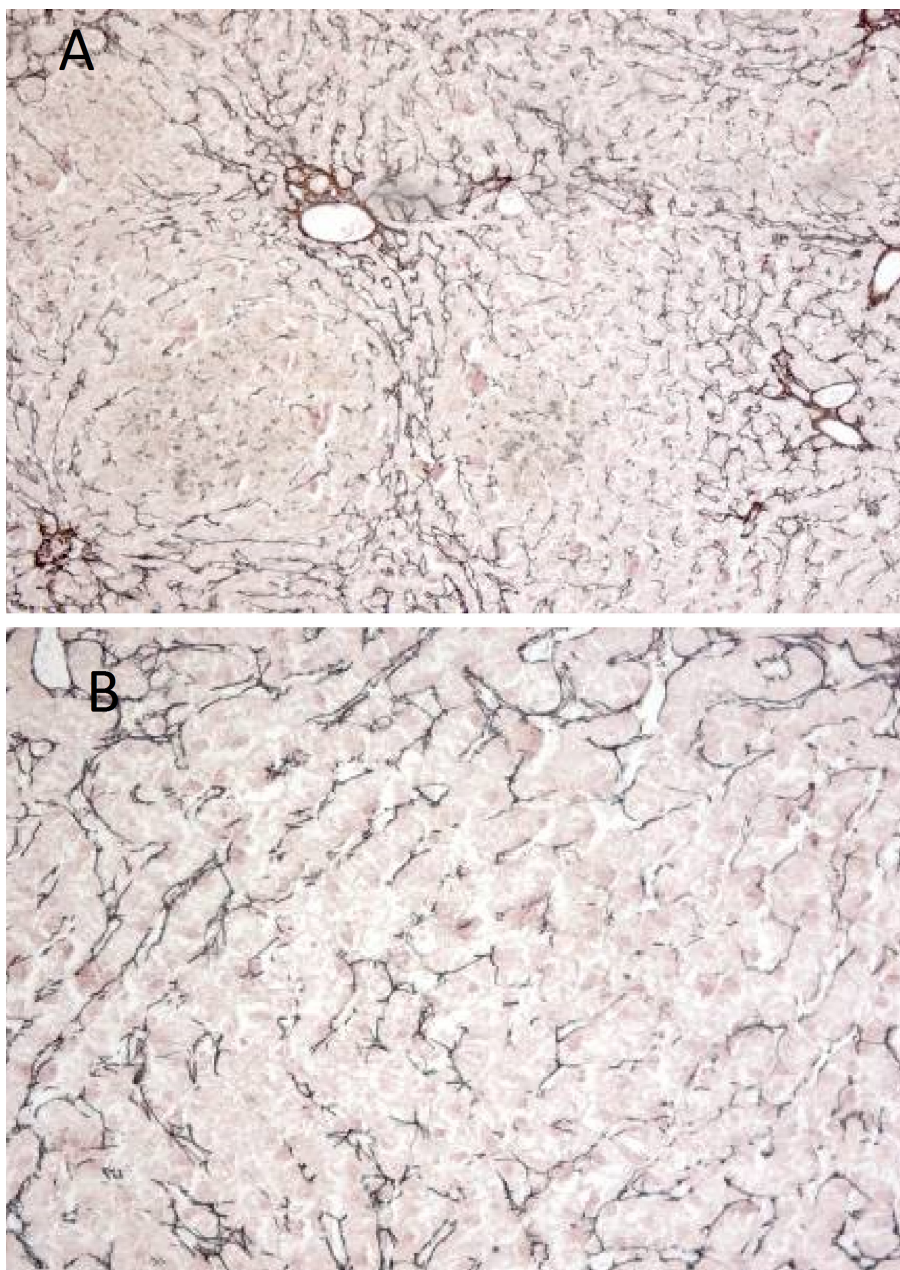


Figura 8: A) Disposição das fibras de reticulina em casos de hiperplasia nodular hepatocelular em cão (Reticulina, 100x). B) Disposição das fibras de reticulina em casos de hiperplasia nodular em cão (Reticulina, 200x).

### **3.6 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no caso de hepatite crónica canina**

No caso da hepatite crónica, observam-se algumas zonas em que a reticulina está ausente e que correspondem a zonas de necrose de liquefação, tal como se pode



confirmar com a HE (Fig. 9). Também é possível ver zonas de fibrose, especialmente num padrão portal-portal (deposição de fibrose entre as zonas portais dos lóbulos hepáticos, formando pontes entre estes - *bridging*), passível de ser confirmada com a técnica de Gordon & Sweet. Esta técnica permite ver que existe uma aproximação das fibras de reticulina, como se estas estivessem colapsadas, formando-se assim nestas regiões uma nuvem mais densa de colagénio tipo III que fica evidenciado a negro (Fig. 10).

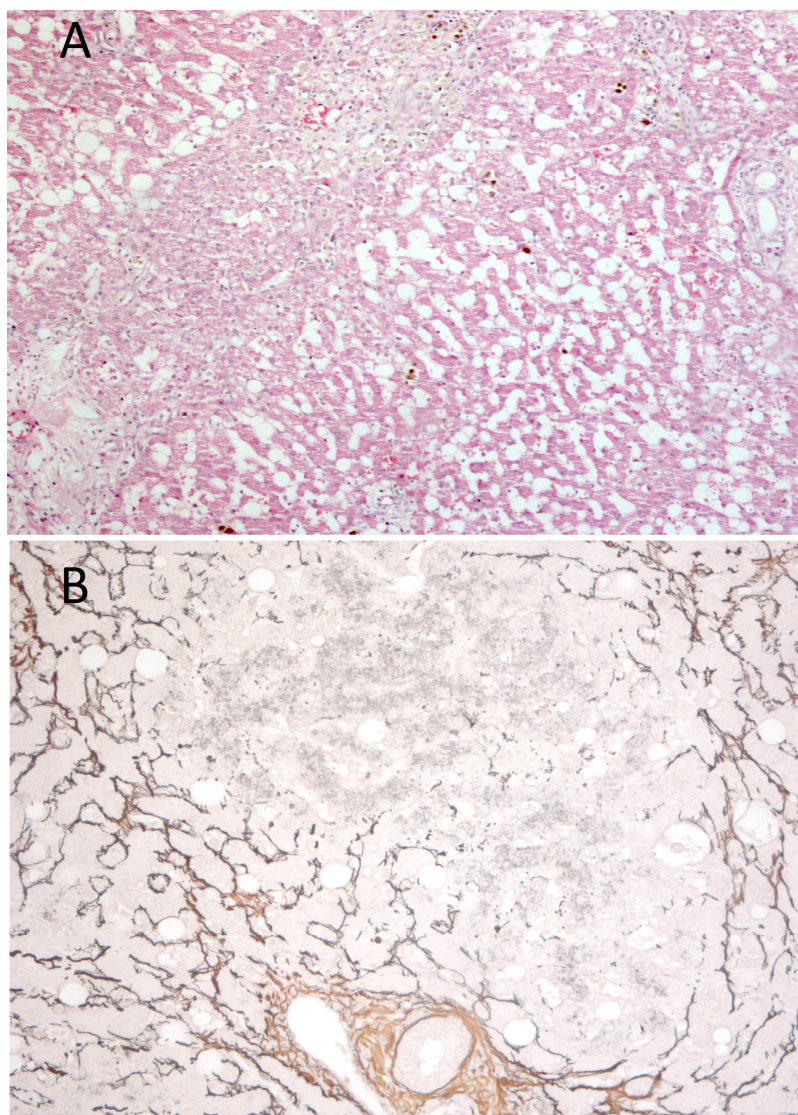


Figura 9: Zonas de necrose na hepatite crónica canina. A) Com a coloração de HE é possível observar as áreas necróticas (H&E, 40x). B) Com a coloração de Gordon & Sweet observa-se uma ausência de fibras de reticulina nessas mesmas zonas (Reticulina, 100x).

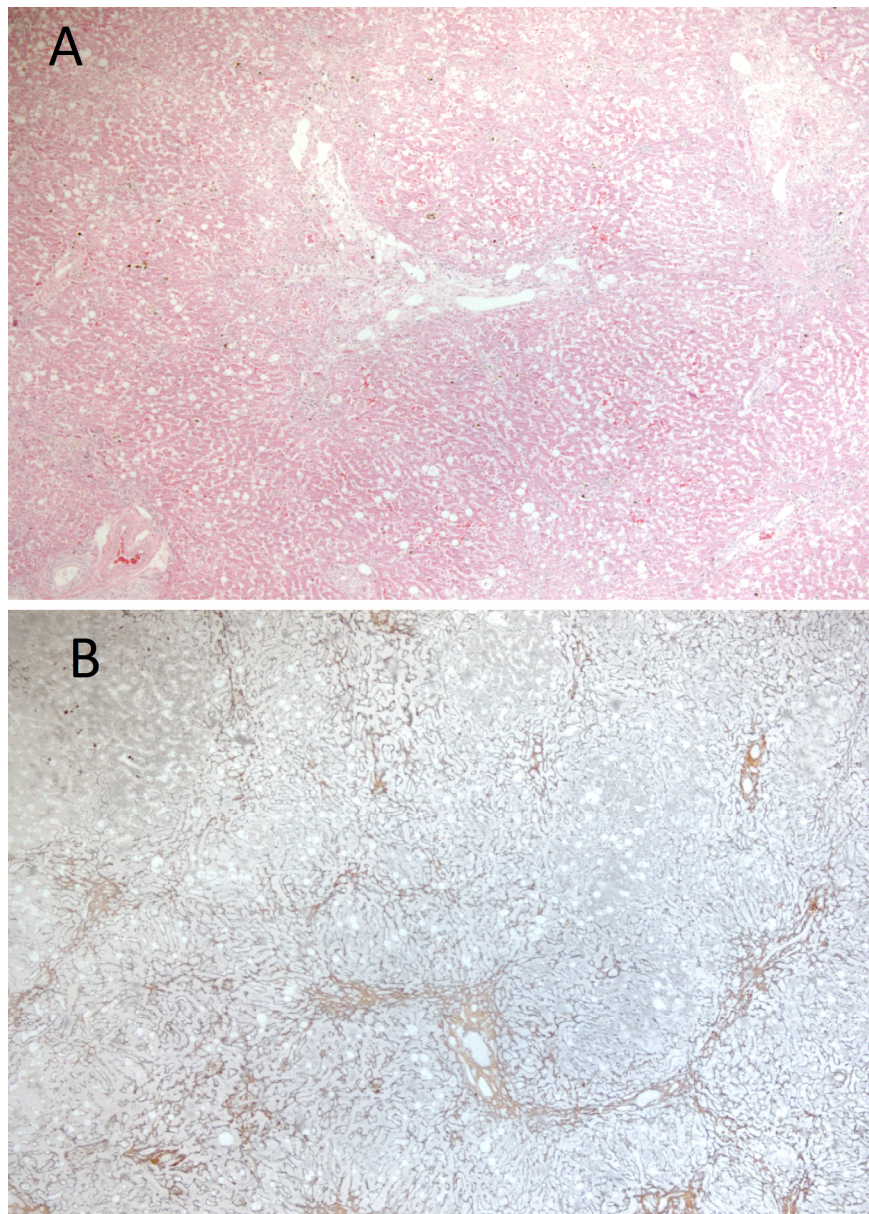


Figura 10: Zonas de fibrose na hepatite crónica canina. A) Com a H&E é possível observar que as zonas onde há maior deposição de fibrose são a nível portal-portal. B) Observa-se um colapso das fibras de reticulina nas áreas de fibrose (Reticulina, 40x).

### **3.7 Avaliação da capacidade de coloração das fibras de reticulina no caso de carcinoma hepatocelular canino**

No cão, observa-se que o CHC bem diferenciado apresenta um padrão das fibras de reticulina que se assemelha muito ao que está descrito na bibliografia em seres



humanos, distanciando-se um pouco do que acontece nos murganhos. As fibras são visíveis no próprio tumor em toda a sua extensão a rodear várias fiadas de hepatócitos, que podem chegar às seis, apresentando assim o típico padrão anormal das fibras, característico destes tumores (Fig. 11).

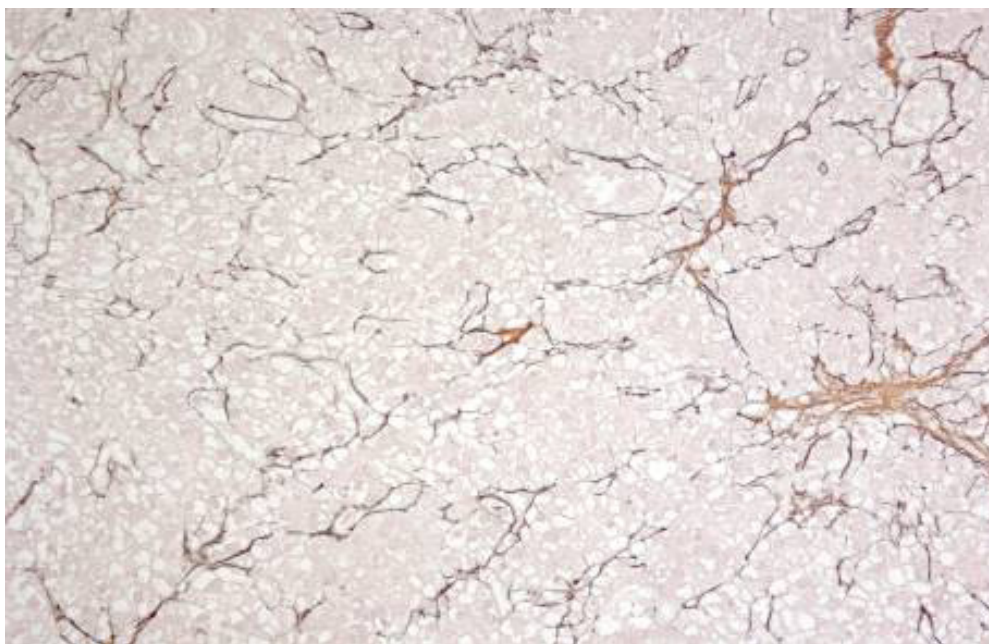


Figura 11: Disposição anormal das fibras de reticulina no CHC bem diferenciado no cão (Reticulina, 200x).

No CHC indiferenciado do cão observa-se uma perda completa da estrutura das fibras de reticulina, estando esta apenas presente no tecido adjacente ao tumor que está a ser comprimido, como se pode observar na figura 12. Este padrão assemelha-se ao que é observado no caso dos carcinomas em murganhos.

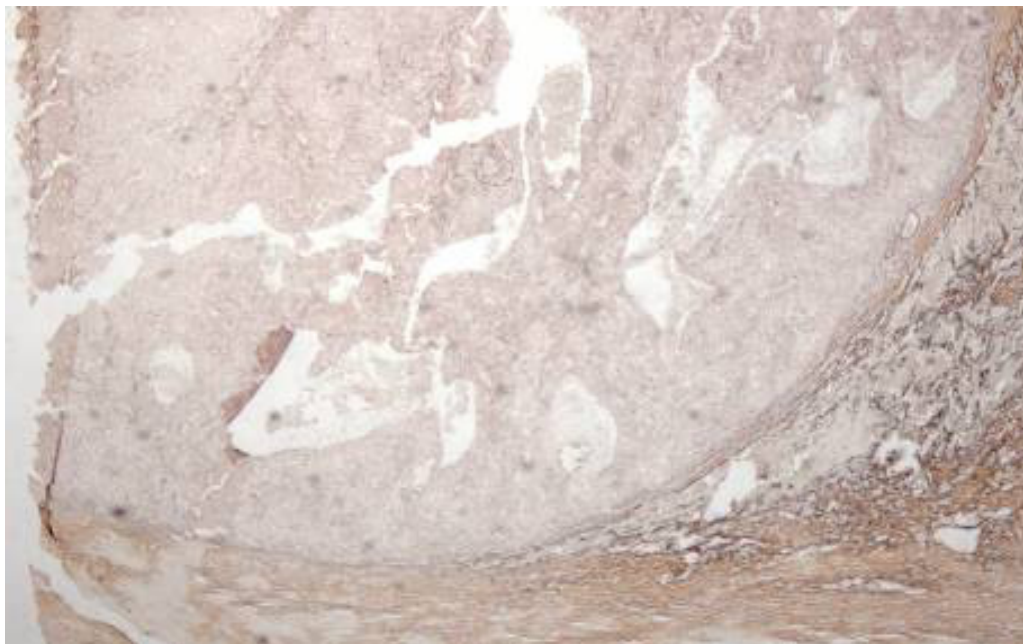


Figura 12: Disposição das fibras de reticulina no CHC indiferenciado no cão (Reticulina, 40x).

#### 4. Discussão

A coloração com HE é a coloração de eleição para o diagnóstico de carcinomas em biópsias hepáticas em seres humanos (Brunt, 2012).

A etiologia do CHC está geralmente ligada a fatores ambientais, dietéticos ou de estilo de vida e ocorre de forma mais comum num fígado cirrótico. Curiosamente, uma proporção crescente de CHC têm começado a desenvolver-se em fígados não fibróticos ou minimamente fibróticos e uma mudança na etiologia subjacente pode ser observada.

Embora esse processo ainda não tenha sido completamente entendido, esse cenário de mudança também tem impacto no material observado pelos patologistas, apresentando-os com novos dilemas diagnósticos. Os critérios histopatológicos para o diagnóstico do CHC clássico e progressivo na Medicina Humana estão bem estabelecidos e são conhecidos, mas com o aumento da detecção de carcinomas pequenos e precoces devido a programas de rastreio de rotina, o diagnóstico destas pequenas lesões em biópsias representa ainda um desafio. Essas lesões podem ser muito mais difíceis de distinguir umas das outras do que o CHC avançado, que é geralmente um diagnóstico de HE de corte nítido (Schlageter *et al.*, 2014).

Por esse motivo, o papel da reticulina no diagnóstico de CHC e na distinção dos mesmos de tumores benignos e de outras lesões hepáticas na Medicina Humana tem vindo a ganhar espaço nas últimas décadas, um pouco ao mesmo ritmo das imunohistoquímicas (Yang *et al.*, 2004; Di Tommaso *et al.*, 2007; Brunt, 2012; Schlageter *et al.*, 2014; Swanson *et al.*, 2015).

No entanto, é um tipo de coloração bastante inexplorado no contexto da Medicina Veterinária, quer no ramo clínico de diagnóstico, quer também na área da investigação científica, onde ratos e murganhos tantas vezes funcionam como modelos de estudo para a espécie humana, e essa foi a principal razão que desencadeou este projecto.

No fígado saudável de murganho, as fibras aparecem tenuamente coradas a negro, separando as fiadas de hepatócitos de forma homogénea mas não sendo perceptíveis em toda a extensão dos ácinos. Estão aliás mais evidentes junto aos espaços porta, colocando algumas dúvidas em relação à sua disposição nas zonas mais centrolobulares. Este padrão está de acordo com a bibliografia existente nesta espécie,

que relata uma irregularidade da mesma no tecido hepático saudável, tornando por vezes esta coloração difícil de avaliar (Dowman *et al.*, 2014).

Estas diferenças entre espécies podem dar-se pelo facto da arquitectura histológica do fígado não ser exactamente igual entre elas (o tecido conjuntivo muito escasso no fígado do murganho torna o reconhecimento da sua estrutura lobular um desafio), apesar dos murganhos servirem muitas vezes como modelos de humana no que diz respeito a CHC e a outras doenças hepáticas e de apresentarem características fundamentais do fígado bastante semelhantes às características do fígado de outras espécies de mamíferos (Rappaport *et al.*, 1954; Baratta *et al.*, 2009). O fígado do rato exhibe no entanto os mesmos constituintes celulares e subcelulares do que os fígados de outras espécies de mamíferos (Baratta *et al.*, 2009). Pode dar-se igualmente o caso da coloração ter menos afinidade para as fibras de reticulina no caso dos murganhos, apesar de não existir bibliografia que sustente esta suposição. A escassa bibliografia sobre o uso da reticulina em fígados de roedores não faz referência a estas diferenças entre espécies (Dowman *et al.*, 2014; Resaz *et al.*, 2014).

Em Medicina Humana, na maioria dos casos de hiperplasia nodular não se observam alterações relativamente à presença das fibras de reticulina nem tão pouco à sua disposição clássica por entre fiadas de hepatócitos, apesar de por vezes zonas de esteatose apresentarem um maior número de cordões de hepatócitos entre as fibras do que seria de esperar (Swanson *et al.*, 2015).

As displasias nos murganhos apresentam um padrão semelhante ao do fígado normal, não se observando diferenças entre o parênquima hepático saudável e as zonas displásicas com a coloração da reticulina, mostrando-se estes resultados concordantes com os da bibliografia (Douglas, 2011; Santos *et al.*, 2012).

A extensão até à qual as lesões em murganho são comparáveis com neoplasias hepatocelulares no fígado humano não está totalmente estabelecida, apesar de os modelos que utilizam a DEN serem representativos para o CHC humano, podendo servir como uma excelente plataforma para o desenvolvimento de novas ações terapêuticas (Heindryckx *et al.*, 2010).

Na tentativa de resolver este problema, Dowman realizou em 2014 uma caracterização detalhada, usando muitos dos marcadores usados para diagnosticar CHC precoce em fígados humanos. Esta caracterização revelou muitas características

consistentes com as dos carcinomas hepáticos em seres humanos, incluindo a perda de estruturas biliares, interrupção ou perda de fibras de reticulina e acumulação nuclear de b-catenina. Essas alterações foram acompanhadas por vários graus de atipia citológica que também são reconhecidos como uma característica do CHC humano, estabelecendo isso como um modelo inovador para o estudo do desenvolvimento do CHC no contexto da esteatohepatite não-alcoólica.

A coloração da reticulina é utilizada nestes modelos de CHC para confirmar a presença de tumores e para fazer a distinção entre focos de displasia, como Heindryckx descreve num artigo publicado em 2010. O autor identificou os nódulos e mediu-os recorrendo à reticulina e à H&E, não com o propósito de comparar as duas colorações mas com o objectivo de avaliar o desenvolvimento dos tumores ao longo das semanas. Outros autores fazem igualmente da reticulina uma coloração que sustenta o diagnóstico dos CHC em roedores (Serizawa *et al.*, 2015).

Se fica claro que a coloração de Gordon & Sweet permite distinguir com maior certeza os CHC das zonas hiperplásicas e do tecido hepático normal, a disposição das fibras de reticulina no que toca a este tipo de tumores já não é tão unânime. Neste estudo verificou-se que os CHC dos murganhos formam com esta coloração nódulos bem evidentes na maioria dos casos porque as fibras coradas a negro estão empurradas para a periferia do tumor e formam uma rede compacta que permite estabelecer limites bastante precisos do mesmo. No entanto, no interior dos tumores, as fibras de reticulina estão na sua maioria ausentes, apesar de existirem vestígios das mesmas em alguns dos nódulos observados.

Existem vários estudos que referem uma redução do número de fibras de reticulina presentes nestes tumores (Dowman *et al.*, 2014; Serizawa *et al.*, 2015) e também uma descontinuidade das mesmas (Schmidt *et al.*, 2008) em murganhos, mas não uma ausência completa de fibras dentro destes nódulos. No entanto, esta ausência de reticulina está reportada em vários estudos de Medicina Humana (Roncalli *et al.*, 2010; Brunt, 2012) e não deixa de se enquadrar naquilo que caracteriza os CHC, ou seja, a perda da estrutura típica destas fibras entre os cordões de hepatócitos.

Em raros casos neste estudo se observaram padrões de reticulina nos CHC semelhantes aos do parênquima normal. Tal poderá ser explicado pela já fraca e heterogénea coloração das fibras no fígado saudável no caso dos murganhos. Não existe

bibliografia que relate um padrão normal em carcinomas no caso de roedores mas estão publicados alguns *case report* em Medicina Humana que colocam em questão a fiabilidade da coloração de Gordon & Sweet no que toca ao diagnóstico destes tumores por haver preservação da estrutura típica das fibras (Wilkins *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2011). Mesmo nestes artigos há zonas tumorais que apresentam conservação do padrão normal e outras onde este se encontra alterado.

A diferença de três tumores encontrada entre as contagens com a HE e a reticulina nos fígados de murganho é explicada pelo facto de existirem nódulos que não são claramente identificados como tumores com a HE, sendo a sua apresentação mais sugestiva de displasia hepática. O facto das fibras de reticulina se disporem na periferia dos nódulos ajuda a delimitar os mesmos e a identificar alguns que poderiam ter sido ignorados com a coloração de rotina. Põe ainda em evidência alguns nódulos individuais mais pequenos que, à primeira vista com a HE estariam incorporados no tumor maior.

Há que ter no entanto em conta que nem sempre neste estudo a reticulina identifica com maior precisão os carcinomas, comparativamente com a HE.

Tendo em conta que os cortes corados com a reticulina diferiam em apenas alguns micrómetros daqueles corados com a HE, seria de esperar que a contagem da área dos tumores fosse semelhante, uma vez que tanto havia a possibilidade de apanhar os nódulos na sua fase crescente, como decrescente. Desta forma, a área de um mesmo nódulo identificado com a HE e com a reticulina nunca seria exactamente igual nas duas lâminas mas seria variável consoante o corte efectuado. No entanto, isto não explica o facto de as áreas tumorais serem sistematicamente maiores na coloração de rotina, em comparação com a reticulina. Este achado tratar-se-á possivelmente de um acaso, uma vez que a correlação entre áreas medidas com HE e reticulina se encontra muito próxima da perfeição.

Em relação ao significado estatístico destes resultados, apesar das áreas de tumor serem quase sempre superiores quando observadas com a HE, existe uma correlação quase perfeita entre os dois métodos, o que permite a indicação de que as duas colorações são equivalentes e que podem ser utilizados de forma segura para medição de áreas, consoante a conveniência, sem perda de validade dos resultados.



Já no cão, não parecem haver diferenças na coloração negra da reticulina consoante as zonas de parênquima hepático e as fibras coram de uma forma mais intensa, muito semelhante ao que se observa nos artigos publicados sobre seres humanos. A bibliografia frisa o facto das fibras aparecem em preto contra um fundo cinzento a rosa claro, estando presentes como parte da matriz extracelular no espaço de Disse (Zachary, 2012). Ao colocar estas fibras em evidência, a coloração ajuda na avaliação da arquitetura hepática (Krishna, 2013).

Segundo a bibliografia, os cordões de hepatócitos têm geralmente apenas uma célula de espessura e estão arrançados em volta da veia hepática central criando um padrão radial dos sinusóides que é acompanhado pelas fibras de reticulina (Charles *et al.*, 2009), o que é verificado no controlo saudável desta pequena amostra.

No cão, as fibras de reticulina apresentam uma menor intensidade de coloração nas zonas de hiperplasia nodular, sugerindo que existe nestas lesões já alguma perda da estrutura normal das fibras em redor dos hepatócitos. Charles *et al.* (2009) mencionam no entanto que as lesões de hiperplasia nodular em canídeos conservam uma arquitectura lobular e são constituídos por uma dupla camada de cordões de hepatócitos bem diferenciados com ligeira compressão do parênquima circundante.

A hepatite crónica no cão é caracterizada por apoptose ou necrose hepatocelular, um infiltrado mononuclear ou inflamatório misto, regeneração e fibrose. A fibrose está associada ao colapso e condensação da rede de reticulina ou à ativação direta das células de Ito com deposição perisinusoidal de colagénio (Rothuizen *et al.*, 2006). Com a coloração de Gordon & Sweet é esse mesmo colapso das fibras de reticulina que é possível observar. Já não se vê pelo menos uma fiada de hepatócitos entre as fibras coradas a negro mas uma concentração das mesmas que acaba por alterar a estrutura normal do parênquima hepático saudável.

Ferrell *et al.* referiram em 2011 que no fígado a necrose era acompanhada pelo colapso da arquitetura do órgão. Nestas áreas, a mancha de reticulina delimita a arquitectura residual colapsada, mas mostra manchas indistintas densas em áreas fibróticas.

A necrose e o conseqüente colapso da estrutura da reticulina pode ser facilmente confundida com a fibrose. Segundo alguns autores, a distinção pode ser

auxiliada por colorações de impregnação de prata, tal como a de Gordon & Sweet (Saxena *et al.*, 2017).

Neste trabalho verificou-se que na lâmina correspondente à hepatite crónica canina, as zonas necrosadas apresentam uma ausência de reticulina mas não existe propriamente um delineamento das fibras da zona necrosada. A fibrose observa-se como uma condensação da rede de reticulina, tal como demonstrado por Rothuizen (2006).

No exemplo de CHC bem diferenciado em cão neste estudo observou-se que as fibras são visíveis a rodear várias fiadas de hepatócitos, que podem chegar às seis. Não está disponível bibliografia que corrobore esta mesma apresentação da reticulina em cães mas este padrão desorganizado está tipicamente descrito em seres humanos (Yang *et al.*, 2004; Schlageter *et al.*, 2014; Swanson *et al.*, 2015).

No caso exemplificativo de carcinoma hepatocelular mal diferenciado da espécie canina, existem zonas com uma ausência de fibras de reticulina no interior do tumor, estando estas apenas presentes de forma compacta no pouco tecido circundante ao tumor que é possível apreciar. Observam-se concomitantemente áreas em que as fibras estão presentes a rodear numerosos cordões de hepatócitos, como se viu no caso do carcinoma bem diferenciado, indicando que para este caso o padrão não é linear e podem existir zonas do tumor mais indiferenciadas do que outras.

O facto de, no caso de muitas biópsias hepáticas realizadas em meio hospitalar na Medicina Veterinária, serem apenas colhidas as zonas de lesão sem tecido saudável poderá levar a que haja uma má interpretação da disposição das fibras de reticulina com a técnica de Gordon & Sweet uma vez que não existem limites definidos para as próprias lesões, para além de não ser possível comparar com o parênquima hepático normal.

A dificuldade da técnica relativamente a outras comumente utilizadas no diagnóstico de lesões hepáticas tais como HE, Vermelho de Congo, PAS ou Van Gieson pode ter colocado a coloração de Gordon & Sweet num plano mais distante quando se fala no diagnóstico de CHC na Medicina Veterinária. Alguns dos reagentes podem apenas ser conservados no frio durante uma semana, obrigando à reformulação dos mesmos passado este tempo, o que torna a técnica ainda mais morosa, para além de serem quase sempre desperdiçados reagentes. Acrescentam-se as preocupações com o facto de alguns reagentes serem perigosos e necessitarem de cuidado ao serem

manipulados (Crookham, 1991). Os utensílios de metal não podem ser utilizados uma vez que podem contaminar as amostras. Estas dificuldades são inerentes a todas as colorações de prata (Bancroft e Stevens, 1982).

O preço pouco apelativo do kit de coloração também poderá ter impacto na sua utilização uma vez que não se trata de uma coloração essencial ao diagnóstico, permitindo apenas a confirmação do mesmo, e por isso muitos patologistas optam por não a realizar. Não deixa no entanto de ser uma técnica bastante acessível no mercado e de se tornar uma ferramenta valiosa para laboratórios que processem amostras hepáticas em quantidades suficientes para rentabilizar esta coloração.

## 5. Conclusão

Com este estudo foi possível concluir que a reticulina tem uma capacidade bastante boa para delimitar os CHC nos fígados de murganho e colocar estes tumores em evidência aquando da avaliação microscópica do órgão pelo facto das fibras serem empurradas para a periferia dos mesmos. É um bom método para realizar contagens de tumores e medir as áreas dos mesmos em projectos de investigação nos quais estes animais sejam usados como modelos para CHC em seres humanos.

Embora estes sejam resultados promissores, também foi observado que nem sempre são lineares e que o padrão de reticulina em focos de displasia e fígado normal no murganho é um tanto duvidoso em alguns casos.

A amostragem muito reduzida no cão não permite tirar qualquer conclusão. Esta espécie foi utilizada neste trabalho para de certa forma se perceber se a utilização da reticulina poderia ser uma opção na diferenciação de tumores hepáticos caninos de outras lesões. Os exemplos deste estudo parecem indicar que sim mas outros trabalhos com uma maior amostragem seriam necessários para se poder realizar uma extrapolação para a população canina. Um estudo de maiores dimensões e com lesões hepáticas mais variadas poderia permitir o estabelecimento de um padrão da reticulina, tanto para tumores hepáticos como para lesões não neoplásicas. É importante no entanto referir que os resultados obtidos em relação aos padrões estão descritos tanto na bibliografia referente à Medicina Humana como nas escassas referências ao uso da reticulina na espécie canina.

Teria sido igualmente interessante utilizar algumas amostras de adenoma hepatocelular para fazer a comparação com os tumores malignos mas tal não foi possível pela falta de amostras.

É importante referir que nenhuma técnica é 100% sensível ou específica, e que a coloração principal para o diagnóstico continua a ser a HE. As colorações de reticulina e a imuno-histoquímica podem ser usadas com cautela para confirmação de resultados. A reticulina pode assim ser um importante auxiliar na diferenciação de HCC de lesões benignas, mas deve ser usada com precaução e apoiar o diagnóstico feito por HE. A dificuldade da técnica e o preço do kit de coloração permanecem uma das principais limitações à sua utilização no diagnóstico de CHC em Medicina Veterinária.

## 6. Referências Bibliográficas

Aslan, O., Cakir, L., Bekdik, I., Dogan, Z. and Tunc, A. (2014). Cholangiocarcinoma of intrahepatic bile ducts with disseminated metastases in a Siamese cat: a case report. *Veterinarni Medicina*, 59(7), pp.359–367.

Arohson M.G., Dubiel B., Roberts B., (2009). Prognosis for acute nontraumatic hemoperitoneum in the dog: a retrospective analysis of 60 cases (2003-2006), *J Am Anim Hosp Assoc* 45:72.

Baba, A., Catoi, C. and Baba, A. (2007). *Comparative oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy.

Bancroft J., Stevens A. (1982). *Theory and Practice of Histological Techniques*, 2nd Ed, pp142-143, Churchill Livingstone, NY.

Baratta, J., Ngo, A., Lopez, B., Kasabwalla, N., Longmuir, K. and Robertson, R. (2009). Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(6), pp.713-726.

Bartlett D.L., Carr B.I., Marsh J.W. (2005). Cancer of the liver. In DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., editors: *Cancer: principles and practice of oncology*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Bergman, J.R. (1985). Nodular Hyperplasia in the Liver of the Dog: An Association with Changes in the Ito Cell Population. *Veterinary Pathology*, 22(5), pp.427-438.

Bialecki, E. (2005). Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB Oxford*, 7(1), pp.26-34.

Blum, H. (2005). Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention. *World Journal of Gastroenterology*, 2005;11(47):7391-7400.

Brunt, E. (2012). Histopathologic features of hepatocellular carcinoma. *Clinical Liver Disease*, 1(6), pp.194-199.

Carson S., Freida L. (1997), *Histotechnology A Self-Instructional Text*, ASCP Press.

Chang C.Y., Hernandez-Prera J.C., Roayaie S., Schwartz M., Thung S.N. (2013). Changing epidemiology of hepatocellular adenoma in the United States: review of the literature. *Int J Hepatol*. 2013:604860.

Crookham J., Dapson R. (1991). *Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory*, 2nd edition, Anatech.

Cullen J.M., Poop J.A. (2002): Tumours of the liver and gallbladder. In: Meuten DJ (ed.): *Tumours in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Pres, Iowa, USA. 495–499.

Cullen J. M. (2007). Pathology of the Liver: What's New and What's Still True. Comunicação apresentada na C.L. Davis Foundation Pre-Meeting Workshop, Savannah, Georgia.

Deng, Q., She, H., Cheng, J., French, S., Koop, D., Xiong, S. and Tsukamoto, H. (2005). Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology*, 42(4), pp.905-914.

Di Tommaso L., Destro A., Seok J.Y., Balladore E., Terracciano L., Sangiovanni A., et al (2009). The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 50: 746-754.

Di Tommaso L., Franchi G., Park Y.N., Fiamengo B., Destro A., Morengi E., et al (2007). Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:725-734.

Douglas, J. (2011). *Carcinogenesis and mutagenesis testing*. 1st ed. [Place of publication not identified]: Humana.

Dowman, J., Hopkins, L., Reynolds, G., Nikolaou, N., Armstrong, M., Shaw, J., Houlihan, D., Lalor, P., Tomlinson, J., Hübscher, S. and Newsome, P. (2014). Development of Hepatocellular Carcinoma in a Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by Use of a High-Fat/Fructose Diet and Sedentary Lifestyle. *The American Journal of Pathology*, 184(5), pp.1550-1561.

- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J., Rath, M. and Wagner, E. (2003). Liver Tumor Development. *Cell*, 112(2), pp.181-192.
- Eves, N. (2004). Hepatocellular adenoma in a 12-year-old crossbred German shepherd dog. *Canadian Veterinary Journal*, 45(4), pp.326–328.
- Farazi P.A., DePinho R.A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6:674–87.
- Fattovich G., Stroffolini T., Zagni I., Donato F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 127:S35–S50.
- Feeney D.A., Johnston G.R., Hardy R.M. (1984). Two-dimensional, gray-scale ultrasonography for assessment of hepatic and splenic neoplasia in the dog and cat, *J Am Vet Med Assoc* 184:68.
- Ferrell L.D., Crawford J.M., Dhillon A.P. (1993). Proposal for standardized criteria for the diagnosis of benign, borderline, and malignant hepatocellular lesions arising in chronic advanced liver-disease. *Am J Surg Pathol* 17:1113–1123.
- Ferrell, L. and Kakar, S. (2011). *Liver pathology*. 1st ed. New York [N.Y.]: Demos Medical.
- Fogh, J., Giovanella, B. and Armstrong, D. (1978). *The nude mouse in experimental and clinical research*. 1st ed. New York [etc.]: Academic Press.
- Gordon, H. and Sweet, H.H. (1936). A simple method for the silver impregnation of reticulin. *American Journal of Pathology*, V12, p545.
- Hahn K.A and Richardson R.C. (1995). Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with naturally occurring malignant neoplasia, *Vet Clin Pathol* 24:18.
- He, L., Tian, D., Li, P. and He, X. (2015). Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations. *Oncotarget*, 6(27), pp.23306-23322.
- Heindryckx, F., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(4), pp.367-386.

Heindryckx, F., Mertens, K., Charette, N., Vandeghinste, B., Casteleyn, C., Van Steenkiste, C., Slaets, D., Libbrecht, L., Staelens, S., Starkel, P., Geerts, A., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. (2010). Kinetics of angiogenic changes in a new mouse model for hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 9(1), p.219.

Hong, H., Patonay, B. and Finley, J. (2011). Unusual reticulin staining pattern in well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Pathology*, 6(1), p.15.

International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (2009). Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 49:658–64.

Kato, M. (1993). Relationship between Hepatocyte Necrosis, Proliferation, and Initiation Induced by Diethylnitrosamine in the Male F344 Rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 20(2), pp.155-162.

Kocjan, G., Gray, W., Levine, T., Kardum-Skelin, I. and Vielh, P. (2010). *Diagnostic cytopathology essentials*. 3rd ed. London: Elsevier.

Kojiro M., Roskams T. (2005). Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis* 25:133-142.

Krishna, M. (2013). Role of special stains in diagnostic liver pathology. *Clinical Liver Disease*, 2(S1), pp.S8-S10.

Liptak, J.M., Dernell W.S., Monnet E.(2004). Massive hepatocellular carcinoma in dogs: 48 cases (1992–2002) *J Am Vet Med Assoc*.;225:1225–1230.

Liptak, J.M. (2013). Hepatobiliary tumors. In: *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology* ( 5<sup>th</sup> ed., p. 405-412) St Louis: Elsevier-Saunders.

Longerich T., Haller M.T., Mogler C., Aulmann S., Lohmann V., Schirmacher P., *et al.* (2011). Annexin A2 as a differential diagnostic marker of hepatocellular tumors. *Pathol Res Pract* 207:8-14.



Magne M.L., Withrow S.J. (1985). Hepatic neoplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*;15:243–256.

Mittal S. and El-Serag H. (2013). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47 pp.S2-S6.

Moulton, J. (1990). *Tumors in domestic animals*. Berkeley: University of California Press.

Morrison, W.B. (2002). *Cancer in Dogs and Cats. Medical and Surgical Management* 2<sup>nd</sup> ed. Jackson, Wyoming: Teton NewMedia.

Nordenstedt, H., White, D. and El-Serag, H. (2010). The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 42, pp.S206-S214.

Paradis, V. (2013). Histopathology of Hepatocellular Carcinoma. *Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma*, 190.

Park Y.N. (2011). Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 135:704-715.

Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H. (1980). Canine hepatic neoplasms: a clinicopathological study, *Vet Pathol* 17:553.

Patnaik, A., Hurvitz, A., Lieberman, P. and Johnson, G. (1981). Canine Hepatocellular Carcinoma. *Veterinary Pathology*, 18(4), pp.427-438.

Pitot H.C. and Dragan Y.P. (1991) Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* 5, 2280–2286.

Rappaport A.M., Borrowy Z.J., Loughheed W.M., Lotto W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec.* 119:11–33.

Resaz, R., Vanni, C., Segalerba, D., Sementa, A., Mastracci, L., Grillo, F. *et al.* (2014). Development of hepatocellular adenomas and carcinomas in mice with liver-specific G6Pase- deficiency. *Disease Models & Mechanisms*, 7(9), pp.1083-1091.

Rest, J. (2008). Liver Tumors Metastatic and Miscellaneous. Acedido a 15 de Junho de 2017 em: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/liver-tumors-metastatic-and-miscellaneous>

Roncalli, M., Park, Y., Di Tommaso, L. (2010). Histopathological classification of hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 42, pp.S228-S234.

Roncalli M., Terracciano L., Di Tommaso L., David E., Colombo M. (2011). Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: the histology report. *Dig Liver Dis*; 43 Suppl 4: S361-S372 [PMID: 21459342 DOI: 10.1016/S1590-8658(11)60592-6]

Rothuizen, J., Bunch, S., Charles, J., Desmet, V., Szatmari, V., Twedt S., *et al.* (2006). WSAVA standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver disease. *1st ed. Saintt Louis: Saunders/Elsevier Health Sciences UK.*

Santos, N., Pereira, I., Pires, M., Lopes, C., Andrade, R., Oliveira, M., *et al.* (2012). Histology, Bioenergetics and Oxidative Stress in Mouse Liver Exposed to N-Diethylnitrosamine. *In Vivo*, 6: 921-930.

Saxena, R. (2017). *Practical hepatic pathology*. 1st ed. Elsevier Health Sciences.

Schlageter, M., Terracciano, L., D'Angelo, S., Sorrentino, P. (2014). Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), p.15955.

Schmidt, V., Chiariello, C., Capilla, E., Miller, F., Bahou, W. (2008). Development of Hepatocellular Carcinoma in Iqgap2-Deficient Mice Is IQGAP1 Dependent. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), pp.1489-1502.

Serizawa, N., Tian, J., Fukada, H., Baghy, K., Scott, F., Chen, X., *et al.* (2015). Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. *Laboratory Investigation*, 95(10), pp.1145-1156.

Swanson, B., Yearsley, M., Marsh, W., Frankel, W. (2015). A Triple Stain of Reticulin, Glypican-3, and Glutamine Synthetase: A Useful Aid in the Diagnosis of Liver Lesions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 139(4), pp.537-542.

Tamano S., Merlino G.T., Ward J.M. (1994). Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell

proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis*. 15:1791–1798.

Thamm D.H. (2001). Hepatobiliary tumors. In Withrow SJ, MacEwen EG, editors: *Small animal clinical oncology*, ed 3, Philadelphia, WB Saunders.

Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*; 65:87–108.

VanSaun, M., Lee, I., Washington, M., Matrisian, L., Gorden, D. (2009). High Fat Diet Induced Hepatic Steatosis Establishes a Permissive Microenvironment for Colorectal Metastases and Promotes Primary Dysplasia in a Murine Model. *The American Journal of Pathology*, 175(1), pp.355-364.

Vörös K., Vrabély T., Papp L. (1991). Correlation of ultrasonographic and pathomorphological findings in canine hepatic diseases, *J Small Anim Pract* 32:627.

Watson, P.J. and Bunch S.E. (2010). Hepatobiliary and exocrine pancreas disorders. In: *Manual of small animal internal medicine*. St. Louis: Mosby.

Wilkens, L., Becker, T., Schlegelberger, B., Kreipe, H., Flemming, P. (2006). Preserved reticulin network in a case of hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, 48(7), pp.876-878.

Yamada T., Fujita M., Kitao S. (1999). Serum alpha-fetoprotein values in dogs with various hepatic diseases, *J Vet Med Sci* 61:657.

Yang, G., Yang, G., Tao, L. (2004). Distinguishing well-differentiated hepatocellular carcinoma from benign liver by the physical features of fine-needle aspirates. *Modern Pathology*, 17(7), pp.798-802.

Zachary, J. (n.d.). *Pathologic basis of veterinary disease*. 1st ed.



## 7. Anexos

Tabela 1 – Correlação entre a área tumoral medida com a coloração da hematoxilina e eosina e a área tumoral medida com a coloração da reticulina.

### Correlations

		AreaHeEo	AreaRe
AreaHeEo	Pearson Correlation	1	,999**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	10	10
AreaRe	Pearson Correlation	,999**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	10	10