

Carcinoma hepatocelular metastático em *Amazona aestiva*

Metastatic Hepatocellular Carcinoma in *Amazona aestiva*

Karoline Lacerda Soares¹, Millena de Oliveira Firmino², Raquel Annes Fagundes Silva³,
Mônica Shinneider de Sousa³, Raquel Mota de Freitas Pereira⁴, Telma de Sousa Lima⁴,
Jeann Leal de Araújo¹ & Ricardo Barbosa de Lucena¹

ABSTRACT

Background: Hepatocellular carcinoma is a primary malignant tumor of the liver tissue and its occurrence in birds is considered rare. The tumor can occur as a single mass leading to hepatomegaly, or as multiple nodules in the liver. In animals of the genus *Amazona*, only 1 case of metastatic hepatocellular carcinoma has been reported in the United States, therefore, little is known about its epidemiology and clinicopathological aspects in these species. In this context, the aim of this work was to describe a case of metastatic hepatocellular carcinoma in an *Amazona aestiva*.

Case: A blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*) was referred to necropsy after being found dead in its enclosure. On examination, it presented cachectic body score. Examination of the coelomic cavity, revealed a serous translucent fluid and adhesions between the liver and peritoneum. A red mass restricted to the right hepatic lobe and raised to the capsular surface, interspersed with whitish and dark red multifocal areas was observed. When cut, this mass was soft, protruding, multilobulated, whitish and with a friable reddish center. Additionally, on the dorsal surface of the left lung lobe, there was a rounded, well defined, whitish, and soft nodule. Microscopically, partial replacement of the hepatic parenchyma was observed by neoplastic proliferation of cuboidal epithelial cells, organized in mantle and supported by a scarce fibrovascular stroma. Cells have large, eosinophilic, well-delimited cytoplasm, with a central, oval nucleus, loose chromatin, and evident nucleolus. Moderate pleomorphism was characterized by anisocytosis, anisokaryosis, and aberrant nuclei. In the lung, a focally extensive mass with a pattern similar to that seen in the liver was observed. In the kidney, multifocal neoplastic emboli were noted. Liver immunohistochemistry was performed. Positive and negative controls were used to validate the reaction; however, there was no immunolabelling for the evaluated antibodies.

Discussion: The histopathological characteristics observed in this study favored the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) with metastasis to kidney and lung. Primary liver tumors are rare in wild birds. In ducks, experimental studies have pointed aflatoxins and the duck hepatitis B virus as oncogenic agents, however, in birds of the genus *Amazona*, there are no studies that evaluate predisposing factors to the development of liver carcinoma. Macroscopically, hepatocellular carcinoma may present in massive, nodular or diffuse forms. In birds, the right lobe is the largest, which may suggest that this lobe is more prone to the development of HCC, as seen in the present case. The solid form, similar to that observed in this report, seems to be more commonly observed, as seen in the wild bird reports consulted. Metastases most often spread hematogenous, and in the present report there was metastasis to kidneys and lungs, which is a common feature for this neoplasm. In the present case, there was no labeling by any of the antibodies, perhaps because of their aggressiveness, associated with autolytic factors that prevent the labeling of antibodies, in addition to the specificity in the antibody-antigen relationship. This tumor must be differentiated from other liver tumors such as cholangiocarcinoma, and also the well-differentiated hepatocellular adenoma, in addition to non-neoplastic conditions. HCC should be considered as a differential diagnosis for *Amazona aestiva* found dead in the enclosure without previous clinical signs. This neoplasm is rare in Amazon parrots and reports should be encouraged in order to contribute to the understanding of the epidemiological and clinicopathological aspects of the tumor.

Keywords: avian pathology, liver, neoplasm, immunohistochemistry.

Descritores: patologia aviária, fígado, neoplasma, imuno-histoquímica.

DOI: 10.22456/1679-9216.121835

Received: 18 July 2022

Accepted: 10 December 2022

Published: 7 February 2023

¹Universidade Federal da Paraíba (UFPB) & ²Hospital Veterinário (HV) - UFPB, Areia, PB, Brazil. ³Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB. ⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil. CORRESPONDENCE: K.L. Soares [karoline_lacerda@hotmail.com]. UFPB - Centro de Ciências Agrárias, Campus II, PB-079. CEP 58397-000 Areia, PB, Brazil.

INTRODUÇÃO

As aves encontram-se entre as espécies mais afetadas pelo tráfico de animais selvagens do mundo [15], destacando-se a ordem Psitaciformes, a qual pertence o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). O aumento da expectativa de vida desses indivíduos criados em cativeiro em comparação com os animais de vida livre amplia o tempo de exposição a agentes ambientais carcinogênicos, com isso, há possibilidade de falhas no reparo aos danos sofridos, importantes fatores relacionados ao surgimento de tumores em aves silvestres mantidas em cativeiro [21].

O carcinoma hepatocelular é um tumor maligno primário do tecido hepático [6], cuja ocorrência em aves é considerada rara [24]. O tumor pode ocorrer como uma massa única que resulta em hepatomegalia, ou como múltiplos nódulos no fígado [7]. Em aves silvestres há relatos em flamingos (*Phoenicopterus minor*, *Phoenicopterus ruber chilensis*) [23,24], em 1 calau (*Buceros hydrocerox hydrocerox*) [23], em 1 mutum pinima (*Crax fasciolata*) [16], em 1 bobo-grande (*Calonectris borealis*) [12] e em 1 arara Canindé (*Ara ararauna*) [1]. Geralmente esses tumores ocorrem sem alterações clínicas perceptíveis, e os animais por vezes são encontrados mortos, o que dificulta a identificação do percentual de ocorrência dessa neoplasia na natureza [23].

Em animais do gênero *Amazona* sp., é reportado apenas 1 caso de carcinoma hepatocelular metastático nos Estados Unidos [10], até o presente momento, de modo que pouco se sabe sobre sua epidemiologia e aspectos clinico-patológicos nessas espécies. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi descrever 1 caso de carcinoma hepatocelular metastático em 1 *Amazona aestiva* apreendido do tráfico.

CASO

Um papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), oriundo de tráfico e mantido posteriormente no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Paraíba (CETAS-PB), foi encaminhado para necropsia após ser encontrado morto em seu recinto. Não foram verificados sinais clínicos ou outras alterações antes da morte.

Na necropsia foram observados caquexia, presença de fezes amolecidas na cloaca e evidência de corte de rêmiges primárias em ambas as asas. Na abertura da cavidade celomática foi visualizado líquido translúcido seroso livre e aderências entre fígado e

peritônio (Figura 1A). Além disso, havia uma massa restrita ao lobo hepático direito, subcapsular, elevada, vermelha entremecada por áreas multifocais esbranquiçadas e vermelho-escuras, medindo 4,7 x 2,5 x 2,6 cm (Figura 1B). Ao corte essa massa era macia, protrusa, multilobulada, esbranquiçada, com centro avermelhado e friável (Figura 1C). Os pulmões encontravam-se difusamente avermelhados e na face dorsal do lobo pulmonar esquerdo, havia 1 nódulo arredondado, bem delimitado, esbranquiçado, macio e de 0,3 cm de diâmetro, que se aprofundava ao parênquima pulmonar.

Todos os órgãos cavitários e sistema nervoso central foram coletados, fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. As lâminas foram cortadas em 4 µm e coradas em hematoxilina e eosina¹.

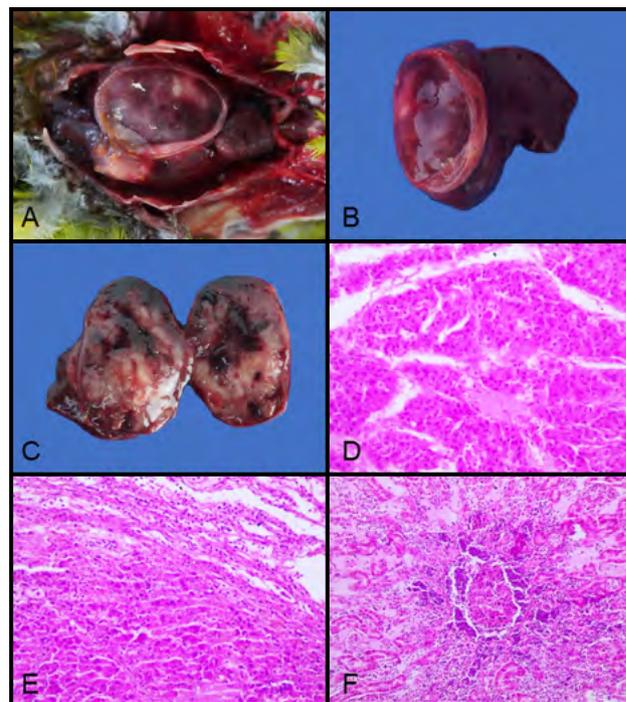


Figura 1. Carcinoma hepatocelular metastático em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). A- Cavidade celomática com líquido translúcido seroso livre e aderências entre fígado e peritônio. B- Fígado com massa restrita ao lobo hepático direito, subcapsular, elevada, vermelha entremecada por áreas multifocais esbranquiçadas e vermelho-escuras, medindo 4,7 x 2,5 x 2,6 cm. C- Fígado, ao corte com massa macia, protrusa, multilobulada, esbranquiçada, com centro avermelhado e friável. D- Fotomicrografia de fígado. Observa-se substituição parcial do parênquima por proliferação neoplásica de células epiteliais cuboidais, distribuídas em manto, sustentadas por escasso estroma fibrovascular. As células possuíam citoplasma amplo, eosinofílico, bem delimitado, núcleo central, oval, cromatina frouxa, com nucléolo evidente. Foram observadas entre zero a uma figura de mitose nos campos de maior aumento. Pleomorfismo moderado caracterizado por anisocitose, anisocariose e núcleos aberrantes. Em meio à neoplasia não foram visualizadas veias centrolobulares e as regiões periportais, além disso os sinusoides eram tortuosos e por vezes distendidos [HE; Obj.40x]. E- Fotomicrografia de pulmão com área focalmente extensa distendendo o parênquima e padrão semelhante ao observado no fígado [HE; Obj.40 x]. F- Rim, múltiplos êmbolos neoplásicos em pequenos capilares da região cortical [HE; Obj.40x].

Microscopicamente, no fígado observou-se substituição parcial do parênquima por proliferação neoplásica de células epiteliais cuboidais, distribuídas em manto, sustentadas por escasso estroma fibrovascular. As células possuíam citoplasma amplo, eosinofílico, bem delimitado, núcleo central, oval, cromatina frouxa, com nucléolo evidente. Foram observadas entre zero a uma figura de mitose nos campos de maior aumento. Pleomorfismo moderado caracterizado por anisocitose, anisocariose e núcleos aberrantes. Em meio à neoplasia não foram visualizadas veias centrolobulares e as regiões periportais, além disso, os sinusoides eram tortuosos e por vezes distendidos (Figura 1D). No pulmão havia área focalmente extensa de massa distendendo o parênquima pulmonar com padrão semelhante ao observado no fígado (Figura 1E). No rim foram visualizados múltiplos êmbolos neoplásicos em pequenos capilares da região cortical (Figura 1F).

Secções do tumor com tecido hepático adjacente foram submetidos ao exame de imunohistoquímica. Os cortes de tecido foram colocados sobre lâminas previamente silanizadas. A recuperação antigênica pelo método de calor úmido foi realizada em panela a vapor, por 20-30 min. Foram utilizados os marcadores HepPar² (diluição 1:200), CK19³ (diluição de rotina para uso) e Ki67³ (diluição 1:300). A incubação com os anticorpos primários foi feita por toda a noite a 4°C. Para revelação foi utilizado o sistema Advance. A coloração foi feita com 3,3 - diaminobenzidina e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Controles positivos e negativos foram utilizados para validar a reação; contudo, não houve imunomarcagem na massa tumoral ou tecido hepático com os anticorpos utilizados.

DISCUSSÃO

As características anatomopatológicas observadas neste papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) determinam o diagnóstico de carcinoma hepatocelular (HCC) com metástase para rim e pulmão. Tumores hepáticos primários são raros em aves silvestres e, pelo conhecimento dos autores, este é o primeiro relato em papagaio-verdadeiro no Brasil. Há relatos de heman-giossarcoma [11], fibrossarcoma [20], adenocarcinoma [22] e linfoma [20] hepáticos em aves silvestres, contudo com relação aos tumores hepáticos primários o colangiocarcinoma é o mais prevalente [9,11,19].

No gênero *Amazona* sp. o carcinoma hepatocelular foi descrito anteriormente nos Estados Unidos

[11] e mostrou semelhanças com o aqui relatado, com presença de massas em 1 lobo hepático composta por células de citoplasma amplo, vacuolizado e nucléolo evidente, além disso metástase para pulmão. No presente caso também foi evidenciado envolvimento renal, diferente do caso americano em que havia disseminação do neoplasma para o baço, o cérebro e a região periocular [10].

Em humanos o HCC é o tumor hepático mais observado e está associado a hepatite viral e cirrose hepática [4]. Nos animais domésticos têm-se como etiologias as aflatoxinas, parasitas hepáticos e compostos radioativos [3] e nos animais silvestres há hipóteses de que fatores que alterem o DNA dos hepatócitos desencadeiem a neoplasia, como vírus da hepatite em esquilos, marmotas e camundongos [13,14,17]. No caso estudado, não havia evidências de esteatose, fibrose ou infecções virais prévias. Dessa forma, a etiologia é incerta.

O papagaio tinha histórico de morar em uma residência sobre cuidados humanos, o que pode ter contribuído com sua idade prolongada em relação aos animais de vida livre. Em neoplasmas de aves os fatores hereditários relacionados à consanguinidade e o aumento na expectativa de vida de animais de cativeiro, pode contribuir com o surgimento dos tumores [20]. Em patos, estudos experimentais relacionaram o desenvolvimento da neoplasia tanto a aflatoxinas quanto ao vírus da hepatite B do pato [5], no entanto, em aves do gênero *Amazona* não há estudos que apontem predisposição ao desenvolvimento do carcinoma hepático. Não foi possível realizar o rastreamento de doenças virais na ave.

Os sinais clínicos relacionados ao carcinoma hepatocelular em aves são inespecíficos e incluem perda peso [24], anorexia e diarreia [10]. A ave do presente estudo não foi submetida a avaliação clínica, logo o emagrecimento foi notado apenas durante a necropsia, comprovada pela atrofia dos músculos peitorais e evidencição da quilha. Sugerindo que a massa hepática pode ter contribuído para o desenvolvimento da emaciação, aliado as condições de manejo durante a vida do animal.

Macroscopicamente o carcinoma hepatocelular pode se apresentar nas formas massivas, nodulares ou difusas [18]. Quanto à apresentação anatômica, não se sabe ao certo mas provavelmente o lobo hepático mais volumoso é mais predisposto ao desenvolvimento do

tumor, como ocorre em cães por exemplo [6]. No caso das aves, o lobo direito é o maior [8], e pode sugerir que esteja mais propenso ao desenvolvimento do HCC, como observado no presente caso. Com relação aos aspectos gerais do tumor, a massa mostrava-se semelhante ao descrito na literatura [11].

Microscopicamente, os HCCs são subdivididos em trabecular, pseudotrabeccular, esquistoso e sólido [6]. A forma sólida, similar ao observado neste relato, parece ser mais comumente observada [13,18], como visto nos relatos em aves silvestres consultados. A diferenciação dos demais padrões deve ser feita com minúcia, observando os arranjos em ácinos, pseudoácinos [6] dentre outras características histológicas do tumor.

Na imunohistoquímica não houve marcação no tecido hepático assim como na massa tumoral. O anticorpo HepPar1 é amplamente utilizado em cães e gatos, além deste, as células podem ser marcadas com anticorpos que reconhecem citoqueratina 19, um marcador de células progenitoras hepáticas imaturas, hepatócitos e células epiteliais biliares [7]. A ausência de marcação dos anticorpos, talvez seja explicado pelos fatores autolíticos que impedem a marcação dos anticorpos, além disso a especificidade na relação anticorpo-antígeno [2]. Deve-se considerar que o presente caso se trata de uma ave e para este grupo de animais não há disponibilidade de anticorpos imunohistoquímicos

hepáticos específicos, o que pode resultar em falha na marcação. Em 1 caso de hepatocarcinoma em flamingo houve apenas marcação com anticorpo monoclonal de camundongo anti-pan-citoqueratina [24].

Esse tumor deve ser diferenciado de outros tumores hepáticos como colangiocarcinoma, neoplasma comum em espécies domésticas e silvestres, que afeta as vias biliares [7,9,19,24], como também o adenoma hepatocelular bem diferenciado [7]. Além disso é importante diferenciar de condições não neoplásicas, incluindo a hiperplasia nodular, hiperplasia do ducto biliar e cistos biliares congênitos [10].

O carcinoma hepatocelular ocorre em *Amazona aestiva*, sendo este o primeiro relato no Brasil. Deve ser incluído no diagnóstico diferencial de lesões que afetam o fígado dessas aves e que cursam sem sintomatologia ou com sinais clínicos inespecíficos. Esse neoplasma é raro em papagaios e relatos devem ser incentivados a fim de contribuir para a compreensão dos aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos do tumor em psitacídeos.

MANUFACTURERS

¹EasyPath Diagnósticos. Indaiatuba, SP, Brazil.

²Cell Marque. Rocklin, CA, USA.

³Dako North America Inc. Carpinteria, CA, USA.

Declaration of interest. The authors declare no conflicts of interest. The authors are the only responsible for the content and writing of this article.

REFERENCES

- 1 Aires L.D.A., Silva Filho G.B., Chaves H.A.S., Medeiros F.F.C., Aguiar I.D.S., Braga J.F.V., Souza F.A.L. & Mendonça F.S. 2018. Carcinoma hepatocelular em *Ara ararauna* (Araracanindé). In: *Anais do X Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário*. (Recife, PE). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Outubro. 38(Supl.): pp.181-182.
- 2 Barra M.B. 2006. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS*. 50(2): 173-184.
- 3 Brovida C. & Rothuizen J. 2004. Liver and Pancreatic diseases. In: Stephen J. & Ettinger D.V.M. (Eds). *Veterinary Internal Medicine*. 7th edn. Los Angeles: Pet DRx Corporation, pp.1158-1159.
- 4 Brunetto M. R., Oliveri F., Koehler M., Zahm F., Bonino F., Darvich J., Findor J. A., Tanno H., Pinchuk L., Baldi M., Colombatto P., Colombo M., Del Ninno E., Fasani P., Rumi M. G., Tommasini M., Alberti A., Benvegno L., Chemello L., De Salvo G., Awetta M., Antonello S., Pardo F., Bruno S., Podda M., Andreone P., Bernardi M., Gasbarrini G., D'Aquino M., Tempesta D., Bottelli R., Devita A., Masucci F., Belloni G., Mangia A., Tappero G., Caporaso N., Mazzella G., Puoti M., Hoersch S. & Al Traif I. 1998. Effect of interferon- α on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: A retrospective cohort study. *The Lancet*. 351(9115): 1535-1539.
- 5 Cova L., Wild C. P., Mehrotra R., Turusov V., Shirai T., Lambert V., Jacquet C., Tomatis L., Trepo C. & Montesano R. 1990. Contribution of aflatoxin B1 and hepatitis B virus infection in the induction of liver tumors in ducks. *Cancer Research*. 50(7): 2156-2163.
- 6 Cullen J.M. 2017. Tumors of the Liver and Gallbladder. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 5th edn. Ames: John Wiley & Sons Inc., 602p.

- 7 **Cullen J.M. & Stalker J.M. 2016.** Liver and Biliary System. In: Jubb K.F.V., Kennedy P.C. & Palmer N.C. (Eds). *Pathology of Domestic Animals*. 6th edn. Guelph: M. Grant Maxie, pp.259-351.
- 8 **Denbow D. & Michael. 2015.** Gastrointestinal Anatomy and Physiology. In: Colin G. (Ed). *Sturkie's Avian Physiol.* 6th edn. Blacksburg: Virginia Tech, pp.337-366.
- 9 **Elangbam C.S. & Panciera R.J. 1998.** Cholangiocarcinoma in a Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*). *Avian disease*. 32(3): 594-596.
- 10 **Freeman K.P., Hahn K.A., Jones M.P., Petersen G. & Toal R.L. 1999.** Unusual presentation of an *Amazon parrot* (*Amazona* species) with hepatocellular carcinoma. *Avian Pathology*. 28(2): 203-206.
- 11 **Godoy S.N., Alves V.A.F.A., Kanamura C.T. & Matushima E.R. 2009.** Principais processos neoplásicos encontrados em psitacídeos mantidos em cativeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(6): 445-451.
- 12 **Mariani D.B., Silva Filho G.B., Chaves H.A.S., Febrônio A.D.M., Brandão S.D.S.F., Almeida B.J.M., Souza. F.A.L. & Mendonça F.S. 2016.** Carcinoma hepatocelular em *Calonectris borealis* (Bobo-grande) In: *Anais do IX Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário* (Salvador, Ba). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Outubro. 36(Supl. 2): 204-205.
- 13 **Marion P.L., Van Davelaar M.J., Knight S.S., Salazar F.H., Garcia G., Popper H. & Robinson W.S. 1986.** Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83(12): 4543-4546.
- 14 **McKenzie E.J., Jackson M., Sun J., Volotovskyy V. & Gruwel. M.L.H. 2005.** Monitoring the development of hepatocellular carcinoma in woodchucks using 31P-MRS. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 18(4): 201-205.
- 15 **Mendes F.L.S. 2018.** Apreensão de aves silvestres brasileiras que foram exportadas ilegalmente para Portugal. *Revista Brasileira de Zoociências*. 19(1): 56-66.
- 16 **Mendonça F.S., Cunha A.L.B., Oliveira R.A., Evêncio-Neto J., Simões M.J., Simões R.S & Baratella-Evêncio L. 2006.** Carcinoma hepatocelular em mutum pinima (*Crax fasciolata*). *Biológico*. 68: 177-180.
- 17 **Na B., Huang Z., Wang Q., Qi Z., Tian Y., Lu C.C., Yu J., Hanes M.A., Kakar S., Huang E.H., Ou J.H.J., Liu L. & Yen T.S.B. 2011.** Transgenic expression of entire hepatitis B virus in mice induces hepatocarcinogenesis independent of chronic liver injury. *PLoS ONE*. 6(10): e26240. doi: 10.1371/journal.pone.0026240.
- 18 **Patnaik A.K., A.I. Hurvitz, P.H. Lieberman & G.F. Johnson. 1981.** Canine Hepatocellular Carcinoma. *Veterinary Pathology*. 18(4): 427-438.
- 19 **Potter K., Connor T. & Gallina A.M. 1983.** American Association of Avian Pathologists Allen Press Cholangiocarcinoma in a Yellow-Faced Amazon Parrot (*Amazona xanthops*). *Avian diseases*. 27(2): 556-558.
- 20 **Reavill D.R. 2004.** Tumors of pet birds. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*. 7(3): 537-560.
- 21 **Reavill D.R. & Dorrestein G. 2018.** Psittacines, colliiformes, musophagiformes, cuculiformes, In: Terio K.A., McAlloose D., Leger J.S. (Eds). *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. London: Elsevier, pp.775-798.
- 22 **Szweda M., Stenzel T., Pa dzior K., KoŁodziejska A. & Mecik-Kronenberg T. 2011.** Hepatocellular adenocarcinoma in a Racing pigeon. *Medycyna Weterynaryjna*. 67(6): 422-425.
- 23 **Wadsworth P.F., Majeed S.K., Brancker W.M. & Jones D.M. 1978.** Some hepatic neoplasms in non-domesticated birds. *Avian Pathology*. 7(4): 551-555.
- 24 **Wettere A.J.V., Degernes L.A. & Barnes H.J. 2010.** Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in a lesser flamingo (*Phoenicopterus minor*). *Avian Pathology*. 39(4): 275-278.