

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



HEPATITE CRÓNICA CANINA  
ESTUDO RETROSPETIVO DE 19 CASOS CLÍNICOS (2011-2022)

ANA CAROLINA JARDIM SILVA CARRAMANHO

ORIENTADORA:  
Doutora Maria Manuela Grave  
Rodeia Espada Niza

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



HEPATITE CRÓNICA CANINA  
ESTUDO RETROSPETIVO DE 19 CASOS CLÍNICOS (2011-2022)

ANA CAROLINA JARDIM SILVA CARRAMANHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria Teresa da Costa  
Mendes Vitor Villa de Brito

ORIENTADORA:

Doutora Maria Manuela Grave  
Rodeia Espada Niza

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Grave  
Rodeia Espada Niza  
Doutora Maria Rita Martins Garcia  
da Fonseca Pequito

2023

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

**Nome:** Ana Carolina Jardim Silva Carramanho

**Título da tese ou dissertação:** Hepatite Crónica Canina: estudo retrospectivo de 19 casos clínicos (2011-2022)

**Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas):** 2023

**Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento:** Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica**                       Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função       Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 23 de Março de 2023

Assinatura: Ana Carolina Carramanho (indicar aqui a data da realização das provas públicas)

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, não posso deixar de direcionar um agradecimento especial à Prof<sup>a</sup>. Manuela Rodeia pela sua disponibilidade durante todo este percurso. Tanto para sugestões, conselhos e correções, mas também para ensinamentos pessoais que vou levar comigo para a vida. Por tudo isto, um muito obrigada Professora.

Em segundo lugar, quero agradecer a toda a equipa do HEV por todo o apoio durante o estágio, o tempo despendido para me ensinar e também pela paciência. Em especial ao Dr. Telmo Casimiro que me ajudou na recolha dos casos clínicos que integraram este estudo.

Aos amigos que a FMV me deu e que levo para a vida, foram a minha companhia desde o dia 1 e tornaram esta experiência bem mais suportável. Aos que surgiram durante o estágio, obrigada pelo companheirismo e entreaajuda.

Ao Rodrigo, por invariavelmente estares do meu lado e me trazeres a calma que por vezes me falta.

Às minhas amigas de sempre, por me darem os melhores momentos e me apoiarem em todas as fases.

Aos meus pais por me aturarem há 25 anos e por terem tornado tudo isto possível. Aos pais do Rodrigo por serem também meus. À minha irmã porque me trouxe a melhor prenda do mundo durante este processo, a minha sobrinha, e também por me completar ao ser exatamente o meu oposto.

Ao Balu por me mostrar que os animais são a melhor coisa do mundo e me relembrar o porquê de eu estar aqui.

# HEPATITE CRÓNICA CANINA - ESTUDO RETROSPETIVO DE 19 CASOS CLÍNICOS (2011-2022)

## Resumo

A Hepatite Crónica canina (HCC) é considerada a doença hepática primária mais comum nos cães, com uma prevalência de até 12%, representando um relevante fator de morbidade e mortalidade na prática clínica. Este estudo retrospectivo incluiu cães diagnosticados no Hospital Escolar Veterinário (HEV) entre 2011 e 2022. Foram incluídos todos os canídeos com diagnóstico de HCC confirmado através de biópsia hepática. O objetivo principal foi a caracterização da amostra, dos seus antecedentes clínicos, das alterações clínicas, laboratoriais, imagiológicas e histopatológicas, assim como do desenvolvimento de complicações durante o curso da doença e da gestão terapêutica efetuada. Além disso, teve como objetivo mostrar possíveis tendências raciais e de género em Portugal. O estudo incidiu sobre uma amostra de 19 canídeos com uma idade média de 8,16 anos, onde se observou uma sobrerrepresentação do sexo feminino e dos Labrador retriever. Os sinais clínicos mais relatados incluíram letargia (89,5%) e anorexia (89,5%). No exame físico, icterícia (52,6%) e palpação abdominal dolorosa (52,6%) foram os sinais mais comuns. Nas análises clínicas a ALT (100%) mostrou-se consistentemente elevada, seguida da FAS (94,7%). Os marcadores de função mais frequentemente alterados foram a albumina (57,9%) e a bilirrubina (52,6%). A ecografia foi sugestiva de HCC/cirrose em 47,4% da amostra. Na histopatologia, o infiltrado linfoplasmocitário foi o mais frequente (42,1%) com localização maioritariamente portal/periportal, tal como a fibrose. Oito animais (42,1%) apresentavam cirrose. Durante o curso da doença, surgiram diversas complicações como alterações da coagulação (68,4%), hipertensão portal (31,6%), ascite (31,6%), ulceração gastrointestinal (31,6%) e encefalopatia hepática (26,3%). Quanto à etiologia, a maioria dos casos (89,5%) foi considerado idiopático por falta na deteção da etiologia. Em dois Labrador Retriever foi diagnosticada acumulação primária de cobre.

Este estudo retrospectivo permitiu atualizar a epidemiologia da HCC em Portugal e reforçar o carácter inespecífico dos seus sinais clínicos, bem como a importância da biópsia para o diagnóstico e para uma intervenção terapêutica precoce, a fim de retardar a progressão da doença e evitar as suas complicações. Além disso, permitiu obter uma visão aproximada da realidade portuguesa sobre os meios de diagnóstico e a terapêutica disponíveis.

As grandes limitações do estudo foram o tamanho da amostra e a sua natureza retrospectiva, que levou a uma falta de padronização da abordagem diagnóstica e terapêutica e impossibilitou a análise do prognóstico.

**Palavras-chave:** Hepatite crónica canina; fígado; idiopático.

## **CANINE CHRONIC HEPATITIS – A RETROSPECTIVE STUDY OF 19 CLINICAL CASES (2011-2022)**

### **Abstract**

Canine chronic hepatitis (CCH) is considered the most frequent primary hepatic disease in dogs, with a prevalence of up to 12%, representing a relevant cause of morbidity and mortality in clinical practice. This retrospective study included dogs diagnosed at Hospital Escolar Veterinário (HEV) between 2011 and 2022. It included all dogs diagnosed with CCH confirmed by hepatic biopsy. The main purpose was the characterization of the population, of their clinical records and their clinical, laboratory, imagiologic and histopathological changes related to the disease, as well as the development of complications and the therapeutic management. Also, it had the purpose of showing racial and gender tendencies in Portugal. This study evaluated a sample of 19 dogs with an average age of 8,16 years and showed an overrepresentation of females and Labrador retriever. The most common clinical signs included lethargy (89,5%) and anorexia (89,5%). At the physical exam, the most frequent findings were icterus (52,6%) and abdominal pain (52,6%). The laboratory analysis showed a consistent increase in ALT (100%) and FAS (94,75%). The most altered function tests were albumin (57,9%) and bilirubin (52,6%). The ultrasound suggested the presence of CCH/cirrhosis in 47,4% of the sample. A lymphoplasmacytic infiltrate was the most frequent finding in histopathology, mainly with portal/periportal location, as fibrosis. Eight dogs presented cirrhosis (42,1%). During the disease, the dogs developed several complications such as coagulation disorders (68,4%), portal hypertension (31,6%), ascites (31,6%), gastrointestinal ulceration (31,6%) and hepatic encephalopathy (26,3%). Most of the cases remained idiopathic (89,5%), as it was not possible to find the etiology of the disease. Two Labrador retriever were diagnosed with primary copper accumulation.

This retrospective study allowed the update of the epidemiology of CCH in Portugal and confirmed the unspecific character of clinical signs, as well as the importance of biopsy in the diagnosis and early treatment, delaying the progression of the disease and avoiding the complications. Besides, it allowed the understanding of the portuguese panorama regarding the diagnostic and therapeutic means available.

The big limitations of this study were the little sample size and his retrospective nature, leading to a lack of standardization of the diagnostic and therapeutic approach, making impossible the prognostic evaluation.

**Keywords:** Canine Chronic Hepatitis; liver; idiopathic.

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de gráficos</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>I – Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o período de estágio</b> .....	<b>1</b>
<b>II – Revisão bibliográfica</b> .....	<b>4</b>
1 – Introdução.....	4
2 – Classificação e epidemiologia.....	5
3 – Etiologia .....	6
3.1 Infeciosa.....	7
3.2 Fármacos e toxinas.....	7
3.3 Alterações metabólicas.....	10
3.4 Imunomediada.....	10
4 – Fisiopatologia.....	12
5 – Diagnóstico.....	14
5.1 – História e Apresentação clínica.....	14
5.2 – Análises Laboratoriais .....	15
5.3 – Imagiologia.....	18
5.4 – Citologia e Histopatologia.....	19
6 – Tratamento.....	23
6.1 Tratamento direcionado à etiologia .....	23
6.2 Hepatite crónica associada ao cobre .....	24
6.3 Hepatoprotetores e antioxidantes.....	26
6.4 Hepatite com suspeita imunomediada.....	27
6.5 Maneio dietético.....	28
7 – Prognóstico .....	28
8 - Complicações .....	29
<b>III –Estudo Retrospectivo: Hepatite Crónica Canina</b> .....	<b>33</b>
1 – Introdução.....	33
2 – Material e métodos .....	33
2.1 Seleção de amostra.....	33
2.1.1 Critérios de inclusão .....	33
2.1.2 Critérios de exclusão .....	34
2.2 Métodos.....	34
2.2.1Diagnóstico .....	34
2.2.1.1 Caracterização da amostra, história clínica e apresentação clínica.....	34
2.2.1.2 Análises laboratoriais .....	35
2.2.1.3 Exame ecográfico .....	36
2.2.1.4 Histopatologia do fígado.....	36
2.2.3 Complicações.....	39
2.3 Análise Estatística.....	40

<b>3 – Resultados</b> .....	<b>40</b>
3.1 Caracterização da amostra .....	40
3.2 História e apresentação clínica.....	42
3.3 Análises laboratoriais.....	43
3.4 Exame ecográfico.....	46
3.5 Citologia, Histopatologia e Cultura hepáticas.....	46
3.6 Complicações e comorbilidades identificadas .....	48
3.7 Etiologia .....	49
3.8 Tratamento e evolução clínica .....	49
<b>4 – Discussão</b> .....	<b>51</b>
4.1 Caracterização da amostra .....	51
4.2 História e apresentação clínica.....	52
4.3 Exames complementares de diagnóstico .....	53
4.3.1 Análises laboratoriais .....	53
4.3.2 Exame ecográfico.....	58
4.3.3 Citologia, Histopatologia e Cultura hepáticas .....	59
4.6 Complicações e comorbilidades .....	62
4.7 Etiologia .....	64
4.8 Tratamento e evolução clínica .....	66
<b>5 – Conclusão</b> .....	<b>69</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b> .....	<b>72</b>

## **Lista de Figuras**

Figura 1 - Papel das células estreladas hepáticas no desenvolvimento da FH. Adaptado de: Eulenberg e Lidbury 2018.....	13
---	----

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros avaliados para determinar o risco de complicações hemorrágicas em cães com HCC. Adaptado de: Webster et al. 2019 .....	20
Tabela 2 - Colorações para avaliação das diferentes características histopatológicas do fígado. Adaptada de: Webster et al. 2019 .....	22
Tabela 3 - Escala de Haven West para EH modificada (adaptado Gow 2017). .....	40
Tabela 4 - Tabulação cruzada entre gênero e estado reprodutivo .....	41
Tabela 5 - Frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) da distribuição racial da amostra .....	41
Tabela 6 - Distribuição do número de sinais clínicos sistêmicos na amostra.....	43
Tabela 7 - Estatística descritiva (mínimo, máximo e média $\pm$ desvio padrão) das enzimas hepáticas (ALT, FAS e GGT) e dos marcadores de função hepática (albumina, PTs, glucose, bilirrubina total, ácidos biliares e ureia) da amostra. ....	45
Tabela 8 - Comparação da média e desvio padrão das enzimas hepáticas e marcadores de função de animais cirróticos vs não cirróticos .....	45
Tabela 9 - Principais alterações histopatológicas encontradas nos canídeos com HCC .....	47

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Número de horas realizadas por serviço no HEV .....	1
Gráfico 2 - Distribuição de idades no LR comparativamente a outras raças.....	41
Gráfico 3 - Distribuição de idades nos machos e fêmeas .....	41
Gráfico 4 - Distribuição de idades na amostra .....	41
Gráfico 5 - Frequência relativa da amostra em relação aos sinais clínicos registados na história clínica.....	42
Gráfico 6 - Frequência relativa da amostra em relação aos sinais apresentados no exame físico.....	43
Gráfico 7 - Distribuição das elevações da ALT, GGT e FAS na amostra .....	44
Gráfico 8 - Frequência relativa das complicações associadas à HCC presentes na amostra. ....	48

## Lista de abreviaturas

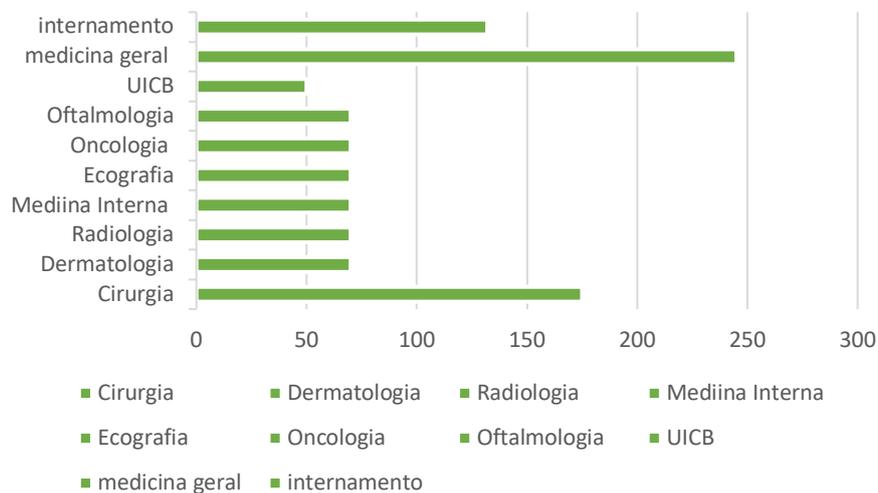
AAT – alfa-1 antitripsina  
ACVIM – American College of Veterinary Internal Medicine  
ALT – alanina aminotransferase  
AP – agregação plaquetária  
APSS – shunt porto-sistémico adquirido  
BT – Bedlington terrier  
CEH – células estreladas hepáticas  
CID – coagulação intravascular disseminada  
COMMD1 - Copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1  
Cu - cobre  
CuHC – hepatite crónica associada ao cobre  
DLA – dog leukocyte antigen  
DP – Doberman pinscher  
DPA – D-penicilamina  
DU – densidade urinária  
EH – encefalopatia hepática  
FAS – fosfatase alcalina sérica  
FH – fibrose hepática  
G – gauge  
GGT – gamma-glutamyl transpeptidase  
GI - gastrointestinal  
HCC – hepatite crónica canina  
HCIM – hepatite crónica imunomediada  
HEV – hospital escolar veterinário  
HLD – hepatite lobular dissecante  
HP – hipertensão portal  
Hct – hematócrito  
H&E - Hematoxilina e Eosina  
LR – Labrador retriever  
ME – matriz extracelular  
MH – Medicina Humana  
MV – Medicina Veterinária  
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas  
PFC – plasma fresco congelado  
ps – peso seco  
PU/PD – poliúria e polidipsia  
SAME – S-Adenosilmetionina  
SRD – sem raça definida  
TGF $\beta$ -1 - fator de crescimento transformador beta  
TIMP-1 e TIMP-2 - Tissue Inhibitor of Matrix Metalliproteinase  
TP – tempo de protrombina  
TTPa – tempo tromboplastina parcial ativada  
VB – vesícula biliar  
VP – veia porta  
WHWT – West Highland White terrier  
WSAVA - World Small Animal Veterinary Association

# I – Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o período de estágio

## 1. Estágio curricular

O estágio curricular no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MV) foi realizado no Hospital Escolar Veterinário (HEV) integrado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, tendo tido a duração de seis meses, entre Setembro de 2021 e Fevereiro de 2022. O estágio foi distribuído por rotações nas seguintes áreas: Cirurgia, Dermatologia, Radiologia, Medicina Geral, Medicina Interna, Ecografia, Oncologia, Unidade de Isolamento e Contenção Biológica, Oftalmologia e Internamento. A distribuição de horas despendidas em cada serviço pode ser consultada no gráfico 1.

**Gráfico 1 - Número de horas realizadas por serviço no HEV**



No serviço de Cirurgia (5 semanas), desempenhei diversas funções, começando pela receção do animal e contacto direto com os detentores para proceder às perguntas da checklist pré-cirúrgica. Ajudei na preparação e administração de pré-medicação, na indução e monitorização anestésica do animal durante a cirurgia e no recobro. Realizei tarefas como colocação de cateteres, tubos endotraqueais, tricotomia e assepsia do animal. Assisti à colocação de sondas de esofagostomia e à realização de bloqueios anestésicos locais. Participei como ajudante do cirurgião em múltiplas cirurgias de tecidos moles, ortopédicas, odontológicas e de referência, tais como: lobectomia secundária a torção de um lobo pulmonar, pericardiectomia, cistotomia, esplenectomia, nodulectomia, ovariohisterectomia, entre outras. Tive a oportunidade de proceder a uma castração de cão e outra de gato. No serviço de Dermatologia (2 semanas), participei nas consultas de referência e de seguimento. Recolhi o historial clínico dos animais, realizei e interpretei citologias cutâneas e auriculares, tricogramas e raspagens cutâneas superficiais. Participei ativamente na escolha dos exames complementares e do tratamento a instaurar para cada caso. Observei ainda a realização de biópsias por punch excisional.

No serviço de Radiologia (2 semanas), assisti a exames radiográficos e tomografias computadorizadas e auxiliei no correto posicionamento do animal para a realização das mesmas. Preparei e monitorizei a anestesia/ sedação necessárias para efetuar estes procedimentos, e procedi também à administração do contraste durante as tomografias. Observei a realização de punções aspirativas guiadas por tomografia computadorizada e participei na elaboração dos relatórios dos exames realizados.

No serviço de Medicina Interna (2 semanas), acompanhei as consultas de especialidade de forma ativa, que incluía sempre organizar uma lista de problemas e possíveis diagnósticos diferenciais por ordem de relevância no contexto de cada paciente, na correta escolha de exames complementares e na elaboração de um relatório para cada caso clínico. Posteriormente, também eram discutidos os resultados das análises e os passos a seguir com cada paciente. Acompanhei casos de endocrinologia, gastroenterologia, entre outros. Assisti a exames de endoscopia, rinoscopia e broncoscopia. Nestas duas semanas, uma vez por semana procedi à apresentação de 1 capítulo do Ettinger no gabinete de Medicina Interna e assisti à apresentação de outros estagiários.

No serviço de Ecografia (2 semanas), assisti a exames ecográficos predominantemente abdominais, mas também reprodutivos e cardíacos. Assisti à realização de punções aspirativas de agulha fina (PAAF) e biópsias ecoguiadas. Tive ainda oportunidade de participar na elaboração de relatórios e interpretação das imagens dos exames ecográficos realizados.

No serviço de Oncologia (2 semanas), participei em consultas da especialidade, muitas vezes de segunda opinião, discutindo com o Médico Veterinário as melhores abordagens de diagnóstico, estadiamento e tratamento de cada paciente. Assisti à realização de PAAF de diversos nódulos/massas e a sessões de quimioterapia. Ajudei na interpretação dos hemogramas realizados antes destas sessões, para ver se o animal poderia ser submetido a quimioterapia. Neste serviço, aprendi a gerir as expectativas e as emoções dos detentores.

No serviço de Oftalmologia (2 semanas), colaborei nas consultas de referência e seguimento. Efetuei exames oftalmológicos e assisti a eletrorretinografias, ecografias oculares e cirurgias oftálmicas como enucleação, correção de entrópion, remoção de nódulos palpebrais e facoemulsificação com implante de lente.

No serviço de Medicina Geral, onde estive 7 semanas, assisti em consulta a diversos casos clínicos, participando na elaboração das fichas dos animais, recolhendo a anamnese, organizando a lista de problemas e de diagnósticos diferenciais por ordem de relevância, meios de diagnóstico complementares necessários e opções terapêuticas adequadas. Realizei exames físicos, protocolos de vacinação e desparasitação, administrei medicações injetáveis e procedi a colheitas de sangue e urina (por algaliação e cistocentese), discutindo sempre com o médico veterinário que análises requisitar consoante cada apresentação

clínica. Assisti ainda a situações de urgência como piómetra, traumatismo por atropelamento, torção gástrica, obstrução uretral, episódios convulsivos e de paragem cardiorrespiratória, onde ajudei na preparação e administração de medicamentos, colocação de cateteres, manobras de reanimação e, quando necessário, no processo de internamento.

No serviço de Internamento (2 turnos diurnos e 9 turnos noturnos, de 12 horas), estive presente na passagem dos casos clínicos dos animais internados e na discussão do curso médico a tomar com cada paciente. Auxiliei na execução dos exames físicos, monitorização de animais em estado crítico, pós-cirúrgicos e pacientes transfundidos, e ainda na preparação de medicações, bem como na sua administração, pelas vias endovenosa, intramuscular, subcutânea, oral e transdérmica. Realizei microhematócritos, pensos simples, medições de glicémia e da pressão arterial e calculei taxas de fluidoterapia, por vezes suplementada. Presenciei ainda um grande número de urgências e alguns procedimentos de eutanásia.

Na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (2 semanas), desempenhei funções semelhantes às realizadas no serviço de internamento pondo em prática as medidas de prevenção de disseminação de doenças infecciosas.

A casuística do HEV é muito variada e, ainda que seja composta maioritariamente por animais de companhia, também recebe animais exóticos, o que me permitiu também ter um contacto próximo com algumas destas espécies.

O facto de ser um hospital escolar de referência permitiu-me aprender e participar em casos complexos e particularmente interessantes, contribuindo imensamente para a minha formação como estagiária. Em suma, o estágio foi essencial para perceber o ritmo e as vantagens de trabalhar num hospital com uma equipa multidisciplinar. Permitiu-me desenvolver competências e autonomia no que diz respeito ao desenvolvimento do raciocínio clínico, procedimentos médicos, mas também em termos de trabalho em equipa e cooperação interpessoal.

## **2. Estágio extracurricular**

Foi realizado um estágio extracurricular ao abrigo do Programa *Erasmus+* entre dia 1 de Março e 31 de Maio de 2022, no Hospital Centro Veterinario Torinese, na cidade de Turim, em Itália. O estágio foi feito na área de animais de companhia e foi composto por rotações quinzenais nos seguintes serviços: Anestesiologia, Imagiologia (Ecografia, Rx e TAC), Medicina Geral, Medicina Interna, Neurologia, Dermatologia e Urgência.

Os turnos ocorreram em dias úteis num dos seguintes horários: 8-16h ou 13-20h. Os turnos noturnos decorreram durante duas semanas, das 20h às 8h durante 3 noites seguidas, folgando no resto da semana. No total foram realizadas cerca de 516 horas de estágio extracurricular.

## II – Revisão bibliográfica

### 1 – Introdução

A hepatite é uma das doenças hepáticas mais frequentes em cães, sendo a espécie canídea a mais afetada, a seguir aos humanos (Boomkens et al. 2004). Dentro dos tipos de hepatite primária, a hepatite crónica canina (HCC) aparenta ser a mais comum, sendo uma causa importante de morbilidade e mortalidade em cães (Twedt 1998; Poldervaart et al. 2009). Apesar de existirem vários estudos que reportam predisposição de raça, idade e género, sabemos que estes fatores variam consoante a localização geográfica e altura em que o estudo foi realizado (Bexfield 2017). Contudo, é transversalmente aceite que ocorre predominantemente em cães de meia-idade e idosos. Entre as raças predispostas, as mais documentadas são os Labrador retrievers (LR), os Cocker spaniels inglês e americano, os Doberman pinschers (DP), os West Highland white terriers (WHWT), os Dálmatas, os Springer spaniels inglês e os Bedlington terriers (BT). Quanto ao género, apesar de grande discrepância entre estudos, há predisposição feminina indubitável nos DP, Dálmatas e Springer spaniels inglês (Webster et al. 2019).

Existe alguma controvérsia entre autores relativamente à comparação da hepatite crónica humana à HCC, uma vez que os conhecimentos atuais sobre a etiologia, fisiopatologia e evolução da doença nos cães são ainda muito limitados (Cullen and Stalker 2016; Webster et al. 2019). Ao contrário do que acontece na Medicina Humana (MH), onde o tipo de hepatite é definido pela sua etiologia, poucas causas de HCC estão comprovadas. Apesar de estarem descritas várias causas infecciosas e não infecciosas, com destaque para a acumulação de cobre, a maioria dos casos é considerada idiopática. De facto, num estudo realizado em cães, 64% dos casos de HCC primária foram classificados como idiopáticos (Poldervaart et al. 2009). Atualmente, pensa-se que grande percentagem destes casos possa ter origem imunomediada, no entanto, é necessária mais investigação neste campo (Ullal et al. 2019).

Uma vez que a sua etiologia é, na maioria dos casos, desconhecida, o diagnóstico e o tratamento são baseados nas características histológicas do fígado, pelo que é necessário a realização de uma biópsia. Segundo os critérios definidos pelo *World Small Animal Veterinary Association's (WSAVA) Liver Standardization Group*, a HCC é caracterizada histologicamente por necrose e/ou apoptose hepatocelular, presença de infiltrado inflamatório mononuclear variável ou misto, bem como processos de regeneração e fibrose. A cirrose é o estágio final, em que ocorre conversão da arquitetura normal do fígado em nódulos estruturalmente anormais, que leva a insuficiência hepática e a um prognóstico reservado. Em animais jovens pode surgir uma variante da cirrose, a Hepatite Lobular Dissecante (HLD), com um curso clínico rápido, cuja causa não está estabelecida (WSAVA 2006).

A HCC é um processo inflamatório progressivo que, na maioria dos casos, constitui um desafio para os clínicos, uma vez que, mesmo após uma avaliação completa, diferentes

tipos de HCC estão associados a sinais clínicos e laboratoriais idênticos, que são vagos e inespecíficos, não sendo possível estabelecer a sua etiologia e, conseqüentemente, uma terapia específica. O manejo da doença normalmente envolve o uso de doses anti-inflamatórias de glucocorticoides e terapia sintomática (antieméticos, diuréticos, antioxidantes, etc.)

A previsão do curso e do prognóstico da doença é fundamental, tanto para o manejo clínico, como para gestão de expectativas dos detentores. O desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico e prognóstico, com significância documentada, é um foco atual de investigação. Dos fatores de mau prognóstico, a presença de hipertensão portal (HP), hiperbilirrubinemia, ascite e hipoalbuminemia são os mais significativos (Kilpatrick 2016).

## **2 – Classificação e epidemiologia**

No Reino Unido (RU), a HCC é uma doença comum, com uma prevalência avaliada aleatoriamente *post-mortem* de até 12% (Bexfield 2017; Watson 2017).

Clinicamente, é definida por um aumento persistente da ALT na presença de um conjunto de alterações histológicas pré-definidas. As características-chave a nível histológico incluem a presença de inflamação linfocítica, plasmocítica ou granulomatosa (portal, multifocal, zonal ou panlobular), ou combinação destas, associada a fibrose de grau variável e a regeneração. A inflamação normalmente inicia-se, ou é mais exuberante, nas regiões portais, alastrando-se frequentemente para o interior do lóbulo hepático (hepatite de interface) (Webster et al. 2019). A cirrose reflete o estágio final da HCC, e é definida como um processo difuso, caracterizado por fibrose hepática (FH) e conversão da arquitetura normal do fígado em nódulos estruturalmente anormais (WSAVA 2006). Na cirrose, podem distinguir-se duas categorias morfológicas: micronodular, com nódulos de dimensão inferior <3mm, todos do mesmo tamanho, e macronodular, com nódulos de dimensão >3mm, com tamanhos diferentes (Webster et al. 2019). Para além dos nódulos regenerativos, também se observa proliferação ductal na periferia dos lóbulos e nos septos fibrosos. Estas lesões podem desencadear HP, com possível formação de múltiplas anastomoses porto-sistémicas colaterais, o que, por sua vez, pode levar a um quadro de insuficiência hepática, sendo o prognóstico muito reservado nesta fase da doença (Bexfield 2017). A HLD é uma forma de cirrose observada em cães jovens ou jovens adultos, com um curso clínico rápido e prognóstico reservado, sendo o tempo médio de sobrevivência entre 1 e 2 meses (Webster et al. 2019). Apesar de suspeita de etiologia infecciosa devido ao seu aparecimento em cães jovens da mesma ninhada, a causa permanece idiopática (Ingh and Rothuizen 1994; Watson 2004). Microscopicamente é caracterizada pela presença de bandas de fibroblastos e finos filamentos de matriz extracelular (ME) entre hepatócitos individuais ou pequenos grupos de hepatócitos, o que causa uma disseção do padrão lobular original, com subsequente HP. A

inflamação e a apoptose e/ou necrose hepatocelular variam entre ligeiras e moderadas. A proliferação ductal marcada está também presente (Boomkens 2004; WSAVA 2006).

Uma vez que o fígado recebe todo o fluxo venoso esplâncnico, está exposto a citocinas inflamatórias e endotoxinas circulantes provenientes dos órgãos abdominais, o que pode levar a lesões hepáticas com infiltrados inflamatórios modestos nas regiões portal, lobular ou centrilobular, sem morte celular evidente, designadas por hepatite reativa. Esta é inespecífica, secundária a doença sistémica, e incompatível com a definição aceite de HCC, pelo que se deve ter em atenção a distinção entre estas duas entidades clínicas (Webster et al. 2019).

A HCC é reconhecida numa grande variedade de raças, mas também em cães de raça indeterminada. Existe evidência de maior prevalência nos BT (Dirksen and Fieten 2017; Rodrigues et al. 2020), DP (Mandigers et al. 2004; Bexfield 2012), LR (Favier et al. 2013; Hille Fieten et al. 2013; Dirksen and Fieten 2017), Dálmatas (Bexfield 2012), Cocker spaniels inglês e americano (Bexfield 2012; Favier et al. 2013; Gómez Selgas et al. 2014;), Springer spaniels inglês (Bexfield 2012; Gómez Selgas et al. 2014) e WHWT (Webster et al. 2019), segundo estudos realizados em vários países. Para além destes, na Suíça, os Scottish terriers e, no RU, os Cairn terriers, Dogues alemães, Samoiedos, Yorkshire terriers e Jack Russell terriers estão também predispostos (Andersson and Sevelius 1991; Bexfield 2012). Os Springer spaniels ingleses foram identificados no RU e na Noruega associados a HCC, sendo mais comum em linhagens de exibição (Watson 2017).

A idade média relatada para o início dos sinais clínicos foi 7.2 anos, segundo uma meta-análise de dados provenientes de 11 estudos que avaliaram um total de 938 cães (Webster et al. 2019). O intervalo entre o início da doença e o aparecimento da sintomatologia não é conhecido. No entanto, segundo Webster et al. (2019), os Dálmatas, DP e Springer spaniels ingleses apresentam-se na consulta com idades significativamente mais jovens do que os LR, Cocker spaniels ingleses e os Cairn terriers. Os Cocker spaniels americanos são significativamente mais novos que os Cocker spaniels ingleses na altura do início da doença (Bexfield 2012). As idades de apresentação da Hepatite Crónica associada ao Cobre (CuHC) e da HCC idiopática não aparentam ser diferentes. Já os cães com HLD são mais jovens que os restantes, sendo a idade média de desenvolvimento da doença 2 anos (Eulenberg and Lidbury 2018). Existe predisposição feminina nos DP, Dálmatas, Springer spaniels ingleses e, na maioria dos estudos, dos LR (Bexfield 2012; Hirose et al. 2014); já nos Cocker spaniels americanos observa-se predisposição masculina (Webster et al. 2019).

### **3 – Etiologia**

Apesar de existir evidência de causas infecciosas, metabólicas, tóxicas e imunitárias, a maioria dos casos de HCC continua a ser considerada idiopática (Webster et al. 2019). De modo a determinar a etiologia subjacente à doença é necessária mais investigação, limitada até à data, contrariamente ao que aconteceu na vertente humana nas últimas décadas.

### 3.1 Infeciosa

Uma vez que, para alguns autores, a HCC se assemelha à hepatite humana e à de outras espécies, têm sido sugeridos possíveis agentes etiológicos, ao longo dos anos, nomeadamente vírus e bactérias responsáveis pela hepatite crónica noutras espécies (Boomkens et al. 2004). No entanto, ao contrário do que aconteceu no Homem, a procura de causas infecciosas nos cães foi infrutífera (Watson 2004). Até à data, não há evidência de etiologia viral, sendo considerada uma causa negligenciável (Webster et al. 2019).

Quanto a etiologia parasitária, sabe-se que a leishmaniose está associada a HCC, provocando um padrão de inflamação granulomatosa. Relativamente a etiologia bacteriana, a leptospirose é uma causa de hepatite aguda, no entanto, há evidência de que pode originar uma resposta piogranulomatosa crónica (McCallum et al. 2019), sendo possivelmente uma causa subestimada de HCC, que pode ocorrer mesmo em animais imunizados, quando infetados por serovares não incluídos na vacina (Boomkens et al. 2004). Nestes casos, trata-se de uma leptospirose atípica, sem azotémia, sendo o aspeto histológico sugestivo de doença imunomediada, com um abundante infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário (Mandigers et al. 2004). Para além destas, também *Bacillus piliformis*, *Helicobacter canis* e *Bartonella spp.* já foram identificados em cães com HCC, assim como *Ehrlichia canis*, no entanto, as provas de que são agentes etiológicos não são convincentes (Webster et al. 2019). Várias doenças sistémicas podem ter repercussões a nível hepático, tendo potencial para causar HCC, como *Neospora*, toxoplasmose, *Sarcocystis*, histoplasmose, *Mycobacterium*, shistosomose e síndrome da *larva migrans visceral*, no entanto, as lesões são tipicamente agudas e necrosantes (Webster et al. 2019).

### 3.2 Fármacos e toxinas

A maioria dos fármacos e toxinas com capacidade hepatotóxica provocam lesões agudas, no entanto, em alguns casos, a HCC pode surgir como sequela. Há uma forte evidência de que tratamentos com fenobarbital, primidona, fenitoína e lomustina podem levar a HCC (Gaskill et al. 2005; Heading et al. 2011). Outras substâncias, como carprofeno, oxibendazole, amiodarona, aflatoxina e cicasina, podem levar a HCC, no entanto, estão mais associadas a lesão hepática aguda (Webster et al. 2019). No Homem, estima-se que plantas e suplementos dietéticos sejam responsáveis por até 18% das lesões hepáticas induzidas por fármacos e/ou toxinas (Seeff et al. 2015). Em cães, as referências de lesões hepáticas causadas por plantas e suplementos dietéticos são pouco credíveis, no entanto, deve-se obter a história completa de tratamentos, quer sejam com fármacos, suplementos ou outras terapias não tradicionais (Webster et al. 2019). Além disto, os cães, por vezes, ingerem comida do lixo e do chão, que pode estar contaminada, o que possibilita que alguns casos de HCC seja devido a toxinas não identificadas (Boomkens et al. 2004).

#### 3.2.1 Cobre

A lesão tóxica mais comum que leva a HCC é a acumulação de cobre, responsável por cerca de 35% dos casos (Poldervaart et al. 2009; Favier et al. 2013). A CuHC pode desenvolver-se em qualquer raça, incluindo a indeterminada, no entanto, os BT, Dálmatas, LR, DP, Skye terriers e WHWT têm maior predisposição (Webster et al. 2019). Mais recentemente, foi documentada uma predisposição de outros terriers (American Staffordshire terrier e Jack Russel terrier) e cães pastores (Pastor alemão e Pastor de Beauce), em Paris (Rodrigues et al. 2020). Este estudo reforçou a ideia de que a tendência racial difere consoante a localização geográfica, mostrando predisposição de novas raças face a outros estudos realizados no RU, Holanda ou Estados Unidos (Boomkens et al. 2004; Bexfield 2012; Lidbury 2015; Bexfield 2017; Webster et al. 2019).

Quanto à predisposição de idade e género, as fêmeas LR e DP parecem estar predispostas, enquanto noutras raças os géneros estão representados de forma equitativa. Os jovens adultos LR são o grupo mais afetado, com o início da CuHC primária, em média, aos 6 anos (Rodrigues et al. 2020). As cadelas no período pós-parto podem ter risco acrescido para desenvolvimento dos sinais clínicos (Dirksen and Fieten 2017).

O fígado tem um papel essencial para a homeostase do cobre, sendo a excreção biliar a principal via reguladora dos níveis deste metal no organismo. Quando a quantidade de cobre excede a capacidade de transporte e de ligação dos hepatócitos, o Cu livre provoca stress oxidativo, ao produzir radicais livres, levando a degeneração e morte hepatocelular, com inflamação aguda, crónica ou ambas (Webster et al. 2019). A acumulação hepática de cobre resulta da alteração da sua excreção biliar, de um excesso na dieta ou ambos, podendo ser uma causa ou um efeito da HCC. Tanto a CuHC primária como a secundária, levam a elevados níveis de cobre intra-hepático, no entanto, estes níveis parecem ser mais altos na primeira (Rodrigues et al. 2020).

A alteração da excreção de Cu primária está associada a uma mutação genética das proteínas envolvidas no transporte hepático deste metal. Nos BT, a raça mais estudada, foi identificada uma alteração hereditária autossómica recessiva no gene *COMMD1* (*Copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1*), que leva à acumulação centrilobular deste metal e, conseqüentemente, a HCC, ou mesmo cirrose, devido à constante lesão oxidativa. Ainda não se conhece a função exata da proteína *COMMD1*, mas sabe-se que está envolvida no processo de secreção de cobre do hepatócito para as vias biliares (Kilpatrick 2017). As concentrações de cobre nesta raça podem atingir até 10 000 µg/g peso seco (ps), sendo as concentrações normais entre 120 e 400 µg/g ps. O rastreio genético da deleção do *COMMD1* e a reprodução seletiva quase eliminou a doença nos BT, no entanto, uma vez que a excreção de cobre é um processo complexo, no qual é provável que estejam envolvidos múltiplos genes, é possível que outros defeitos genéticos possam levar a acumulação de Cu nesta raça.

Recentemente, o gene ABCA12 foi implicado no desenvolvimento de CuHC, independente da deleção da proteína COMMD1, no RU (Watson 2017; Webster et al. 2019).

Estudos realizados na Alemanha mostraram que uma proporção de DP com HCC apresentavam uma forma de CuHC. Nestes, o Cu parece acumular-se na zona centrilobular na maioria dos casos, sugerindo ser uma entidade primária. Este estudo de Mandigers et al. (2004) demonstrou uma redução da expressão dos genes associados ao efluxo do cobre e uma redução da glutathione (proteína importante para a absorção do cobre com poder antioxidante) nos animais afetados. No entanto, apenas uma parte dos DP com HCC têm como causa primária a acumulação deste metal, sendo sempre necessário fazer a sua quantificação antes de iniciar o tratamento quelante (Watson 2017).

Também nos LR, estudos realizados na Holanda e nos EUA sugeriram a acumulação de cobre como uma das causas predominantes de HCC (Hoffmann et al. 2008; Smedley et al. 2009; Fieten et al. 2015), com características de doença primária, no entanto, até recentemente, esta não era uma causa reconhecida nesta raça no RU (Bexfield 2012). Isto demonstra uma variação consoante o tempo e a localização, como já foi falado anteriormente, e enaltece as diferenças genéticas das raças entre países (Watson 2017). A lesão hepática provocada pelo Cu nos LR pode ser influenciada por mutações no gene ATP7B (o mesmo gene envolvido na doença de Wilson no Homem), que predispõem para acumulação de Cu, e mutações no gene ATP7A (gene envolvido na doença de Menkes), transportador de cobre intestinal, que protege contra a sua acumulação hepática. Apesar de estarem disponíveis testes genéticos para identificar estas mutações, a sua utilidade no diagnóstico e o valor preditivo são desconhecidos até ao momento (Watson 2017).

Nos EUA e Canadá, a CuHC também foi relatada numa série de Dálmatas jovens adultos (média de 6 anos) (Webb et al. 2002). Na histopatologia, as características eram típicas de acumulação de cobre primária, com distribuição centrilobular, em elevadas concentrações. Contudo, até hoje, não há estudos publicados sobre acumulação de Cu em Dálmatas no RU (Watson 2017). De igual forma, os WHWT não foram identificados como tendo predisposição para CuHC num estudo epidemiológico realizado no RU (Bexfield 2012); no entanto, noutros estudos esta foi sinalizada como raça predisposta, em que metade dos cães teriam como etiologia da HCC a acumulação de cobre e a outra metade HCC idiopática (Andersson and Sevelius 1991; Dirksen and Fieten 2017).

Por outro lado, a colestase crónica, que pode ser uma consequência da HCC, pode causar acumulação hepática de Cu por diminuição da sua excreção biliar, sendo considerada uma causa de CuHC secundária. No entanto, os cães, ao contrário do Homem e dos gatos, são mais resistentes à acumulação de cobre secundária a colestase, exceto quando são expostos a uma elevada quantidade na dieta (Webster et al. 2019). No final dos anos 90, verificou-se um aumento da frequência de casos de HCC, o que coincidiu com uma alteração

dos suplementos das rações, em que substituíram o óxido de cobre (biodisponibilidade ~5%) por cobre quelado (biodisponibilidade ~60-100%), levando a um aumento significativo da quantidade absorvida deste metal (Webster et al. 2019). Para além disto, as *guidelines* dietéticas da Association of American Feed Control Officials (AAFCO) e do National Research Council (NRC) apresentam algumas falhas, entre as quais, não terem em conta a biodisponibilidade da fonte de cobre ao estabelecerem o limite mínimo recomendado, bem como a quantidade de Cu presente na dieta base. Além disto, as diretrizes não estabelecem um limite máximo, levando a que muitas rações tenham quantidades 2 a 4 vezes superiores à recomendação mínima (~15-25mg/kg MS/dia). Já as dietas hepáticas, mais especificamente Royal Canin Hepatic, Hills L/d e Purina HP, contêm concentrações abaixo das recomendadas pela AAFCO e pelo NRC, de aproximadamente 5 mg/kg MS/dia, que é a concentração que mantém os BT com um balanço neutro de Cu (Webster et al. 2019).

Apesar de predominarem dados sobre a CuHC primária, o crescente aparecimento de casos de excesso de Cu noutras raças que aparentam não ter uma base genética (Pastores alemães, Cocker spaniels, raça indeterminada), como um epifenómeno da HCC, leva a pensar que a exposição ambiental a outros fatores possa ter um papel no desenvolvimento de CuHC. Atualmente, suspeita-se de uma doença multifatorial (Rodrigues et al. 2020).

Determinar se o cobre é a causa primária da inflamação hepática pode requerer tratamento com quelantes e monitorização dos indicadores de lesão hepática para avaliar a recuperação dos hepatócitos e/ou repetição da sua quantificação. A ausência de recuperação após tratamento adequado com quelantes indica outro mecanismo patogénico primário para a hepatite. Especula-se ainda que a lesão provocada por este metal possa incitar uma resposta imune secundária auto-perpetuante (Webster et al. 2019).

### **3.3 Alterações metabólicas**

A deficiência em alfa-1 antitripsina (AAT), provocada pelo processamento hepático anormal desta enzima, resulta na retenção hepatocitária de proteínas defeituosas, levando a HCC. A acumulação hepática de AAT anómala foi reportada em Cocker spaniels ingleses e americanos, na ausência de deficiência em AAT circulante, ao contrário do que acontece no Homem (Sevelius and Andersson 1994). Para saber se a acumulação desta proteína causa HCC ou apenas reflete lesão hepática é necessária mais investigação (Webster et al. 2019). Uma rara alteração metabólica do metabolismo da porfirina, a protoporfiria eritropoiética, resulta na acumulação anormal de porfirinas entre os hepatócitos e foi descrita como causa de HCC numa colónia de Pastores alemães (Kroeze et al. 2006).

### **3.4 Imunomediada**

No Homem, o diagnóstico de hepatite crónica imunomediada (HCIM) baseia-se em algoritmos complexos que utilizam marcadores serológicos (enzimologia, IgG e autoanticorpos) e histologia hepática típica de hepatite crónica na ausência de marcadores

virais, história de excessivo consumo de álcool ou ingestão de fármacos e/ou suplementos, concomitantemente a uma resposta ao tratamento com imunossuppressores. Suspeita-se que a HCIM nos homens ocorre em indivíduos geneticamente predispostos, quando expostos a certos estímulos como agentes patogénicos, fármacos, vacinas, toxinas ou a alteração no microbioma intestinal, que levem a uma resposta imunitária mediada que tem como alvo epítomos específicos do fígado. O agente que despoletou a doença pode não ser evidente na altura do diagnóstico. Nos cães, ainda não se desenvolveram os requisitos específicos para o diagnóstico de HCIM. No entanto, uma série de critérios sugerem uma base imunomediada: presença de infiltrado linfocitário; expressão anormal de proteínas classe II do complexo principal de histocompatibilidade; autoanticorpos séricos positivos; história familiar de doença hepática; associação com outras doenças imunomediadas; predisposição feminina e resposta favorável à imunossupressão (Ullal et al. 2019; Webster et al. 2019). O diagnóstico clínico presuntivo de HCIM no cão requer exclusão de outras etiologias e resposta favorável aos imunossuppressores. Atualmente, a falta de testes comerciais disponíveis para detetar interações anticorpo-antígeno específicas do fígado ou imunossensibilização celular em cães, limita a determinação definitiva de uma etiologia imunomediada (Webster et al. 2019).

Nos DP, como já foi mencionado anteriormente, a acumulação de Cu é tida como uma causa importante de HCC. Contudo, num estudo escandinavo, foi sugerida uma etiologia autoimune com uma forte associação aos haplótipos do DLA (Dog Leukocyte Antigen) classe II (Dyggve et al. 2011) e a uma expressão aumentada do mesmo nos hepatócitos dos cães afetados (Speeti et al. 2003). Para além disto, foi relatada predisposição feminina nesta raça (Mandigers et al. 2004; Dyggve et al. 2011). Apesar de não existir evidência direta da resposta dos DP à corticoterapia, os estudos que demonstraram a eficácia dos esteróides na HCC, incluíram um elevado número de cães desta raça (Strombeck et al. 1988). Por outro lado, o tratamento com D-penicilamina (DPA) resultou na diminuição da concentração hepática de Cu e a aparência histopatológica melhorou/voltou ao normal no estudo de Mandigers et al. 2004. Uma vez que este fármaco tem ambas ações quelante de cobre e anti-inflamatória, não foi possível tirar conclusões sobre a etiopatogenia da doença.

Também, nos Springer spaniels ingleses, foi reportada uma marcada predisposição feminina e uma associação com DLA classe II, sugerindo que a doença pode ter uma base autoimune (Watson 2017). Noutro estudo, o infiltrado inflamatório era predominantemente linfocitário, corroborando esta hipótese (Bexfield et al. 2011). Adicionalmente, estes responderam esporadicamente a corticoterapia, no entanto, é necessária mais investigação para provar a hipótese de etiologia imunomediada nesta raça.

Por fim, no RU, foi descrita em Cocker spaniels ingleses uma entidade semelhante à doença relacionada à IgG4 nos humanos, autoimune, que afeta múltiplos órgãos, sendo que estes cães tinham pancreatite crónica concomitante (Watson 2017; Coddou 2020).

## 4 – Fisiopatologia

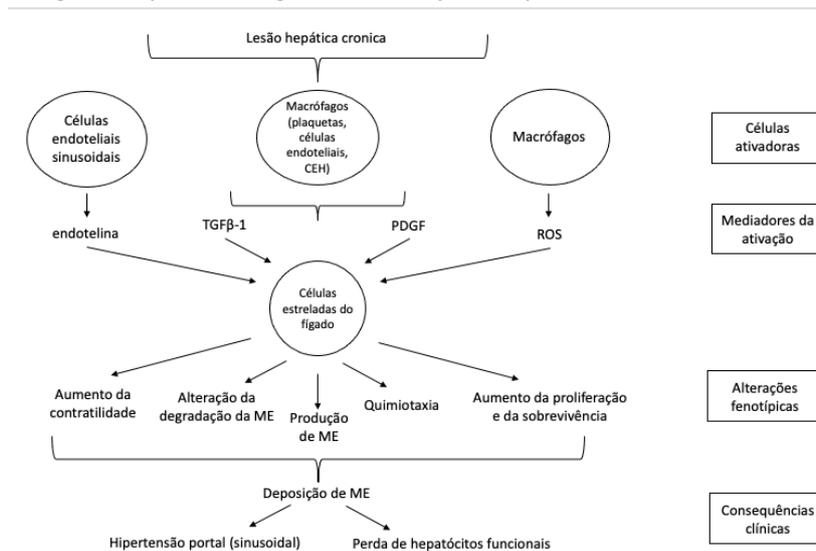
Por ter um papel central na destoxificação de compostos endógenos e exógenos, recebendo o sangue portal, o fígado tem um número limitado de mecanismos para responder fisiopatológica e histologicamente aos vários agentes etiológicos. Quando há destruição do parênquima hepático, as consequências podem ser fibrose, regeneração ou proliferação ductal. Uma lesão aguda poderá ser completamente reversível se a placa limitante não for danificada e a agressão não for continuada. O fígado tem uma capacidade regenerativa tremenda, cujo potencial deve ser maximizado durante o tratamento (Watson 2004).

Inicialmente, a necro-inflamação provocada pelo agente agressor destrói a placa limitante dos hepatócitos periportais (hepatite de interface), avançando para o parênquima hepático, expandindo-se para as áreas portais. Com a progressão da lesão, pode desenvolver-se necrose em 'ponte', com raios de parênquima necrótico a dissecar o lóbulo hepático entre as tríades portais ou entre as áreas porta e as veias centrais (Cullen and Stalker 2016). É de notar que a inflamação e a necrose estão relacionadas, visto que a própria necrose desencadeia resposta inflamatória. A atividade necro-inflamatória aumenta progressivamente, abrandando à medida que a HCC vai progredindo para cirrose, caso a agressão continue presente. Para que a hepatite aguda se torne crónica, o fator etiológico, ou as alterações por ele produzidas têm de ser prolongadas. A alteração-chave que leva ao desenvolvimento de HCC é o aparecimento de FH, que representa uma via de resposta comum a uma variedade de agressões, tanto nos animais como no Homem (Watson 2004). Atualmente, sabe-se que a FH tem implicações no prognóstico da HCC, podendo contribuir para o desenvolvimento de HP, ao alterar o fluxo sanguíneo e o tónus sinusoidal (Watson 2004), e de shunts porto-sistémicos adquiridos (APSS), levando ainda a uma diminuição da função hepática, uma vez que os hepatócitos são substituídos por colagénio.

A FH é uma resposta de cicatrização num cenário de lesão e inflamação crónicas, onde existe um desequilíbrio entre a deposição e a remoção de ME, levando à acumulação progressiva dos seus componentes no fígado. Num cenário de inflamação persistente, o perfil de colagénio do fígado altera-se, havendo um aumento relativo do colagénio I e III, acompanhado por modificações e ligações complexas dos componentes da ME, o que a torna mais resistente à degradação. Num fígado fibrótico, o conteúdo de colagénio total é 3 a 10 vezes superior ao normal (Eulenberg and Lidbury 2018).

As células estreladas hepáticas (CEH), também conhecidas como células de Ito ou lipócitos, são essenciais para o desenvolvimento de fibrose nos humanos e nos ratos, e há evidência de que também estão envolvidas na patogénese da FH em cães. Estas células encontram-se no espaço de Disse, entre as células endoteliais sinusoidais e os hepatócitos. Nas lesões hepáticas crónicas nos humanos, estas são ativadas, diferenciando-se em miofibroblastos e secretando matriz de alta densidade e colagénio para o espaço de Disse.

Esta ativação é estimulada indiretamente pela libertação de citocinas a partir das células inflamatórias, apesar de existirem substâncias capazes de atuar nelas diretamente, como demonstrado na Figura 1 (Eulenberg and Lidbury 2018).



**Figura 1 - Papel das células esteladas hepáticas no desenvolvimento da FH. Adaptado de: Eulenberg e Lidbury 2018**

Na primeira fase da ativação, as CEH tornam-se responsivas ao estímulo das citocinas ao serem expostas a fibronectina ou corpos apoptóticos derivados de hepatócitos degenerados. Na fase seguinte, citocinas e fatores de crescimento produzidos por células vizinhas, como macrófagos residentes do fígado (células de Kupffer), hepatócitos, células endoteliais, linfócitos e plaquetas, ligam-se a receptores específicos na membrana das CEH, o que leva a uma alteração no seu fenótipo, tornando-as fibrogénicas, aumentando a sua capacidade proliferativa, quimiotáxica, contrátil e produtora de ME. O PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) é o fator de proliferação mais potente, responsável pela quimiotaxia das CEH para o local da lesão, e o aumento da expressão do seu mRNA já foi demonstrado em cães com HCC (Eulenberg and Lidbury 2018). O TGFβ-1 (fator de crescimento transformador beta) é considerado o principal catalisador da FH, ao aumentar a capacidade das CEH de produzir ME e inibir a sua remoção. As suas concentrações séricas estão aumentadas em cães com FH moderada a grave. Num estudo recente, em 20 cães com HCC, a concentração plasmática de endotelina-1 estava aumentada, e uma fraca correlação entre a sua concentração plasmática e a pressão na polpa esplénica foi demonstrada, sugerindo um possível papel no desenvolvimento de HP (Sakamoto et al. 2017). Por outro lado, a contratilidade aumentada das CEH deve-se à expressão da proteína do citoesqueleto e da  $\alpha$ -actina do músculo liso, sendo que a sua densidade se correlacionou positivamente com o estadio da fibrose (Boisclair et al. 2001). Em 2001, Boisclair et al., ao analisarem 16 espécimes de fígado de cães com HCC e comparando-os com cães controlo, identificaram um aumento da expressão celular de  $\alpha$ -actina do músculo liso nas margens do espaço

perisinusoidal e à volta da zona porta e dos septos fibrosos dos cães com HCC. A sua natureza contrátil contribui para a patogénese da HP ao alterar o tónus sinusoidal e o fluxo sanguíneo. A última fase da FH é a manutenção da ativação das CEH, envolvendo mecanismos parácrinos e autócrinos.

Assim como o aumento da produção de tecido conjuntivo pelas CEH ativadas, também uma falha na degradação do excesso de ME leva à progressão da FH. Nesta fase, a atividade das metaloproteinases-1 da matriz, responsáveis pela degradação do colagénio tipo I, está diminuída devido ao aumento da expressão dos TIMP-1 e TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalliproteinase) (Lidbury 2015).

Para além disto, na presença de colestase, que muitas vezes acompanha a HCC, a lesão celular provocada pelos ácidos biliares também contribui para as alterações oxidativas e para a libertação de citocinas. O principal mecanismo para a resolução da fibrose parece ser a apoptose ou senescência das CEH, que remove a fonte de TIMP-1, resultando no aumento da atividade das metaloproteinases e, conseqüentemente, na degradação da ME. No entanto, isto é apenas possível em estádios prévios à cirrose.

É muito importante perceber que lesões provocadas ao fígado com diferentes origens podem produzir sinais histológicos semelhantes, ou seja, causas infecciosas crónicas, tóxicos e processos autoimunes podem ter uma aparência histológica idêntica. Esta similaridade aumenta o desafio dos clínicos para decidir o tratamento adequado, uma vez que na maioria dos casos a causa permanece desconhecida.

## **5 – Diagnóstico**

O WSAVA's *Liver Standardization Group* criou uma série de critérios para o diagnóstico histológico das doenças hepáticas caninas, incluindo a HCC, permitindo uma cooperação interdisciplinar entre clínicos e patologistas e facilitando a pesquisa de possíveis etiologias e tratamentos, ao uniformizar o diagnóstico. Anteriormente, a utilização de diferentes critérios e nomenclaturas levava a estudos duplicados e a falhas na investigação da doença.

### **5.1 – História e Apresentação clínica**

O fígado tem uma enorme reserva funcional e estrutural, por isso, mesmo uma perda significativa de massa hepática pode ocorrer sem ou com mínimos sinais clínicos. Trata-se de um órgão com uma extraordinária capacidade de regeneração, sendo que a insuficiência hepática apenas se desenvolve quando 70-80% da capacidade funcional é perdida. Devido a este facto, no início da doença, os sinais clínicos apresentam-se muito discretos ou, por vezes, inexistentes, sendo os mais precoces a nível GI. A HCC aparenta ter uma longa fase subclínica, sendo que até 20% dos cães com HCC têm as enzimas hepáticas séricas aumentadas na ausência de doença clínica (Poldervaart et al. 2009; Bexfield 2017). Por esta razão, muitas vezes, tem um início insidioso, com uma progressão rápida a partir do

aparecimento dos primeiros sinais clínicos, sendo diagnosticada em estádios avançados, o que faz com que as hipóteses de uma intervenção bem-sucedida sejam menos prováveis.

Os sinais clínicos da HCC são tipicamente inespecíficos, sendo os mais frequentes perda de apetite (61%) e letargia (56%). Sinais mais específicos aparecem num estado mais avançado da doença, como icterícia e ascite, em cerca de 33% dos cães (Webster et al. 2019). Complicações como encefalopatia hepática (EH) e hemorragias (sob a forma de melena, hemorragia gengival, hematoquécia ou hemoperitoneu, por ordem decrescente de prevalência), têm tendência para se manifestar em cerca de 6%-7% dos cães (Webster et al. 2019), tipicamente em estádios terminais. Encontram-se ainda descritos poliúria/polidipsia (PU/PD) (30%), vômito (24%), diarreia (20%) e dor abdominal (3,1%) (Webster et al. 2019). Uma elevada incidência de ascite, icterícia e dor abdominal ocorre nos Springer spaniels ingleses (Bexfield et al. 2011). Os Cocker spaniels americanos apresentam uma elevada incidência de ascite e APSS, na ausência de hiperbilirrubinémia (Kanemoto et al. 2013). Cerca de 80% dos cães com HLD apresentam ascite, sendo também frequente perda de peso, anorexia e icterícia (Ingh and Rothuizen 1994). Nos casos de HCC granulomatosa é mais comum a presença de febre e dor abdominal. A CuHC tem, muitas vezes, uma progressão silenciosa (Dirksen and Fieten 2017).

## **5.2 – Análises Laboratoriais**

Dados de 27 estudos retrospectivos demonstraram que a alanina aminotransferase (ALT) é a enzima que aumenta mais precocemente na HCC (Webster et al. 2019), sendo esta considerada o *gold standard* para a deteção de lesão hepatocelular inespecífica (Lawrence 2019). Assim, a elevação persistente (>2 meses) da ALT sérica, sem explicação aparente, com ou sem outras alterações laboratoriais, requer investigação adicional. Por outro lado, sabe-se que é possível existirem sinais histopatológicos de HCC na ausência de aumento da atividade desta enzima (Webster et al. 2019). A sua sensibilidade para detetar doença hepática em animais sintomáticos varia entre 60-76%, estando pouco estudada para os assintomáticos (Lawrence 2019). Um estudo de Dirksen et al. (2016) relatou sensibilidades de 71%, 35% e 13% para a ALT, fosfatase alcalina sérica (FAS) e ácidos biliares, respetivamente, na identificação de HCC subclínica. No entanto, no caso dos BT, está descrito que a acumulação de Cu se inicia entre os 6 e os 12 meses de idade, sem início de sintomatologia clínica. Nestes casos, a lesão hepatocelular é visível entre os 12 e os 18 meses de idade, enquanto o aumento da ALT e da FAS apenas se deteta aos 24 e 18 meses, respetivamente, o que indica que estas enzimas não são úteis para o despiste de CuHC subclínica (Dirksen et al. 2016). Normalmente, o aumento da FAS ocorre mais tarde comparativamente à ALT. Se ambas ALT e FAS estão aumentadas, a magnitude do aumento da primeira é superior ao da segunda, geralmente, e o aumento persistente de ambas deverá

levar a investigação adicional, mesmo na ausência de sinais clínicos (Webster et al. 2019). À medida que a doença vai progredindo e o parênquima hepático funcional vai sendo destruído e substituído por tecido fibrótico, a atividade da FAS e da gamma-glutamil transpeptidase (GGT) aumenta comparativamente à ALT (Webster et al. 2019).

No decurso da HCC, pode ocorrer uma variação considerável dos valores da ALT sérica, o que sugere que a extensão da necro-inflamação flutua ao longo do tempo. Nos casos de cirrose, as transaminases podem apresentar-se com valores normais, ou até baixos, devido à perda de parênquima funcional (Webster et al. 2019). Apesar dos valores da ALT não terem valor prognóstico, têm algum grau de correlação com a gravidade da lesão histológica (Webster et al. 2019). A atividade da aspartato aminotransferase (AST) e da GGT tende a mimetizar a atividade da ALT e da FAS, respetivamente, embora sejam menos sensíveis. Ultimamente, surgiu evidência que sugere que a concentração sérica de alguns microRNAs, particularmente o miR-122, aumenta na presença de lesão hepática mínima, no cão, antes do aumento da atividade sérica da ALT, sendo uma forma mais sensível, específica e precoce de detetar lesão hepatocelular (Dirksen et al. 2016; Oosthuyzen et al. 2018).

Para além da medição das transaminases, também os testes de função ajudam no diagnóstico da HCC. A hiperbilirrubinémia está descrita em aproximadamente 50% dos cães e é um indicador de mau prognóstico (Gómez Selgas et al. 2014). Num estudo realizado em Springer spaniels ingleses, 69% dos casos apresentaram hiperbilirrubinémia, uma percentagem superior a outras raças, tendo a icterícia sido um achado comum no exame físico (Bexfield 2012). Pelo facto de o fígado ter uma grande reserva funcional, a hipoalbuminémia é considerada um marcador tardio de insuficiência hepática. Por outro lado, ocorre na maioria dos cães com HLD (Ingh and Rothuizen 1994). Por sua vez, concentrações diminuídas de ureia e colesterol manifestam-se em cerca de 40% dos cães com HCC, sendo mais comum nos cirróticos (Kanemoto et al. 2013). A hipoglicémia é rara, sendo mais frequente na insuficiência hepática aguda (Webster et al. 2019).

A concentração dos ácidos biliares séricos é o teste de função mais sensível para HCC. No entanto, a sua sensibilidade, particularmente nos estádios iniciais da doença, é inadequada, sendo pouco útil para o despiste precoce de HCC, não devendo ser a base da decisão de avançar para biópsia. Cães com colestase (ictéricos, com hiperbilirrubinémia) associada a doença hepática vão ter os ácidos biliares aumentados, tornando desnecessária a sua medição. A hiperamoniémia tem uma sensibilidade semelhante aos ácidos biliares para detetar HCC, cirrose e APSS, sendo, de alguma forma, mais específica por não ser afetada pela colestase. No entanto, é muito mais difícil a nível técnico a sua medição rigorosa. Apesar de níveis elevados de amónia no sangue inferirem a presença de EH, é possível que esta se desenvolva na sua ausência. A presença de cristais de biurato de amónia na urina são indicativos de hiperamoniémia episódica (Webster and Cooper 2009).

Num estudo recente, Assawarachan et al. (2021) averiguaram que cerca de 62,2% dos cães com HCC apresentavam hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia ou ambas, tendo concluído que a hiperlipidemia está associada à HCC. Contudo, ainda não foi estabelecida uma relação causa-efeito entre a hiperlipidemia e a HCC, podendo esta ser primária por alterações do metabolismo lipídico a nível do fígado, ou secundária a colestase, que é um achado comum em cães com HCC (Assawarachan et al. 2021).

Relativamente ao hemograma, os animais com HCC podem apresentar leucocitose com neutrofilia, devido ao stress ou à resposta inflamatória. A trombocitopenia subclínica ocorre em cerca de 23% dos cães, tipicamente em estádios mais tardios, podendo estar associada a um consumo aumentado ou produção diminuída de trombopoietina pelos hepatócitos. Em aproximadamente 1/3 dos cães pode estar presente anemia ligeira, que pode refletir hemorragia GI por ulceração das mucosas, coagulopatia ou anemia de doença crónica (Webster et al. 2019). Apesar de raro, nos BT já foi reportada uma crise hemolítica aguda devido ao excesso de libertação de cobre para a corrente sanguínea.

Na análise da urina tipo II, que não representa uma grande ferramenta para o diagnóstico de HCC, podemos apenas salientar a presença de isostenúria em cães com PU/PD e a presença de uma síndrome semelhante à *Fanconi*, adquirida, transitória, caracterizada por glicosúria com euglicémia, em alguns casos de cães com CuHC ou outras lesões tóxicas no fígado, quando existe lesão tubular renal concomitante (Webster et al. 2019).

Recentemente, Menard et al. (2019) desenvolveram um *score* para monitorizar a presença de FH (grau moderado a avançado) com base em biomarcadores séricos. Este *score*, já existente em MH, seria útil para detetar precocemente cães que necessitem de realização de biópsia. Seria também uma alternativa para as biópsias de controlo da progressão das lesões e eficácia do tratamento. Neste estudo, concluiu-se que a FAS, a bilirrubina total sérica, os ácidos biliares e a GGT estão positivamente associados a FH, enquanto o potássio está associado negativamente, e que, se avaliados em conjunto, podem inferir sobre a presença de FH. Para além disto, atualmente, estão a ser pesquisados biomarcadores que se expressem diferencialmente em cães com HCC, o que contribuiria para o desenvolvimento de novos testes diagnóstico, menos invasivos, mais seguros e, portanto, mais apelativos para os detentores. Esta descoberta poderá também contribuir para aumentar o conhecimento da patogenia da HCC. O ácido hialurónico, um componente dos glicosaminoglicanos da ME que, em caso de excesso de produção desta, como acontece na FH, é libertado para a circulação, foi avaliado como biomarcador serológico de FH. Os resultados reportaram uma sensibilidade de 70% a 80% para diferenciar FH ligeira de FH moderada a grave, e uma especificidade de 75% a 100%. Na mesma linha, um estudo concluiu que cães com HCC em estágio final tinham concentrações de ácido hialurónico

circulantes superiores ao grupo controlo, aos cães com doença extra-hepática e aos com doença hepática sem FH (Kanemoto et al. 2009; Lawrence 2019). No entanto, um outro estudo não encontrou correlação entre a concentração sérica de ácido hialurónico e o grau de FH (Lidbury 2015). Continua a ser necessária mais investigação nesta área para que no futuro se aplique na prática clínica a utilização destes biomarcadores séricos.

### **5.3 – Imagiologia**

As radiografias abdominais dão uma noção do tamanho, forma e radiopacidade do fígado, no entanto, não são sensíveis a variações subtis (Gaschen 2009). Suspeita-se de microhepatia quando o eixo gástrico está deslocado cranialmente e de hepatomegália quando o fígado se estende para além do arco costal e apresenta os bordos arredondados. Alterações assimétricas do tamanho do fígado não são possíveis de avaliar na radiografia. A perda de detalhe da radiografia poderá apontar para a presença de ascite (Webster et al. 2019).

A ecografia hepática é o exame imagiológico de eleição para a avaliação inicial dos cães com suspeita de HCC, uma vez que permite identificar outros diagnósticos, como massas hepáticas, e complicações da doença, como HP, ascite, APSS e trombos (Gaschen 2009; Larson 2016). Invariavelmente, deve realizar-se uma avaliação sistemática do tamanho, forma, ecogenicidade e ecotextura do parênquima e do diâmetro e espessura da parede dos ductos intra e extra-hepáticos e da vesícula biliar (VB). Igualmente importante é a pesquisa de lesões focais e/ou difusas, alterações vasculares, com especial atenção para a veia porta (VP) e presença de líquido abdominal livre. No entanto, a interpretação das imagens do fígado pode ser desafiante, não só pela sua localização protegida pelas costelas e pela variação conformacional inter-racial, mas também por frequentemente ter um tamanho reduzido em estádios avançados da HCC. Para além disto, é um método altamente dependente do operador, e, por essa razão, os resultados dos trabalhos publicados variam consoante a experiência do ecografista e o equipamento (Webster et al. 2019).

As alterações ecográficas no fígado dos cães com HCC são, por norma, lesões difusas. O fígado normalmente é hipoecoico comparativamente ao baço. Na HCC tende a ser hiperecoico, devido à presença de FH ou vacuolização glicogénica. À medida que a doença progride, a ecotextura torna-se heterogénea com pequenos nódulos hipoecoicos. A heterogeneidade pode variar entre os vários lobos. Outras lesões como inflamação aguda, alterações lipídicas ou glicogénicas vacuolares e hiperplasia nodular benigna podem afetar o tamanho, o contorno e a ecogenicidade do órgão, dificultando o diagnóstico (Webster et al. 2019). Graus iniciais/ligeiros da doença podem afetar minimamente o tamanho e a ecotextura do fígado, podendo essa ser a razão para a baixa sensibilidade deste método na deteção precoce de HCC. Em vários estudos, o tamanho do fígado encontrava-se normal em 14-57% dos cães com HCC, embora o estágio da doença fosse desconhecido (Poldervaart et al. 2009; Bexfield 2017). Deste modo, um aspeto ecográfico normal não deve ser dissuasor de avançar

para biópsia hepática, uma vez que 64% dos cães com fígados inalterados na ecografia tinham alterações hepáticas na histopatologia (Wilkinson et al. 2019). A presença de microhepatia, nódulos hipoecoicos irregulares e margens irregulares são características frequentes em cães com HCC avançada, no entanto, também estes podem apresentar um aspeto relativamente normal (Elhiblu et al. 2015). Sinais ecográficos de HP incluem ascite, APSS, edema da VB, parede GI e/ou região pancreática, velocidade do fluxo sanguíneo portal diminuído (<10cm/s) e fluxo sanguíneo hepatofugal. No caso de suspeita de trombose da veia porta (TVP), esta deve ser alvo de uma avaliação cuidadosa, procurando um trombo, que pode ser desde praticamente anecoico a moderadamente ecogénico (Webster et al. 2019). Adicionalmente, a ecografia é também essencial para a decisão do melhor método de colheita de tecido hepático e serve como guia às biópsias *Tru-cut*.

A utilização de tomografia computadorizada e ressonância magnética imagiológica para caracterizar a arquitetura hepática em cães com HCC não se encontra documentada. No entanto, a angiografia é útil nos casos de cães com fígados pequenos e quando se suspeita de HP, TVP ou APSS (Webster et al. 2019). A aplicação destas técnicas poderá revolucionar o diagnóstico das hepatopatias crónicas nos cães no futuro (Webster et al. 2019).

#### **5.4 – Citologia e Histopatologia**

O diagnóstico definitivo de HCC requer uma análise histopatológica de uma biópsia hepática. A citologia por aspiração com agulha fina não alcança um diagnóstico definitivo. Apesar de ser um método seguro, não permite a avaliação de infiltrados inflamatórios, da presença e extensão da FH e de acumulação de Cu. Num estudo, o diagnóstico citológico mostrou-se concordante com a histopatologia em apenas 30% dos casos (Wang et al. 2004).

Relembrando os critérios do *WSAVA Liver Standardization Group*, a HCC é definida histologicamente pela presença de necrose e/ou apoptose hepatocelular, de um infiltrado inflamatório mononuclear variável ou misto, assim como, regeneração e fibrose. Frequentemente, podem observar-se nódulos regenerativos no parênquima hepático, assim como proliferação ductal na periferia do parênquima e entre os septos fibrosos. A proporção e a distribuição destes componentes é variável e é necessário incluir no diagnóstico morfológico a atividade e o estágio da doença, assim como a possível etiologia. A atividade da doença é determinada pela quantidade de inflamação e pela extensão da apoptose e necrose hepatocelular. O estágio da doença e o prognóstico podem ser definidos através da extensão e padrão da fibrose e presença de distorção da arquitetura do parênquima (WSAVA 2006; Kilpatrick 2016).

A primeira coisa a ter em consideração na recolha de amostras de fígado é o risco de hemorragia, apesar da sua prevalência ser baixa na HCC, 1,2% a 3,3% (Petre et al. 2012; Reece et al. 2020). No entanto, muitos pacientes com alterações da coagulação moderadas a graves foram previamente tratados com transfusão de plasma fresco congelado (PFC), o

que poderá ter influenciado os resultados (Webster et al. 2019). À semelhança do que se fez em MH, foram criadas *guidelines* pré-biópsia com um conjunto de fatores de risco (Tabela 1) que, avaliados simultaneamente, têm algum poder de predição do risco de hemorragia (Webster et al. 2019).

**Tabela 1 - Parâmetros avaliados para determinar o risco de complicações hemorrágicas em cães com HCC. Adaptado de: Webster et al. 2019**

Teste de avaliação do risco de hemorragia	Alto Risco
Hematócrito	<30%
Contagem de plaquetas	<50 000/uL
TP, TTPa	Ambas >1.5x limite superior
Fibrinogénio	<100 mg/dL
Tempo de sangramento mucosa oral	>5 minutos

Individualmente, a medição do tempo de protrombina (TP), do tempo de tromboelastografia parcial ativada (TTPa), da concentração plasmática de fibrinogénio, a contagem de plaquetas e o tempo de sangramento da mucosa oral não são consistentemente preditivos do risco de hemorragia em humanos (Webster et al. 2019). Em cães, prolongamentos ligeiros a moderados de TP e TTPa foram relatados em cerca de 40% dos doentes com HCC, presumivelmente refletindo falhas na sua síntese ou deficiência em vitamina K (Kavanagh et al. 2011). No entanto, Wilkinson et al. (2019) não encontraram correlação estatisticamente significativa entre o aumento do TP e TTPa e o risco de hemorragia espontânea após biópsia.

Foram ainda relatadas concentrações de fibrinogénio diminuídas em 60% dos cães com HCC, particularmente em fases avançadas da doença (Prins et al. 2010). A tromboelastografia em humanos é regularmente utilizada para avaliar o *status* de coagulação e prever a tendência para hemorragia em pacientes cirróticos. Neste momento, o valor preditivo da tromboelastografia relativamente ao estado de coagulabilidade em cães é desconhecido (Webster et al. 2019). Em cães com HCC estão descritos estados de hipocoagulabilidade (24%), normocoagulabilidade ou hipercoagulabilidade (33%), sendo 25% dos cães hiperfibrinolíticos (Fry et al. 2017; Wilkinson et al. 2022). As concentrações de fibrinogénio parecem refletir o índice de força do coágulo calculado através da tromboelastografia, estando recomendada a sua medição para avaliar o risco de hemorragia na HCC (Webster et al. 2019). Também alterações hematológicas podem aumentar o risco de hemorragia. Uma anemia ligeira desenvolve-se em cerca de 1/3 da HCC, e pode aumentar o risco de hemorragia, ao interferir com a dinâmica das plaquetas (Webster et al. 2019).

Wilkinson et al. (2019) avaliaram a segurança da biópsia por laparoscopia em cães e associaram a presença de trombocitopénia ao risco de complicações, como necessidade de transfusão sanguínea.

Apesar da falta de estudos veterinários que correlacionem alterações da coagulação com o risco de hemorragia pós biópsia, a hemorragia espontânea pode ser uma complicação fatal e é importante a sinalização de pacientes de risco. Se a biópsia for eletiva e o cão tomar um medicamento que afete a coagulação, o mesmo deve ser descontinuado antes do procedimento. Em cães com risco identificado de hemorragia ou anemia, está recomendado preparar a possível transfusão de componentes sanguíneos. Idealmente, os cães de alto risco realizariam a biópsia por laparoscopia uma vez que a lesão tecidual é menor comparativamente à laparotomia, e a hemostase é mais facilmente controlada comparativamente aos métodos percutâneos. Estes cães devem ficar hospitalizados sob vigilância durante 24 horas. Até à data, não há dados suficientes para recomendar a transfusão de PFC ou outros produtos sanguíneos, nem a administração de vitamina K ou inibidores das protéases como rotina profilática, uma vez que, apesar de corrigirem os parâmetros laboratoriais anómalos, não há evidência de que diminuam o risco de hemorragia (Webster et al. 2019). Outros riscos de biópsia incluem complicações anestésicas, embolismo de ar e pneumotórax (na laparoscopia), bem como infeção (Lidbury 2017).

Relativamente aos métodos de colheita, a amostra hepática pode ser obtida por biópsia percutânea ecoguiada, laparoscopia (fórceps copo de 5mm) ou laparotomia (biópsia excisional). Em geral, espécimes maiores de fígado obtidos a partir de laparoscopia ou laparotomia permitem um diagnóstico fidedigno, sendo que devem estar incluídas pelo menos 12-15 tríades portais (Webster et al. 2019). Para além disto, múltiplos estudos documentaram variação interlobular significativa, o que enaltece a necessidade de colher amostras de múltiplos lobos (Petre et al. 2012). O painel de especialistas do American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) recomenda um mínimo de 5 amostras laparoscópicas ou excisionais de pelo menos 2 lobos, sendo 3 para histopatologia, 1 para cultura e 1 para análise quantitativa de Cu. Os exemplares não devem ser obtidos exclusivamente da periferia dos lobos hepáticos se estes tiverem uma aparência fibrótica. Se os espécimes forem obtidos com agulha, devem colher-se múltiplas amostras com agulhas de 14 ou 16 G, para diminuir o risco de falha no diagnóstico (Webster et al. 2019).

Após a biópsia, o paciente deve ser mantido em repouso e sob monitorização para vigiar possíveis complicações, especialmente hemorragias. Os sinais vitais (frequência cardíaca, pulso femoral, cor das mucosas, hematócrito (Hct) e pressão arterial) devem ser monitorizados antes do procedimento e a cada 2 horas, até 6 horas pós-biópsia. Se não houver sinais de instabilidade hemodinâmica nem diminuição relevante (superior a 6% - 10%) do Hct nesse momento, é improvável a ocorrência de hemorragia (Webster et al. 2019).

As características a analisar incluem presença de inflamação, lesão e/ou morte celular, fibrose, reação ductal e deposição de pigmento. A sua avaliação rigorosa requer o recurso a diferentes colorações, estando as mais relevantes listadas na Tabela 2.

**Tabela 2 - Colorações para avaliação das diferentes características histopatológicas do fígado. Adaptada de: Webster et al. 2019**

Categoria	Coloração	Características coradas
Mais requisitadas	Hematoxilina e eosina (H&E)	Núcleo e citoplasma
	Rodanina/ácido rubeânico	Cobre
	Vermelho Pricosírus/ Tricromo de Masson	Colagénio
Recomendadas	Gordon-Sweet	Reticulina
	Perl's	Ferro
	Schmorl's	Lipofuscina

Primeiro, o tipo de infiltrado inflamatório deve ser caracterizado (neutrófilico, linfocítico, granulomatoso, piogranulomatoso), uma vez que pode ser indicativo da patogénese da doença. A extensão e o tipo de inflamação devem ser classificadas como ligeira, moderada ou grave. A localização da lesão deve também ser identificada. A necrose, presente na forma de apoptose ou necrose, pode afetar hepatócitos, epitélio biliar, endotélio sinusoidal, células da linha sinusoidal e células inflamatórias transitórias, devendo especificar-se quais estão afetadas. A extensão e a distribuição da morte celular (individual, massiva, multifocal, centrilobular e periportal) deve ser igualmente caracterizada.

A presença de FH é fundamental para o diagnóstico de HCC, uma vez que é o marco da cronicidade. A sua localização deve ser descrita (portal, centrilobular ou sinusoidal) bem como a extensão (ligeira, moderada ou grave). Frequentemente, a FH começa como uma expansão do tecido conjuntivo do espaço porta. Com o tempo, finos septos podem estender-se para as regiões periportais e evoluir para septos mais espessos, que fazem 'ponte' para outros espaços porta ou para regiões venosas centrais. Os estádios terminais de FH são caracterizados por proeminentes septos a dissecar o parênquima e regeneração nodular dos hepatócitos. Nesta fase, aplica-se o termo cirrose (Webster et al. 2019).

A proliferação de pequenas estruturas ductulares é vista frequentemente em casos de HCC, e nem sempre indica doença biliar. Surge frequentemente na HLD (Inqh and Rothuizen 1994). Alterações vacuolares podem coexistir com HCC, representando lesões ou resposta dos hepatócitos aos mediadores de inflamação (Webster et al. 2019).

Como já foi mencionado anteriormente, é aconselhada a pesquisa de Cu na histopatologia, uma vez que a concentração sérica deste metal não se correlaciona com a sua concentração hepática (Dirksen et al. 2016). As colorações com rodanina ou ácido rubeânico detetam a sua presença, a distribuição acinar e podem, subjetivamente, estimar a intensidade

da sua acumulação. Nos cães, este fenómeno é quase sempre mais marcado nas regiões centrilobulares, estendendo-se progressivamente para os hepatócitos periportais. A acumulação exclusivamente periportal é inespecífica e envolve pequenas quantidades de Cu clinicamente irrelevantes. Para avaliar a sua relevância clínica, devemos averiguar a associação do Cu a hepatócitos necróticos ou a presença de “granulomas de cobre”. Uma vez que a quantidade de cobre pode variar entre lobos, a preparação de secções de diferentes lobos na mesma lâmina facilita a avaliação da quantidade de Cu na íntegra. A espectroscopia por absorção atómica é o *gold standard* para a avaliação quantitativa do Cu hepático (expressa em ps) e requer apenas uma pequena quantidade (20-40 mg) de tecido para uma determinação precisa. A quantificação digital de Cu através do *scan* de secções biopsadas de vários lobos coradas com rodanina permite quantificar a totalidade do metal presente no tecido, evitando as variações do seu conteúdo entre lobos, que acontecem particularmente na presença de distorção da arquitetura lobular (Center et al. 2013).

Para além destas avaliações rotineiras, certas características podem apontar para a necessidade de técnicas adicionais. Por exemplo, a presença de inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa deve alertar para pesquisa de uma etiologia viral.

Quando o patologista termina a avaliação da secção tecidual, é emitido um diagnóstico morfológico. A interpretação é facilitada se estiverem disponíveis dados clínicos relevantes, colheitas de várias amostras de diferentes lobos, bem identificadas, e, quando possível, imagens macroscópicas do fígado. A troca de informação entre o clínico e o patologista pode otimizar a interpretação da biópsia (Webster et al. 2019).

## **6 – Tratamento**

Idealmente, o tratamento da HCC deveria ter como alvo o agente etiológico, de modo a maximizar a sua eficácia. No entanto, uma grande percentagem dos casos de HCC continua a ser considerada idiopática. Quando a investigação, através dos meios de diagnóstico disponíveis, falha na descoberta de uma causa plausível, o tratamento de suporte, que inclui hepatoprotectores, está indicado, com possibilidade de *trial* com imunossuppressores, se as características histológicas apontarem para uma etiologia imunomediada. A aparência histológica continua, portanto, a ser o principal guia para a escolha do tratamento, que é direcionado para uma modulação inespecífica da resposta inflamatória e da fibrose, na maioria dos casos (Lidbury 2017).

### **6.1 Tratamento direcionado à etiologia**

Nos poucos casos em que se conhece o agente etiológico, a escolha do tratamento está facilitada. Se a etiologia for bacteriana (leptospirose, por exemplo) o tratamento requer adição de antibiótico. Em alguns casos, o tratamento do agente etiológico pode levar à remissão clínica, embora noutros, esta possa não ser atingida por completo, possivelmente devido à indução de uma resposta imune auto-perpetuante (McCallum et al. 2019).

Nos casos de suspeita de exposição a um fármaco ou suplemento hepatotóxico, este deve ser imediatamente descontinuado, e deve ser feita a monitorização das enzimas séricas hepáticas, para avaliar a recuperação. Na maioria dos casos, está indicado o tratamento com antioxidantes. Em cães com infiltrados inflamatórios, poderá ser benéfica a administração a curto prazo de uma dose anti-inflamatória de corticosteroides. Não é claro se os cães com HCC estão predispostos a doença hepática induzida por fármacos, como acontece com alguns medicamentos no Homem. Alguns membros do painel do ACVIM defendem que cães com CuHC têm maior risco de desenvolver lesão hepática secundariamente à administração de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (Webster et al. 2019).

## **6.2 Hepatite crónica associada ao cobre**

Relativamente à CuHC, sabe-se que o excesso de Cu hepático promove lesões oxidativas da membrana, ao gerar radicais superóxido e hidroxilo, nefastos para os tecidos. Por isso, o objetivo do tratamento é criar um balanço negativo deste metal, através da sua restrição dietética e aumentando a sua excreção urinária, com a ajuda de quelantes. Uma dieta com restrição de Cu está recomendada para todos os cães com uma concentração hepática superior a 600  $\mu\text{g/g}$  ps, devendo ser mantida para o resto da vida (Fieten et al. 2014). A maioria destas rações têm restrição proteica, devendo ser aconselhada uma suplementação proteica adicional. Deve também considerar-se a concentração de cobre na água, que deve ser  $<0,1 \mu\text{g/g}$  (Webster et al. 2019). Uma vez que o tratamento tem maior probabilidade de sucesso se implementado numa fase inicial da doença, é importante que este seja iniciado assim que possível, idealmente na fase subclínica (Dirksen and Fieten 2017).

Relativamente à remoção do Cu, a DPA é o agente quelante de eleição. Este liga-se ao Cu hepático e, posteriormente, elimina-o pela urina (Fieten et al. 2013). Para além disto, a DPA induz a síntese de metalotioneína (proteína que se liga ao Cu, neutralizando o seu efeito oxidativo) nos hepatócitos, destoxificando o cobre intracelular, e nos enterócitos, facilitando a sua eliminação fecal, tendo ainda um ligeiro efeito anti-inflamatório e anti-fibrótico. Deve ser administrada via oral, em jejum, uma vez que o alimento diminui substancialmente a sua biodisponibilidade. A DPA em conjunto com a restrição de cobre na dieta são, geralmente, suficientes para normalizar concentrações tão elevadas como 1500  $\mu\text{g/g}$  ps, no espaço de 6 meses, sendo a sua concentração diretamente proporcional ao período de tempo necessário. No entanto, é difícil prever a duração necessária do tratamento quelante individualmente (Fieten et al. 2015). A melhor maneira de avaliar a eficácia do tratamento seria repetir a quantificação de Cu. No entanto, sendo um processo invasivo e dispendioso, a normalização da atividade da ALT sérica é utilizada como substituto para estimar o sucesso do tratamento. Devido à baixa sensibilidade da ALT para detetar lesões provocadas por níveis residuais deste metal, é recomendado manter o tratamento até 1 mês após a sua

estabilização. Se não se fizer a restrição dietética juntamente com a medicação, a quelação poderá falhar ou demorar mais tempo a surtir efeito. Quanto aos efeitos adversos da DPA, estes são maioritariamente gastrointestinais. A estratégia para combatê-los passa por fazer um aumento de dose gradual, administrar o fármaco com uma pequena quantidade de carne e/ou administração concomitante de antieméticos. Alguns especialistas do ACVIM sugerem a coadministração de uma dose baixa de corticosteroides, durante um curto período, para estimular o apetite, se os cães se encontrarem inapetentes. Outros efeitos adversos são raros, sendo os mais comuns proteinúria e erupções cutâneas. A DPA pode ainda induzir a atividade da FAS e uma hepatopatia vacuolar ligeira a moderada, que se resolve com a descontinuação do fármaco. O tratamento simultâneo com DPA e zinco encontra-se contraindicado porque se anulam mutuamente. A experiência com outros agentes quelantes em cães, como tetratiomolibdato de colina e trienteno é limitada, não estando atualmente recomendados (Webster et al. 2019). Ao tratamento quelante, está recomendada a adição de antioxidantes, uma vez que o Cu provoca danos oxidativos (Webster and Cooper 2009). Após terminar o tratamento com a DPA, pode ser administrado zinco para restringir a absorção entérica de cobre. O zinco interfere com a absorção intestinal de Cu através da indução da síntese de metalotioneína que, por sua vez, se liga ao cobre, facilitando a sua excreção fecal. Segundo Brewer et al. (1992), o acetato de zinco diminui a quantidade de cobre hepático em cães. No entanto, esta diminuição acontece muito lentamente, o que torna o zinco inapropriado para intervenções agudas. As concentrações de zinco plasmático devem ser monitorizadas, a fim de assegurar uma dose terapêutica e evitar concentrações tóxicas. A intolerância GI ao zinco é comum, muitas vezes limitando a dose utilizada (Webster et al. 2019).

Em alguns cães com CuHC, a presença de hepatite linfocítica pode refletir um processo imunomediado primário concomitante ou uma formação de neo-epítomos reativos provocados pela lesão oxidativa. Estes casos necessitam de imunomoduladores, que podem ser iniciados na altura do diagnóstico, quando o tratamento quelante não normaliza a ALT, ou quando a repetição da biópsia hepática demonstra uma normalização da concentração de cobre, contudo acompanhada de inflamação persistente (Webster et al. 2019).

A restrição dietética de Cu como única intervenção, após o tratamento com quelantes, pode manter a concentração deste metal dentro dos limites de referência, no entanto, isto depende da *compliance* dos detentores, e ainda não está estudado nas diferentes raças individualmente. Alguns cães necessitam de estratégias adicionais para o manejo crónico da doença, podendo ser uma dose baixa de zinco ou uma dose baixa de DPA, 2 a 3 vezes por semana, que aparenta ser eficaz, apesar de ainda não ter sido estudada em cães (Webster et al. 2019). A utilização de quelantes pode levar a deficiência em Cu iatrogénica, por isso, estes devem ser usados exclusivamente após a quantificação histológica de cobre.

### 6.3 Hepatoprotetores e antioxidantes

A doença hepática necro-inflamatória está associada à depleção de mecanismos de defesa antioxidantes, o que justifica a utilização de agentes citoprotetores com propriedades antioxidantes (Vince et al. 2014).

O ácido ursodesoxicólico é um ácido biliar com efeitos coleréticos, imunomoduladores, antioxidantes, anti-inflamatórios, citoprotetores e propriedades antiapoptóticas, que também inibe a fibrinogênese. Apesar de pouca investigação relativamente à sua eficácia, é amplamente prescrito em casos de doença hepática, com base nos seus benefícios demonstrados em humanos e em modelos animais (Webster and Cooper 2009). Está indicado para cães com HCC que manifestem sinais de colestase, inflamação dos ductos biliares e suspeita de inflamação bacteriana da bília (Webster et al. 2019). A S-adenosilmetionina (SAME) é um metabolito intermediário essencial para as reações de transulfuração, transmetilação e descarboxilação hepáticas. Uma vez que as lesões hepáticas graves podem suprimir a transformação de metionina em SAME, este pode tornar-se um nutriente essencial para o seu tratamento. A SAME é necessária para a produção de glutatona, um importante antioxidante do fígado, cuja concentração em cães é baixa comparativamente a outras espécies, o que pode aumentar o seu risco para lesão oxidativa (Center et al. 2002). Assim, ao administrar SAME, repõe-se a glutatona hepática, ajudando à recuperação das lesões oxidativas (Center et al. 2005). Apesar de existir evidência dos seus efeitos hepatoprotetores *in vitro* e em modelos animais com doença hepática, o seu benefício clínico ainda não foi devidamente investigado em cães. Center et al. (2015) descreve que esta protege contra a hepatotoxicidade do acetaminofeno e repõe a glutatona hepática em casos de hepatopatia vacuolar induzida por corticoterapia. Há, contudo, necessidade de realização de ensaios clínicos aleatórios e controlados em populações clínicas bem definidas (Webster et al. 2019). Apesar de serem utilizados derivados do cardo mariano (silimarina, silibinina) no tratamento de doença hepática em humanos, e da sua recente popularidade em cães, os seus efeitos ainda não estão cientificamente comprovados. A biodisponibilidade da silimarina é baixa (30% a 50%) e o tempo de semivida curto, o que significa que são necessárias doses altas e repetidas para obter concentrações terapêuticas (Webster and Cooper 2009). Vários estudos realizados sobre a silimarina em humanos foram inconclusivos quanto aos seus efeitos terapêuticos (Webster et al. 2019). Segundo um único estudo, de Skorupski et al. (2011), a silimarina combinada com SAME demonstrou proteção contra a intoxicação hepática provocada pela lomustina em cães. Esta combinação é a formulação recomendada pela maioria dos membros do painel do ACVIM, apesar de ainda ser necessária investigação futura dos seus benefícios clínicos na HCC. Segundo Eulenberg & Lidbury (2018), a silimarina pode ter um papel na inibição da FH, ao diminuir a atividade das CEH e a expressão de colagénio, e graças ao seu efeito anti-inflamatório. A silimarina pode inibir enzimas do citocromo P450 e

glicoproteínas P, sendo necessária precaução no seu uso em protocolos com múltiplos fármacos (Webster and Cooper 2009). Por sua vez, a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) funciona como um antioxidante, que protege as células e as membranas dos organelos (principalmente das mitocôndrias) da peroxidação lipídica. Num estudo piloto em cães com HCC suplementados com vitamina E, durante 3 meses, Twedt et al. (2003) verificaram um aumento da concentração de vitamina E sérica e hepática, acompanhada por uma melhoria da função do ciclo *redox* da glutathiona, contudo, sem melhoria histológica. Apesar da sua eficácia não estar comprovada em cães, esta é aconselhada em casos de doença hepática necro-inflamatória por extrapolação dos seus benefícios comprovados no Homem (Webster et al. 2019).

#### **6.4 Hepatite com suspeita imunomediada**

Vários estudos já foram realizados em cães com HCC idiopática para avaliar a eficácia do tratamento com prednisolona, azatioprina e ciclosporina. Nestes estudos, alguns cães demonstraram melhorias, inferindo um benefício imunomodulador e/ou anti-inflamatório destes fármacos que, indiretamente, também atuam na inibição da fibrose, ao diminuir a inflamação (Favier et al. 2013; Kanemoto et al. 2013; Ullal et al. 2019; Bayton et al. 2020). Num estudo da universidade de Utrecht, realizado em cães com HCC idiopática tratados com 1mg/kg/dia de prednisolona, durante 6 semanas, Favier et al. (2013) concluíram que a resposta ao tratamento difere entre animais, graças a diferentes etiologias e estádios da doença. No entanto, em animais sem cirrose, a prednisolona conseguiu, em alguns casos, limitar a progressão da FH e da necro-inflamação, tendo aumentado o tempo médio de sobrevivência. Numa minoria, conseguiu remissão dos sinais clínicos. Uniformemente, normalizou as provas de coagulação sem administração de anticoagulantes. No entanto, é difícil tirar conclusões generalizadas, uma vez que os vários artigos foram realizados em diferentes raças, com doses imunossupressoras variadas e concomitantes com outras terapias, frequentemente sem acompanhamento histológico pós tratamento e sem quantificação do cobre. Apesar disto, estes estudos reconhecem a existência de uma percentagem de cães com HCC que respondem ao tratamento imunossupressor, o que reforça a suspeita de uma etiologia imunomediada. Atualmente, contudo, não há informação suficiente para estabelecer um protocolo imunossupressor ideal (Webster et al. 2019).

Segundo o painel de especialistas do ACVIM, os corticosteroides são eficazes como primeira linha de tratamento, no entanto, os seus efeitos adversos (catabolismo, PU/PD, indução enzimática hepática, hepatopatias vacuolares) têm um impacto limitante ao dificultar a avaliação da resposta ao tratamento. Durante a sua administração, a medição das enzimas hepáticas para monitorizar a doença não é útil, sendo uma nova biópsia a única forma de controlo nestes casos (Twedt 1998). Outros efeitos adversos são especialmente problemáticos em cães com doença avançada: a retenção de sódio e água (risco aumentado de ascite), risco de ulceração entérica (pode precipitar EH), desequilíbrios da coagulação

(tendência para estados de hipercoagulabilidade) e risco de tromboembolismo (Favier et al. 2013). Os corticosteroides estão contraindicados em pacientes cardíacos, com *Diabetes mellitus*, hipertensos, com úlceras GI e infecções bacterianas. Alguns membros do painel do ACVIM (2019) combinam estes fármacos com outro imunossupressor, como a azatioprina ou a ciclosporina, de forma a conseguirem espaçar a sua administração. Para a maioria dos membros, o objetivo final é a terapêutica de manutenção ser realizada com o segundo imunomodulador, retirando o corticosteroide. Para outros, o tratamento exclusivo com ciclosporina 2 vezes/dia é o tratamento de eleição para evitar os efeitos adversos dos corticosteroides, devendo passar para 1 vez/dia após remissão clínica. De facto, Ullal et al. (2018) verificaram que 79% dos cães obtiveram remissão bioquímica (ALT <1,1x o limite superior normal) com uma dose média de 7,9 mg/kg/dia de ciclosporina e uso concomitante de hepatoprotetores, durante 2,5 meses, em média. Nenhum dos fatores de prognóstico documentados teve uma associação significativa com a possibilidade e o tempo de remissão, indicando que o tratamento de HCC idiopática através de uma abordagem multimodal pode ter sucesso, até em cães com doença avançada (Ullal et al. 2018). Os efeitos adversos da ciclosporina são maioritariamente gastrointestinais e hiperplasia gengival. O micofenolato também tem sido usado com sucesso como tratamento de primeira ou segunda linha por alguns especialistas do ACVIM, em combinação com os corticosteroides. Contudo, o tempo necessário para atingir a remissão clínica com imunossupressores e a necessidade da sua manutenção a longo prazo ainda são desconhecidas (Webster et al. 2019).

## **6.5 Maneio dietético**

Não existem estudos sobre as necessidades proteicas em cães com HCC. Com base em investigações feitas em humanos, a restrição proteica e lipídica não estão recomendadas (Webster et al. 2019). Em caso de suspeita de EH, uma dieta com restrição proteica poderá ser benéfica. A suplementação com vitamina K está aconselhada se o canídeo apresentar fezes acólicas, hiperbilirrubinemia crónica e grave ou aumento do TP associado a tendência para hemorragia. No entanto, deve ser tido em conta que a suplementação crónica com esta vitamina representa uma sobrecarga oxidativa para o organismo. Se um cão se apresentar com PU/PD ou estiver a tomar diuréticos, um suplemento com vitamina B está recomendado devido ao risco de perda urinária da mesma. A restrição de sódio é prescrita em humanos e em cães que desenvolvem ascite, contudo tem um efeito negativo na palatibilidade da dieta, podendo agravar o estado nutricional em inapteses (Webster et al. 2019).

## **7 – Prognóstico**

Sem tratamento ou, em alguns casos, apesar do tratamento, a HCC é uma doença progressiva que pode levar à morte ou à eutanásia do paciente. Em caso de cirrose, o prognóstico é muito reservado, o que destaca a importância de não adiar realização de biópsia, a partir do momento da suspeita clínica da doença (Favier et al. 2013).

Segundo uma metanálise de vários estudos, o tempo médio de sobrevivência é de  $561 \pm 268$  dias (Poldervaart et al. 2009; Raffan et al. 2009; Bexfield et al. 2011; Favier et al. 2013; Kanemoto et al. 2013; Gómez Selgas et al. 2014). Em cães com cirrose este é consideravelmente mais curto,  $23 \pm 23$  dias. Considerando estudos que avaliaram a progressão da doença em cães com ascite, o tempo médio de sobrevivência foi  $22,5 \pm 15$  dias (Raffan et al. 2009). A acumulação de líquido abdominal revela alterações na circulação portal, aparecendo num estágio avançado da doença, podendo já estar presente cirrose, o que explica o encurtamento do tempo de sobrevivência. Os cães com HLD têm tempos de sobrevivência menores, em média,  $48 \pm 38$  dias (Poldervaart et al. 2009).

Os fatores clínico-patológicos com associação mais forte a um mau prognóstico são a presença de hiperbilirrubinemia, tempos de TP e TTPa aumentados, hipoalbuminemia, ascite e FH marcada na histopatologia (Webster et al. 2019). Num estudo, por cada unidade de bilirrubina total aumentada, aumentava 1,082 vezes a hipótese de morte em cães com HCC (Gómez Selgas et al. 2014). Contrariamente, Shih et al. (2007) não encontraram nenhuma associação entre hiperbilirrubinemia ou hipoalbuminemia e o tempo de sobrevivência. Outros parâmetros clínicos documentados como fatores de prognóstico são anemia, trombocitopenia, hipoglicemia e hipoglobulinemia. Em termos de histopatologia, o grau de necrose e a existência de fibrose em ponte parecem estar associados a mau prognóstico. Na imagiologia, a microhepatia e a linfadenomegalia também parecem estar relacionados com tempos de sobrevivência mais curtos (Poldervaart et al. 2009; Webster et al. 2019). A Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica também está associada a pior prognóstico (Kilpatrick 2016; Webster et al. 2019). Até hoje, nenhum estudo provou existir associação entre o aumento das enzimas hepáticas e o prognóstico.

## **8 - Complicações**

As complicações associadas à HCC, especialmente em estágios avançados, incluem HP, ascite, EH, alterações da coagulação, APSS, ocasionalmente ulceração GI e, raramente, infecção bacteriana secundária. Adicionalmente, em MH, estão descritas síndrome hepatopulmonar, síndrome hepatorenal, peritonite bacteriana espontânea e hiperesplenismo. Destas, apenas a síndrome hepatopulmonar foi recentemente descrita em cães (Kaneko et al. 2016).

A HP nos cães é definida como uma pressão da veia porta (PVP)  $>10$ mmHg. Frequentemente, a presença de HP é inferida através das suas consequências clínicas, da avaliação da hemodinâmica da VP através de ecografia com Doppler ou ambos. As suas consequências são o aparecimento de ascite, sintomatologia neurológica compatível com EH e palidez das membranas mucosas. A nível laboratorial, pode ser sugestivo de HP a presença de microcitose, hiperamoniemia, aumento dos ácidos biliares, transudado puro ou modificado,

diminuição da atividade da proteína C e/ou anemia. Ecograficamente, a detecção de APSS, a diminuição da velocidade ou do fluxo sanguíneo da VP, a presença de fluxo hepatofugal na VP e um rácio veia porta/aorta  $<0,65$ , na ausência de um shunt porto-sistémico congénito único, também são sinais de HP. Existem marcadores não invasivos de aumento da PVP, como a concentração da endotelina plasmática e o rácio veia porta/aorta utilizando angiografia. Sabe-se que, em humanos, o controlo da PVP, com recurso a fármacos, é importante para evitar as complicações associadas à HP. Nos cães, não há nenhum fármaco capaz de modular a PVP, por isso, o tratamento tem como alvo os fatores capazes de agravar (hipervolemia, sobrecarga de sódio) e mitigar as suas consequências. No entanto, a única forma eficaz seria remover a causa, ou seja, reverter/atrasar a progressão da FH (Webster et al. 2019). A ascite é a consequência de uma combinação de fatores que levam ao aumento da pressão sinusoidal e à saída de fluido para o espaço intersticial, entre os quais, vasodilatação arterial esplâncnica, diminuição do débito cardíaco e ativação do sistema renina-angiotensina, que leva à retenção de água e sódio. Também a hipoalbuminémia pode contribuir para a presença de líquido livre abdominal. A análise do fluido ascítico que acompanha a HP apresenta uma baixa concentração de proteína ( $<2,5$  g/dL), característica de transudados modificado e puro (Webster et al. 2019). Os diuréticos estão recomendados, em conjunto com alimentação pobre em sódio. O diurético de eleição é a espironolactona, antagonista da aldosterona. A adição de furosemida em dose baixa pode facilitar o estabelecimento da natriurese. A dose de diurético recomendada é a mínima eficaz e deve monitorizar-se cuidadosamente o paciente (peso diário, avaliação do perímetro abdominal, Hct, creatinina, albumina e eletrólitos). Em casos de hiponatremia, hipocaliémia, azotémia ou desenvolvimento e/ou agravamento dos sinais de EH, esta deve ser descontinuada ou reavaliada. A abdominocentese poderá ser necessária se o animal apresentar desconforto, taquipneia ou aparentar comprometimento da perfusão esplâncnica, tendo em atenção que apenas deve ser removido até 50% do volume ascítico, para evitar hipovolemia ou agravamento da hipoalbuminémia (Webster et al. 2019).

O diagnóstico de EH é baseado na presença de sinais neurológicos como letargia, ataxia, alterações comportamentais e do estado mental (estupor, alienação e coma), *head pressing*, cegueira, andar em círculos, tremores, espasmos e ptialismo (Lidbury et al. 2015; Gow 2017). Quando esta é ligeira, os sinais podem ser inespecíficos, por exemplo, letargia, podendo ser atribuídos a outra causa. A hiperamoniémia auxilia no diagnóstico, mas uma concentração sanguínea normal de amónia não exclui que esteja presente. Alguns estudos indicam que a EH é um estado pro-inflamatório, pro-oxidante e de hipercoagulabilidade (Lidbury et al. 2015; Gow 2017). O seu tratamento consiste na modulação da proteína da dieta, administração de lactulose e antibióticos. A investigação, reconhecimento e eliminação de fatores precipitantes, como alcalose metabólica, infeção e sobrecarga proteica (hemorragia

GI e refeições ricas em proteína) são essenciais, assim como a neuro-inibição sinérgica com sedativos e analgésicos (Webster et al. 2019). A EH foi também descrita em cães com shunts porto-sistêmicos congênitos e APSS devido à HP, uma vez que, nestes casos, o sangue rico em amónia proveniente da circulação esplâncnica não passa pelo fígado, não havendo oportunidade para realização do ciclo de destoxificação da amónia. A hiponatrémia é frequentemente citada como sendo uma complicação presente em cães com doença hepática e como um fator importante no desenvolvimento de EH (Kilpatrick 2017). No Homem, a gravidade da hiponatrémia está diretamente relacionada com a gravidade da cirrose (Kilpatrick 2017). A HP, o uso de diuréticos, grandes volumes retirados por paracentese sem administração de albumina e infeção são fatores associados ao desenvolvimento/agravamento da hiponatrémia. No entanto, existem poucos estudos que avaliem a homeostase do sódio em cães com HCC, sendo necessária mais investigação para tirar conclusões (Kilpatrick 2017).

A HCC é também um fator de risco para a ulceração GI, particularmente do duodeno. Apesar da fisiopatologia ser pouco compreendida, não parece estar associada a hipergastrinémia (Mazaki-Tovi et al. 2012). A HP, que leva a congestão esplâncnica e a um fluxo sanguíneo limitado, pode estar na sua origem. O desenvolvimento de hemorragia entérica, sob a forma de melena ou hematoquézia, parece ser mais frequente em estádios avançados de doença. A ulceração gastroduodenal é tratada recorrendo a fármacos anti-secretores e citoprotetores, e evitando medicações ulcerogénicas (Webster et al. 2019).

O fígado canino desempenha um papel importante na manutenção da hemostase e a diminuição da sua função pode levar a alterações da coagulação. A HCC pode resultar em alterações da hemostase secundária através da diminuição da produção de fatores de coagulação (II, V, VII, IX, X, XI e XII), diminuição da produção de fibrinogénio, falha na ativação dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (II, VII, IX e X) e/ou alteração da produção de anticoagulantes. Num estudo em cães cirróticos, a atividade dos fatores de coagulação apresentou-se diminuída, mas apenas o fator IX mostrou alterações significativas comparativamente ao grupo controlo (Wilkinson et al. 2022). Apesar de existir pouca informação disponível relativamente a potenciais efeitos na hemostase primária, foi demonstrada uma ligeira alteração desta em cães com HCC, com base no prolongamento do tempo de sangramento da mucosa oral (Wilkinson et al. 2022). No entanto, também foi documentado, em pacientes em estágio final de HCC, um aumento da ativação dos fatores de coagulação (coagulopatia de consumo), levando a coagulação intravascular disseminada (CID) (Bexfield 2012). Posto isto, concluiu-se que as coagulopatias que acompanham as doenças hepáticas são complexas, podendo ser marcadas por estados de hiper ou hipocoagulabilidade. Embora raro, se ocorrer hemorragia espontânea ou induzida por algum procedimento (biópsia), o tratamento com produtos sanguíneos (PFC, concentrado de

eritrócitos ou sangue total), antiproteases, vitamina K, desmopressina ou combinações destes pode estar indicado, apesar da sua eficácia estar pouco documentada. A administração de sangue armazenado pode provocar EH (Webster et al. 2019). Outras complicações, como TVP, também podem ocorrer em cães com HCC. No entanto, a maioria tem pelo menos um fator de predisposição adicional para trombose, sendo o mais comum o uso prévio de córticos. Na presença de ascite, dor abdominal e trombocitopénia deve ser feita uma cuidadosa avaliação ecográfica da VP. Esta complicação pode estar presente de forma crónica e estável, se se estabelecerem APSS. O uso de anticoagulantes em cães com TVP e HCC não está explorado, mas em cães com trombose aguda pode ser benéfico. Podem ainda surgir trombos noutros vasos, mais frequentemente na vasculatura esplénica. A incidência de infeções bacterianas secundárias está fracamente documentada em cães com HCC, sendo aparentemente rara. Nos 3 estudos que avaliaram os resultados da cultura bacteriana do fígado, estes foram positivos em 0, 4,8% e 15% dos cães (Shih et al. 2007; Wagner et al. 2007; Fry et al. 2017), sendo necessário mais estudos para tirar conclusões.

### **III –Estudo Retrospectivo: Hepatite Crónica Canina**

#### **1 – Introdução**

A HCC é considerada a doença hepática primária mais comum nos cães, tendo grande importância na prática clínica, uma vez que representa uma causa relevante de morbilidade e mortalidade (Poldervaart et al. 2009). Acresce a complexidade do seu diagnóstico, uma vez que inicialmente os sinais clínicos são inespecíficos e a sua etiologia é, em grande parte, desconhecida. Torna-se, por isso, premente maximizar o conhecimento da sua apresentação clínica, para que a terapêutica seja instituída o mais brevemente possível, de forma a evitar as complicações da HCC, que comprometem o prognóstico. Assim, o presente estudo retrospectivo tem como principal objetivo a caracterização da amostra de pacientes, dos seus antecedentes clínicos, das alterações clínicas, laboratoriais, imagiológicas e histopatológicas, assim como do desenvolvimento de complicações e a abordagem terapêutica efetuada em 19 cães com diagnóstico histopatológico de HCC no Hospital Escolar Veterinário da Universidade de Lisboa. Para além disto, a caracterização de uma amostra de cães com HCC em Portugal teve também como objetivo avaliar possíveis tendências raciais e de género neste país.

#### **2 – Material e métodos**

O presente estudo retrospectivo baseou-se em registos clínicos referentes a canídeos acompanhados no HEV, entre 2011 e 2022, cuja recolha de casos foi efetuada durante o período de estágio curricular da autora (1 de Setembro de 2021 a 28 de Fevereiro de 2022).

##### **2.1 Seleção de amostra**

A seleção dos indivíduos teve em consideração os critérios de inclusão explicitados no ponto 2.1.1, cujos registos clínicos foram obtidos através da base de dados do *software GuruVet*. Na pesquisa, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: “*Hepatite Crónica*”, “*Biópsia hepática*” e “*Histopatologia fígado*”. Inicialmente, foram encontrados 508 casos. Destes, foram excluídos os que não tinham realizado biópsia hepática, ou cujo resultado não estava disponível, restando 93. Estes, por sua vez, foram sendo excluídos consoante os restantes critérios inframencionados, tendo a amostra ficado reduzida a 19 canídeos. Dentro dos pacientes selecionados existem casos de primeira e segunda opinião.

Cada animal foi contabilizado apenas uma vez, incluindo aqueles com recidiva de hospitalização. Tanto as ecografias como as histopatologias foram realizadas e avaliadas por clínicos experientes nas respetivas áreas.

##### **2.1.1 Critérios de inclusão**

No estudo incluíram-se todos os canídeos, independentemente da raça, do sexo e da idade, que tinham um resultado de biópsia hepática compatível com HCC, segundo os critérios do WSAVA.

### **2.1.2 Critérios de exclusão**

Dos 508 resultados obtidos na pesquisa inicial, foram excluídos todos os cães que não tinham disponível um relatório da histopatologia hepática. Estes animais surgiram na pesquisa por suspeita de HCC e recomendação de biópsia hepática, contudo, os detentores não prosseguiram com o exame, ou este foi realizado noutra local, não constando na ficha clínica do canídeo. De seguida, excluíram-se os doentes cujo resultado da histopatologia não foi concordante com HCC de acordo com os critérios estipulados pelo WSAVA. Posteriormente, foram eliminados os pacientes sem resultados laboratoriais disponíveis, ou cuja história clínica estivesse incompleta. Foram ainda excluídos os cães com shunts intra-hepáticos congénitos e neoplasias hepáticas concomitantes, uma vez que tornava difícil a distinção da verdadeira causa dos sinais clínicos.

## **2.2 Métodos**

O presente estudo incidiu na análise detalhada da história clínica de cada animal incluído na amostra. A partir das fichas clínicas foram recolhidos, relativamente a cada animal, para além dos antecedentes médicos, os seguintes dados: sexo, estado reprodutivo, raça, idade (em anos), peso (em quilogramas), condição corporal, sinais clínicos descritos pelos detentores ou observados pelo clínico compatíveis com HCC (letargia, perda de apetite, perda de peso, dor abdominal, distensão abdominal, PU/PD, vômito, diarreia, icterícia, etc.), resultados dos exames laboratoriais disponíveis (hemograma, ALT, FAS, GGT, bilirrubina, ácidos biliares, albumina, ureia, glucose, TP, TTPa, etc.), características ecográficas do fígado (tamanho, ecogenicidade, ecotextura, etc.), diagnóstico e características presentes no relatório da histopatologia hepática (fibrose, necrose, tipo de infiltrado inflamatório, etc.). Para além disto, também foi analisada a presença de sinais compatíveis com as complicações documentadas de HCC, tanto descritos pelos detentores como observados pelos clínicos em regime de hospitalização. Foram ainda recolhidos os dados relativos à abordagem terapêutica e à evolução da doença, quando disponíveis.

### **2.2.1 Diagnóstico**

#### **2.2.1.1 Caracterização da amostra, história clínica e apresentação clínica**

A recolha de dados relativamente à história clínica centrou-se na procura de sinais clínicos associados à HCC, a maioria inespecíficos (anorexia e/ou hiporexia, letargia, vômito, diarreia...) descritos pelos donos na anamnese, na caracterização dos cães da amostra (sexo, raça, idade, estado reprodutivo, regime alimentar e peso) e pesquisa de antecedentes relevantes. De seguida, procedeu-se ao levantamento das alterações descritas no exame físico, procurando parâmetros potencialmente afetados pela doença (palpação abdominal tensa, dolorosa e/ou sugestiva de hepatomegália, distensão abdominal sugestiva de ascite, cor das mucosas, condição corporal, temperatura, estado de hidratação, etc).

### 2.2.1.2 Análises laboratoriais

Todos os canídeos da amostra contêm na sua ficha os dados relativos ao hemograma e às análises bioquímicas. A hematologia foi realizada através do aparelho ProCyte Dx da IDEXX. As análises bioquímicas cujos valores foram recolhidos tiveram em atenção os indicadores de lesão e função hepáticos, frequentemente alterados em casos de HCC. Para fins de diagnóstico, nos animais com mais do que um resultado na ficha clínica, foi considerada a análise mais próxima da data da biópsia hepática e antes de ser instituído qualquer tratamento. No aparelho Catalyst One da IDEXX, analisaram-se os valores da ALT, FAS, GGT, proteínas totais, albumina, glucose, ureia, bilirrubina e, em alguns casos, o ionograma. Em pacientes que não se apresentaram ictericos e cuja suspeita de disfunção hepática e/ou EH estava presente, foram medidos os ácidos biliares pré e pós-prandiais.

Relativamente à avaliação analítica, as elevações da ALT (marcador de lesão hepática) foram classificadas em ligeiras, moderadas e graves correspondendo a aumentos entre 2 a 3, 5 a 10 e >10 vezes o limite superior de referência, respetivamente (Webster et al. 2014). Da mesma forma, o aumento das enzimas marcadoras de colestase, FAS e GGT, foi classificado como ligeiro, moderado ou grave. Os marcadores de função hepática incluíram as proteínas totais, a albumina, a bilirrubina, os ácidos biliares, a glucose e a ureia. A presença de insuficiência hepática foi considerada quando coexistiam 3 ou mais alterações destes marcadores. Para a realização das provas de coagulação, as amostras foram recolhidas para um tubo de citrato e imediatamente entregues no Laboratório Braço Forte para serem processadas dentro de 30 minutos.

Quando considerado pertinente pelo clínico, para despiste de agentes infecciosos, foi realizado o teste SNAP 4Dx da IDEXX, cuja leitura é realizada através do SNAP shot Dx Analyzer, para pesquisa de *Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii*, *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi*. Foi ainda realizada serologia para deteção de *Leptospira*, *Babesia* e *Leishmania* e um teste PCR de aspirado hepático para pesquisa de *Bartonella* num animal.

Na urina tipo II, as amostras foram obtidas pelo método de cistocentese ecoguiada, com seringa de 5 ml e agulha entre 21 e 22G, e refrigeradas até à recolha pelo Laboratório Braço Forte. Inicialmente, foram avaliadas as características físicas, como a cor. A determinação da densidade urinária foi efetuada através da leitura no refratómetro, após centrifugação da amostra. O exame bioquímico permitiu a determinação de vários parâmetros, sendo o mais relevante a presença de bilirrubina. Este foi considerado anormal quando >++, uma vez que o limiar de excreção renal de bilirrubina é baixo e os rins dos canídeos têm capacidade de a conjugar (Webb 2017). O exame microscópico do sedimento, por sua vez, avaliou a presença de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros e cristais.

### **2.2.1.3 Exame ecográfico**

Todos os indivíduos tinham disponíveis os relatórios de ecografia abdominal. Os exames ecográficos foram efetuados por um Médico Veterinário com interesse e formação em ecografia, na sua maioria no HEV. O ecógrafo utilizado foi o modelo *MyLab™ X7* da Esaote com uma sonda microconvexa.

### **2.2.1.4 Histopatologia do fígado**

Todos os animais dispunham de registos alusivos à biópsia hepática. 9 pacientes realizaram biópsia ecoguiada, recorrendo a indução anestésica com midazolam e propofol, manutenção com isoflurano e analgesia com fentanil. Outros 8 realizaram biópsia por laparotomia, tendo diferido da ecoguiada pela adição de tranquilização com metadona e recurso a antibiótico profilático. Por fim, 2 animais realizaram biópsia por laparoscopia, utilizando o mesmo protocolo de tranquilização, anestesia e analgesia. Em cada paciente, foram colhidas pelo menos 2 amostras de locais diferentes, com agulha de 16G e seringa de 5 ml, no caso das biópsias ecoguiadas, tendo variado entre 2, 3 e 5 amostras entre animais. Todas as amostras foram submetidas a coloração com H&E e avaliadas por patologistas com interesse e formação em histopatologia. Esta coloração foi utilizada para avaliar o tipo de infiltrado inflamatório (linfoplasmocitário, granulomatoso, piogranulomatoso ou misto) e a presença de FH e necrose, bem como a sua localização (portal, intersticial), grau (ligeiro, moderado, grave, cirrose) e extensão. Além disto, ainda permite detetar outras alterações como hiperplasia dos ductos biliares, vacuolização hepatocitária, entre outras. Para a análise semi-quantitativa de cobre, os espécimes foram colocados num tubo seco, corados com rodanina e enviados para serem processados pela IDEXX em Barcelona. Apenas foi realizada a quantificação de Cu numa amostra. Relativamente à cultura, as amostras foram colocadas em meio apropriado e enviadas para o laboratório de bacteriologia da FMV para pesquisa de organismos aeróbios e anaeróbios estritos. Apenas foram considerados válidos os relatórios em que o diagnóstico de HCC foi emitido segundo os critérios definidos pelo WSAVA em 2006.

Em cães com suspeita de colecistite, foi ainda realizada a colheita de bÍlis através de colecistocentese ecoguiada sob sedação. A punção foi sempre trans-hepática, do lado que permitisse uma melhor visualização da VB, com agulha de 23G e seringa de 5ml. Relativamente, à anestesia e analgesia dos pacientes recorreu-se aos mesmos fármacos utilizados para o procedimento de biópsia ecoguiada. A cultura da bÍlis foi processada para pesquisa de organismos aeróbios e anaeróbios estritos.

### **2.2.1.5 Classificação da Hepatite Crónica Canina**

A classificação da HCC como idiopática é um diagnóstico de exclusão. Antes desta conclusão, deve ser feito o rastreio de agentes infecciosos, a história de medicações ou contacto com toxinas com potencial hepatotóxico, presença de alterações metabólicas e,

ainda, exclusão de acumulação primária de cobre (principalmente em raças predispostas, como é o caso dos LR). Na prática, o clínico escolhe os exames complementares a realizar de acordo com o caso clínico e os meios que tem disponíveis, tendo em conta a complacência e a disponibilidade financeira dos detentores.

Neste estudo retrospectivo realizou-se, em todos os animais, uma análise detalhada dos seus antecedentes médicos e da sua história clínica para excluir intoxicação e hepatotoxicidade provocada por fármacos. De seguida, consoante os resultados dos exames, excluiu-se a presença de agentes infecciosos, através do resultado da cultura de parênquima hepático e da biliar, de PCR de aspirado hepático e/ou através de testes serológicos. A escolha dos agentes a pesquisar foi feita através da avaliação da história e da apresentação clínica, bem como das características histológicas. Por exemplo, num animal com infiltrado piogranulomatoso foi realizada pesquisa de leptospirose (crónica), bartonelose e leishmaniose. Por fim, quando disponíveis, foram analisados os resultados da histopatologia com a coloração específica (rodanina) para avaliar a presença de acumulação de cobre hepático. A classificação de CuHC primária foi feita de acordo com a evidência histológica de HCC associada a acumulação de cobre, frequentemente localizada na área centrilobular (Zona 3) e uma coloração histoquímica que demonstra acumulação de cobre nos hepatócitos nas zonas centrilobulares. Nos casos incluídos neste estudo, apenas se realizou a quantificação de cobre num caso, sendo que nos restantes foi apenas obtida uma semi-quantificação do metal. Nos casos em que a acumulação de cobre se localizava principalmente nos hepatócitos centroacinares (Zona 1), esta foi considerada secundária à colestase, sendo classificada como CuHC secundária.

Alguns canídeos neste estudo foram classificados como suspeitos de presença de hepatite crónica imunomediada devido à presença de infiltrado linfocitário, resposta favorável à terapêutica com imunossuppressores, presença de outras doenças com componente imunomediada e serem do sexo feminino. Contudo, não foram realizados testes diagnóstico para o provar, por não estarem disponíveis.

### **2.2.2 Tratamento**

Todos os pacientes hospitalizados receberam fluidoterapia (na maioria, Lactato de Ringer). A suplementação com potássio, em caso de hipocalémia, foi realizada através da adição de ampolas de cloreto de potássio. A suplementação com dextrose, em casos de hipoglicémia, foi feita preparando soro glicosado a 5%, ao diluir 100mL de dextrose 50% (Braun) em 900mL de soro fisiológico (NaCl 0,9% Braun).

O manejo da dor/desconforto abdominal foi feito em regime hospitalar através da administração de buprenorfina (Bupaq® Multidose 0,3 mg/ml) 0.02 mg/kg IV QUID ou metadona (Semfortan® 10 mg/ml) 0.1–0.3 mg/kg IV sempre que necessário. Em casa, este

foi feito através de administração oral de tramadol (Tralieve®) 2-5mg/kg PO TID ou com pensos transdérmicos de fentanil (Durogesic®) 4µg/kg/h.

Relativamente à terapêutica da parte GI, esta é sintomática e inespecífica, tendo selecionada consoante os sinais presentes em cada animal. A terapêutica antiemética e anti náusea instituída foi maioritariamente maropitant (Cerenia® 10mg/ml) 1mg/kg/dia IV em regime de internamento, ou em ambulatório 2mg/kg/dia PO. Nos casos em que o vômito e/ou a náusea persistiram, foi necessária a adição de metoclopramida (Primperam® 10mg/2ml) 0.25–0.5 mg/kg IV, IM, SC ou PO BID ou 1–2 mg/kg IV em CRI, 24 horas, em regime hospitalar. Nos animais em que o tratamento farmacológico não foi eficaz e a anorexia era total, foi introduzido um tubo de esofagostomia. A técnica cirúrgica utilizada foi a esofagostomia percutânea sob anestesia geral. Na indução usou-se propofol (solução injetável 10mg/ml) 1-4mg/kg IV, avaliando dose-efeito, e na manutenção isoflurano. Posteriormente, confirmou-se o seu correto posicionamento através de radiografia torácica. Tendo em consideração a prevenção da ulceração GI, a maioria dos cães (principalmente os que apresentaram melena ou hematoquezia) beneficiou da administração de um inibidor da bomba de prótons, como o omeprazol, em doses entre 0,5-1,5mg/kg IV ou PO e de sucralfato (Ulcermin® 1g/5ml) 0,5g/cão PO (cães até 20 kg) ou 1–2 g/cão PO (>20 kg) TID ou QUID. Em alguns casos, ainda se adicionou outro antiácido, tendo sido a escolha mais frequente a famotidina (Lasa®) 0.5–1.0 mg/kg PO SID ou BID.

Nos animais com alterações da coagulação, como prolongamento do TP e TTPa, foi administrada vitamina K 0.5–1.0 mg/kg SC, previamente à realização da biópsia hepática.

Num caso de hipoalbuminémia grave foi realizada a transfusão de PFC e albumina humana, numa tentativa de manter a pressão oncótica vascular. Para o maneio da ascite foi adicionada espironolactona (Aldactone®) 2–4 mg/kg/dia PO ao tratamento.

Em caso de suspeita ou confirmação de EH, foi administrada lactulose (Laevolac® 10g/15ml), em dose variável, consoante a duração e progressão dos sinais, via oral ou por enema, e também antibiótico, regra geral, metronidazol (Metrobactim®) 10–15 mg/kg po BID. Nestes casos, foi aconselhada uma dieta com restrição proteica parcial, com proteína de alta qualidade, preferencialmente de origem vegetal, com fibra fermentável e teor de gordura limitado. O uso de antibiótico foi discernido consoante os resultados da pesquisa de agentes infecciosos, da temperatura basal, do leucograma e do tipo de infiltrado inflamatório hepático, sendo o mais escolhido uma combinação entre amoxicilina com ácido clavulânico e metronidazol, que abrange um largo espectro.

O uso de corticosteroides foi realizado na maioria dos animais, por não se conseguir definir a etiologia da HCC e existir a suspeita de uma componente imunomediada, sendo o eleito a prednisolona (Prednicortone®) 1mg/kg/dia PO. A colchicina foi utilizada num caso para tentar atrasar a progressão da FH, numa dose inicial de 0,01mg/kg/dia PO sendo que,

na ausência de efeitos adversos, esta dose pode ser aumentada em pequeníssimas quantidades a cada 3-4 dias até uma dose máxima de 0,03mg/kg PO BID.

Quanto à suplementação, todos os pacientes beneficiaram de hepatoprotetores, havendo uma grande variedade de formulações no mercado, com diversas substâncias com efeitos antioxidantes e citoprotetores. Neste estudo, o suplemento de eleição foi o Zentonyl® *Advanced*, cuja formulação consiste num sal puro, estabilizado, de SAME combinada com Silibina. Nos casos de evidência de colestase, adicionou-se ao tratamento um agente colerético, o ácido ursodesoxicólico (Ursofalk®) 15mg/kg/dia em conjunto com alimento para aumentar a sua biodisponibilidade. Além disto, foi aconselhada a transição para uma dieta hepática ou hipoalergénica, pobre em ácidos aminados.

Nos casos de CuHC primária, o tratamento consistiu numa dieta com restrição de cobre para a vida (Purina HP ou Hill's I/d) e uso de um agente quelante, sendo o de eleição a DPA 10mg/kg PO BID, pelo menos uma hora antes da refeição, durante 60 dias ou até 1 mês após a estabilização dos valores da ALT. Após este período, foi feita uma transição para gluconato de zinco 2mg/kg/dia PO. Adicionalmente, o tratamento com os antioxidantes supracitados foi recomendado, uma vez que o Cu provoca lesões oxidativas no fígado.

### **2.2.3 Complicações**

Na amostra avaliada neste estudo, houve animais referenciados que já apresentavam complicações, e outros que as desenvolveram durante a hospitalização ou ao longo do tempo, com a progressão da doença. O seu diagnóstico foi obtido quer pelo relato dos donos, quer através da avaliação clínica, recorrendo a meios complementares de diagnóstico.

A HP foi inferida através de sinais ecográficos e histopatológicos. Quanto aos primeiros, incluíram observação de neovascularização ao redor da VP (APSS), diminuição brusca do diâmetro da VP no hilo e diminuição da velocidade média do fluxo da VP, veia gonadal esquerda visível por dilatação luminal, presença de líquido abdominal livre e edema da VB, pâncreas e parede intestinal. Na histopatologia, detetou-se a presença de peliose, que é um sinal indireto de HP, correspondendo a múltiplas formações císticas repletas de sangue, secundárias a um obstáculo ao fluxo sanguíneo. A ascite, quando significativa, pode ser detetada no exame físico, com a observação de um abdómen pendular, e confirmada através da ecografia, que consegue detetar pequenas quantidades de líquido. Fez-se também a colheita deste líquido para citologia, para um tubo de EDTA. Este foi classificado consoante o seu teor em proteína expresso em g/dL e pela proporção de células nucleadas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ). Quanto aos tipos de efusões relevantes para este estudo, interessa esclarecer que o líquido foi denominado transudado puro quando o teor total de proteína era  $<2,5$  g/dL e o conteúdo celular  $<1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ , e transudado modificado quando o teor total de proteína era  $>2,5$  g/dL e o conteúdo celular  $<5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ , ambos característicos de ascite.

A EH foi detetada através de sinais neurológicos, muitas vezes relatados pelos detentores, como tremores, ataxia, apatia, *head pressing*, hipersíalia, convulsões, entre outros. A esta foi atribuída um grau consoante a Tabela 3, adaptada a MV por Gow (2017).

**Tabela 3 - Escala de Haven West para EH modificada (adaptado Gow 2017).**

Grau da HE	Sinais clínicos
0	Assintomático
I	Ligeira alteração na mobilidade, apatia ou ambos
II	Apatia acentuada, ligeira ataxia
III	Combinação de hipersíalia, ataxia grave, <i>head pressing</i> , cegueira, <i>circling</i>
IV	Estupor/coma, convulsões

As alterações da coagulação foram diagnosticadas através da medição do TP e TTPa, que se encontravam aumentados, e da contagem de plaquetas, que detetou tanto trombocitopenia como trombocitose nestes animais. Em alguns casos, foi feita ainda a medição do fibrinogénio, e num caso de suspeita de início de CID, realizou-se a medição dos dímeros-D. Também a ecografia foi um meio complementar para diagnóstico de alterações da coagulação, tendo sido utilizada para a deteção de trombose da veia esplénica num animal. A ulceração GI foi inferida através da presença de hematoquécia e melena, quer observada pelos detentores quer identificada durante a hospitalização.

### **2.3 Análise Estatística**

O tratamento dos dados obtidos a partir da análise dos registos clínicos foi processado recorrendo ao Microsoft® EXCEL. Foi realizada estatística descritiva para as seguintes variáveis: idade (anos), sexo, raça, peso (em kg), sinais clínicos (anorexia, letargia, vômito, diarreia, perda de peso, dor abdominal, etc.), hemograma (Hct, leucograma, plaquetas), análises bioquímicas (ALT, FAS, GGT, albumina, proteínas totais, bilirrubina, ácidos biliares, ureia, glucose), tempos de coagulação, culturas do fígado e VB, parâmetros ecográficos e histopatológicos e complicações (ascite, HP, EH, ulceração GI, etc.). As frequências e as percentagens foram calculadas para as variáveis categóricas. As médias e medianas com o desvio-padrão ou o intervalo, respetivamente, foram calculadas para as variáveis contínuas dependendo da distribuição de dados.

## **3 – Resultados**

### **3.1 Caracterização da amostra**

A amostra foi constituída por 19 canídeos: 15 fêmeas (78,9%), das quais 11 esterilizadas (73,3%), e 4 machos (21,1%), sendo 2 castrados (50%), como ilustra a Tabela 3. Dos casos incluídos no estudo, 63,2% (n=12) foram referenciados e 36,8% (n=7) casos de 1ª opinião.

**Tabela 4 - Tabulação cruzada entre género e estado reprodutivo**

		Esterilização		Total	
		Sim	Não		
Sexo	Macho	Freq.	2	2	4
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	Fêmea	Freq.	11	4	19
		%	73,3%	26,7%	100,0%
Total		Freq.	13	6	19
		%	68,4%	31,6%	100,0%

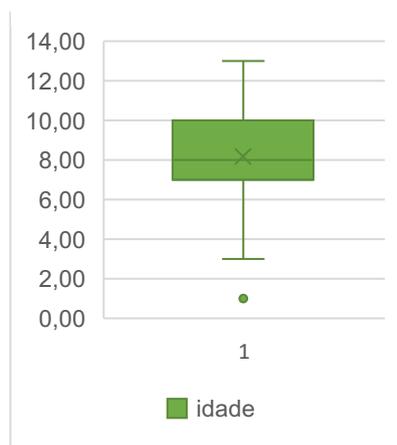
Em relação à raça dos animais, foram usadas como referência as raças reconhecidas pela *Fédération Cynologique Internationale*, cujo representante nacional é o Clube Português de Canicultura, que adota as suas denominações. Estão representadas 5 raças diferentes, para além da percentagem considerável de cães sem raça definida (SRD). Como observado na Tabela 5, dos cães incluídos no estudo, 42,1% (n=8) eram LR, 36,9% (n=7) SRD, 10,5% (n=2) pertenciam ao grupo Terrier (1 Fox terrier e 1 Jack Russel terrier) e os 2 restantes eram de outras raças (1 Teckel e 1 Whippet).

**Tabela 5 - Frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) da distribuição racial da amostra**

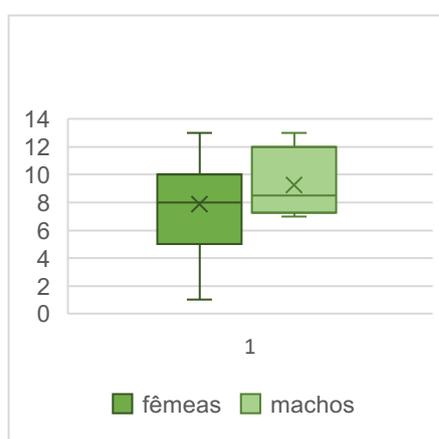
Raça	Frequência Absoluta (n)	Frequência Relativa (%)
Labrador retriever	8	42,1%
SRD	7	36,9%
terriers	2	10,5%
Outras	2	10,5%

Relativamente à idade, verificou-se que a idade média dos pacientes foi de 8,16 anos (1 a 13), com um desvio padrão 3,2 e mediana 8 anos, sendo que os machos se apresentaram tendencialmente com uma idade ligeiramente mais avançada, como mostra o gráfico 3, e os LR se apresentaram com idades tendencialmente mais jovens, como mostra o Gráfico 4.

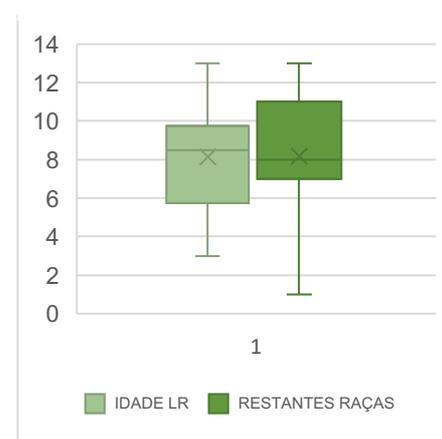
**Gráfico 4 - Distribuição de idades na amostra**



**Gráfico 3 - Distribuição de idades nos machos e fêmeas**



**Gráfico 2 - Distribuição de idades no LR comparativamente a outras raças**



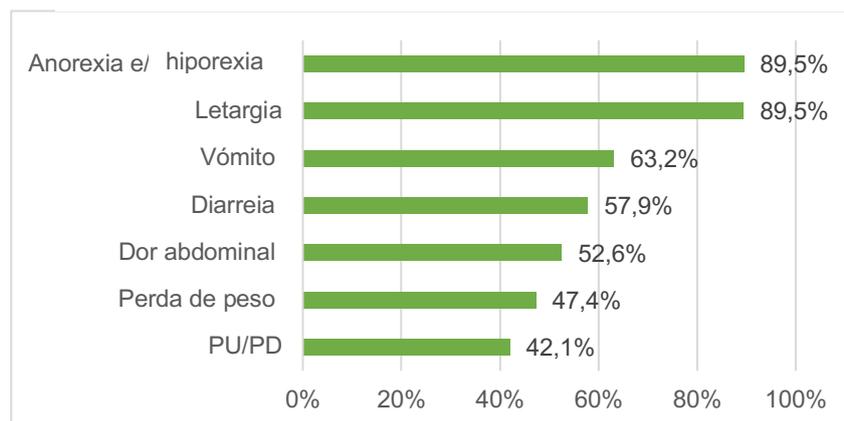
Quanto à condição corporal, 42,1% (n=8) dos canídeos foram descritos pelo Médico Veterinário que os avaliou como obesos, tendo condições corporais entre 6 e 9, enquanto 15,8% (n=3) se apresentaram caquéticos, com valores entre 1 e 3. Dos 8 cães considerados obesos, 6 eram LR.

Todos os cães eram alimentados com ração seca comercial. A média do peso foi 22,6kg (4,7 a 39,9), com um desvio padrão 11,1 e mediana de 23,4.

### 3.2 História e apresentação clínica

Na amostra foram identificadas comorbilidades em alguns cães, tais como: afeções ortopédicas crônicas em 26,3% (n=5), dermatite atópica em 21,1% (n=4), doenças oncológicas extra-hepáticas em 15,8% (n=3), epilepsia em 10,5% (n=2), hipotireoidismo em 5,3% (n=1), rinite alérgica em 5,3% (n=1) e doença renal crônica em 5,3% (n=1). Além disso, no historial clínico existia referência a um caso de obstrução do ducto colédoco resolvido após colocação cirúrgica de um *stent*.

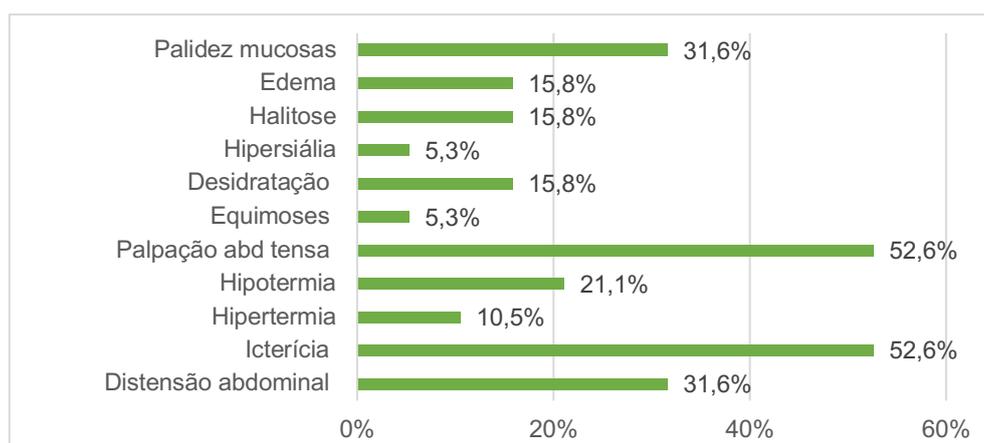
**Gráfico 5 - Frequência relativa da amostra em relação aos sinais clínicos registados na história clínica**



Os sinais clínicos mais frequentemente encontrados foram letargia e anorexia e/ou hiporexia, ambos presentes em 89,5% dos animais (n=17), seguidos de vômito em 63,2% (n=12), diarreia em 57,9% (n=11), dor abdominal em 52,6% (n=10) e perda de peso em 47,4% (n=9). Adicionalmente, 42,1% (n=8) apresentaram PU/PD (sendo que 2 destes 8 estavam sob corticoterapia), como mostra o Gráfico 5.

Os sinais mais comuns durante o exame físico foram palpação abdominal tensa e dolorosa, sobretudo no abdômen cranial, e icterícia, ambas detetadas em 52,6% (n=10) dos pacientes. Seguiu-se a palidez das mucosas, presente em 31,6% (n=6) da amostra, distensão abdominal noutros 31,6% (n=6), e hipotermia em 21,1% (n=4). Por sua vez, 15,8% (n=3) dos animais apresentaram edema (2 nos membros e 1 submandibular), desidratação (entre 2% e 7%) (n=3) e halitose (n=3). Adicionalmente, 10,5% (n=2) evidenciaram hipertermia. Por fim, 5,3% (n=1) apresentaram equimoses e, na mesma proporção, hipersialia. Todas as alterações do exame clínico estão ilustradas no Gráfico 6.

**Gráfico 6 - Frequência relativa da amostra em relação aos sinais apresentados no exame físico**



Nenhum animal se apresentou assintomático. Dos 8 sinais clínicos avaliados sistematicamente (presença de anorexia, letargia, perda de peso, vômito, diarreia, dor abdominal, icterícia e PU/PD), a média de sinais clínicos foi 4,8 (mínimo 1 e máximo 8) e a mediana 5. A distribuição do número de sinais clínicos por animal está exposta na Tabela 6.

**Tabela 6 - Distribuição do número de sinais clínicos sistêmicos na amostra**

<i>n</i> sinais	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)	% cumulativa
6	6	31,6	31,6
5	4	21,1	52,7
4	4	21,1	73,8
8	2	10,5	84,3
1	2	10,5	94,8
2	1	5,2	100,0
Total	19	100,0	

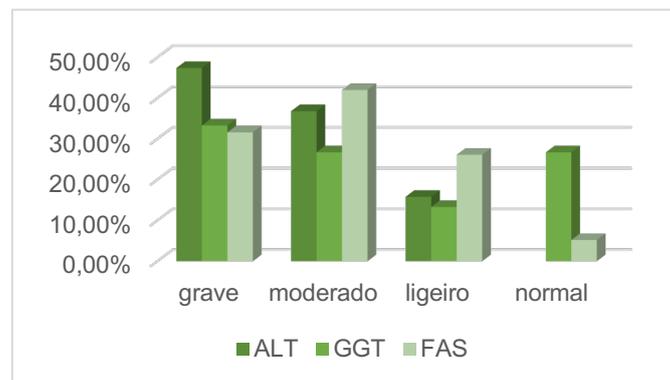
### 3.3 Análises laboratoriais

Relativamente ao eritrograma, 52,6% (n=10) dos pacientes apresentaram uma diminuição do Hct, sendo que em 42,1% (n=8) se tratava de uma anemia ligeira (Hct 30-37%), 5,3% (n=1) apresentavam uma anemia moderada (Hct 20-30%) e os outros 5,3% (n=1) anemia grave (Hct<20%). Quanto ao grau de regeneração, 42,1% (n=8) apresentaram uma anemia regenerativa, 5,3% (n=1) anemia pré-regenerativa, e os outros 5,3% (n=1) anemia não regenerativa. Os índices eritrocitários demonstraram uma anemia normocrômica e normocítica em 36,8% (n=7) dos pacientes, uma anemia normocrômica e microcítica em 10,5% (n=2) e uma anemia hipocrômica e microcítica em 5,3% (n=1). A média do Hct foi de 37,9±10,5%. Quanto ao leucograma, 52,6% (n=10) dos cães apresentaram leucocitose por neutrofilia, sendo que 10,5% (n=2) apresentavam desvio à esquerda. Por outro lado, o trombograma mostrou trombocitopénia sem agregação plaquetária (AP) em 21,1% dos animais (n=4) e trombocitose em 15,8% (n=3). Os tempos de coagulação, por sua vez, foram medidos em todos os animais, sendo que o TP estava significativamente aumentado (>1,5 vezes o limite superior de referência) em 21,1% dos casos (n=4) e ligeiramente aumentado

(<1,5 vezes o limite superior de referência) em 10,5% (n=2) e o TTPa mostrou-se significativamente aumentado em 15,8% (n=3) e ligeiramente aumentado em 21,1% dos canídeos (n=4). O fibrinogénio apenas foi medido em 15,8% (n=3) da amostra, tendo-se mostrado elevado em 5,3% (n=1) e baixo noutros 5,3% (n=1).

No que diz respeito às enzimas hepáticas, constava da ficha clínica de todos os animais os valores da ALT (marcador de lesão) e da FAS (marcador de colestase). A ALT mostrou-se elevada na totalidade da amostra, de forma ligeira em 15,8% dos animais (n=3), moderada em 36,8% (n=7) e grave em 47,4% (n=9). Em relação à FAS, observou-se um aumento ligeiro em 21,1% dos canídeos (n=5), moderado em 42,1% (n=8) e grave em 31,6% (n=6). Apenas 5,2% (n=1) tinham os valores dentro do intervalo de referência. Os valores de GGT encontravam-se disponíveis em 15 dos 19 animais, com 26,3% (n=5) a apresentarem valores dentro do intervalo de referência, 21,1% (n=4) um aumento ligeiro, 10,5% (n=2) um aumento moderado e 21,1% (n=4) um aumento grave.

**Gráfico 7 - Distribuição das elevações da ALT, GGT e FAS na amostra**



Relativamente aos marcadores de função hepática, os valores da albumina estavam disponíveis em toda a amostra, sendo que 57,9% (n=11) dos indivíduos apresentaram hipoalbuminémia e 42,1% (n=8) tinham os valores dentro do intervalo de referência. Já a concentração de proteínas totais estava apenas disponível relativamente a 16 dos 19 animais incluídos na amostra, sendo que cerca de 26,3% (n=5) se encontravam hipoproteinémicos e 57,9% (n=11) tinham os valores dentro da normalidade. A glucose foi medida em 16 dos 19 animais, em que 15,8% (n=3) apresentaram hipoglicémia e 10,5% (n=2) hiperglicémia. Já a ureia, mostrou-se diminuída em 21,1% (n=4) dos pacientes e elevada em 15,8% (n=3). Os valores de bilirrubina total estavam disponíveis em 14 dos 19 animais, tendo-se mostrado elevados em 52,6% (n=10) dos cães e normais em 21,1% (n=4), realçando que esses 52,6% apresentavam o plasma macroscopicamente icterico. Quanto aos ácidos biliares, estes foram medidos em 57,9% dos animais (n=11), encontrando-se elevados em 36,8% (n=7). Por fim, o valor do colesterol mostrou-se aumentado em 15,8% (n=3) dos canídeos, e os triglicéridos em apenas 5,3% (n=1), sendo que só existiam registos destes parâmetros em 21,1% (n=4) e 10,5% (n=2) dos cães, respetivamente. A suspeita de insuficiência hepática surgiu em 36,8%

(n=7) da amostra, uma vez que 7 animais tinham 3 ou mais marcadores da função hepática alterados e 84,2% (n=16) tinham pelo menos 1 marcador de função hepática alterado.

Quanto ao ionograma, foram detetadas as seguintes alterações eletrolíticas: hipocalémia em 26,3% (n=5), hiponatrémia em 15,8% (n=3) e hipercalémia em 10,5% (n=2).

**Tabela 7 - Estatística descritiva (mínimo, máximo e média ± desvio padrão) das enzimas hepáticas (ALT, FAS e GGT) e dos marcadores de função hepática (albumina, PTs, glucose, bilirrubina total, ácidos biliares e ureia) da amostra.**

		Mínimo	Máximo	Média ± Desvio Padrão
Enzimas hepáticas	ALT (U/L)	121,4	3678	1265,2 ± 943,2
	FAS (U/L)	129,6	4380,5	1528,8 ± 1235,2
	GGT (U/L)	1	320,4	60,1 ± 98,3
Marcadores de função hepática	Albumina (g/dL)	0,6	4,5	2,3 ± 0,8
	Proteínas Totais (g/dL)	4,4	10,5	6,2 ± 1,7
	Glucose (mg/dL)	57	165	95,6 ± 27,7
	Bilirrubina Total (mg/dL)	0,06	17,8	4,5 ± 5,2
	Ácidos biliares pré-prandiais (µmol/L)	<1	286,1	-----
	Ácidos biliares pós-prandiais (µmol/L)	<1	323	-----
	Ureia (mg/dL)	8,5	82	39,4 ± 19,9

Como ilustrado na Tabela 8, os valores de ALT, FAS e GGT são, em média, inferiores nos animais com cirrose. Por sua vez, a albumina, as proteínas totais, a bilirrubina e a ureia também se encontraram, em média, mais baixas nos animais com cirrose.

**Tabela 8 - Comparação da média e desvio padrão das enzimas hepáticas e marcadores de função de animais cirróticos vs não cirróticos**

	Sem cirrose	Cirrose
ALT (U/L)	1444,7 ± 1126,1	1103,5 ± 768,7
FAS (U/L)	1700,7 ± 1313,5	1374,0 ± 1209,0
GGT (U/L)	65,3 ± 106,7	54,1 ± 24,4
Albumina (g/dL)	2,5 ± 0,8	2,09 ± 0,7
PT (g/dL)	6,4 ± 2,1	6,0 ± 1,2
Bilirrubina (mg/dL)	7,6 ± 6,8	2,4 ± 2,6
Ureia (mg/dL)	32,4 ± 14,3	30,1 ± 23,9

A urina tipo II não foi consistentemente efetuada, tendo sido realizada em 47,4% (n=9) da amostra. Na análise macroscópica, detetou-se uma coloração alaranjada em 21,1% (n=4) dos cães. Relativamente à densidade urinária, 5,3% (n=1) dos cães revelaram isostenúria (entre 1008 e 1012) e 26,3% (n=5) tinham a urina inapropriadamente concentrada (entre 1012 e 1035). Em 21,1% (n=4) dos animais detetou-se bilirrubinúria relevante (a partir de 2+), sendo

os mesmos que tinham a urina alaranjada. Proteinúria foi detetada em 15,8% (n=3). No exame microscópico foram encontrados cristais de biurato de amónia num animal.

### **3.4 Exame ecográfico**

Todos os animais tinham um relatório ecográfico disponível na sua ficha clínica. Foram encontradas alterações hepáticas difusas na totalidade da amostra, sendo que o resultado foi sugestivo de HCC/cirrose em 47,4% (n=9). Relativamente ao tamanho, 42,1% (n=8) revelaram microhepatia e 31,6% (n=6) hepatomegália, enquanto os 26,3% (n=5) restantes apresentaram o fígado normodimensionado. Quanto à ecogenicidade, 26,3% (n=5) da amostra apresentou-se hiperecogénico em relação ao baço, 26,3% (n=5) ecogenicidade mista, alternando zonas hiperecogénicas com zonas hipoecogénicas, e 10,5% (n=2) hipoecogénico, sendo que os restantes 36,8% (n=7) não apresentaram qualquer alteração da ecogenicidade. A ecotextura foi descrita como heterogénea, com aspeto marmoreado em 84,2% (n=16) dos cães. Interessa realçar que 42,1% (n=8) se encontravam com as margens irregulares, sendo que 10,5% (n=2) apresentavam aspeto nodular à superfície. A adenomegália portal foi outro achado frequente, presente em 36,8% (n=7) dos animais.

A ecografia detetou ainda sinais de HP em 31,6% (n=6) dos pacientes, sendo que o mais frequente foi a presença de líquido abdominal livre. Adicionalmente, em 15,8% (n=3) foi possível observar a veia gonadal esquerda por dilatação luminal secundária à HP, em 10,5% (n=2) neovascularização ao redor da VP (APSS), em 10,5% (n=2) identificou-se redução da velocidade do fluxo da VP, com redução brusca do seu diâmetro na zona do hilo e noutros 10,5% (n=2) a VB encontrava-se edemaciada. Relativamente à VB, em 36,8% (n=7) dos canídeos visualizou-se sinais de colecistite, sendo o espessamento da sua parede o sinal comum a todos estes animais. Adicionalmente, observou-se a presença de lamas biliares em 21,1% (n=4) da amostra, litíase biliar em 10,5% (n=2) e estase biliar noutros 10,5% (n=2).

### **3.5 Citologia, Histopatologia e Cultura hepáticas**

A citologia hepática foi realizada em apenas 42,1% (n=8) da população, sendo que em 21,1% (n=4) o resultado foi inconclusivo, em 10,5% (n=2) foi compatível com neoplasia hepática, em 5,3% (n=1) foi descrita uma hepatite tóxica com acumulação de bilirrubina e em 5,3% (n=1) foi compatível com uma alteração inflamatória, ainda que inespecífica.

Contrastando com os resultados da citologia disponíveis, o diagnóstico histopatológico foi compatível com HCC na totalidade dos 19 casos incluídos no estudo.

Começando pelo tipo de inflamação, presente em todos os espécimes, o achado mais comum foi um infiltrado linfoplasmocitário, em 42,1% da amostra (n=8). Os restantes divergiram no tipo de infiltrado, estando descritos infiltrados mistos (neutrófilos, linfócitos e macrófagos, sem predominância de nenhum componente) em 15,8% (n=3), infiltrados granulomatosos (predominância de macrófagos) em 10,5% (n=2) e infiltrado piogranulomatoso (macrófagos e neutrófilos em igual proporção) em 5,3% (n=1). Em 26,3%

(n=5) da amostra não foi descrito pelo histopatologista o tipo de infiltrado inflamatório presente. Quanto à localização do infiltrado inflamatório, esta foi portal/periportal, embora só se encontrasse descrita em 42,1% (n=8) da amostra. Relativamente à FH, também se observou em todas as amostras biopsadas, de forma marcada em 57,9% (n=11), moderada em 36,8% (n=7) e ligeira a moderada em 5,3% (n=1), sendo que 42,1% (n=8) dos animais apresentavam cirrose. Tal como na localização do infiltrado inflamatório, a localização da FH só foi discriminada em 57,9% da amostra, sendo predominantemente periportal, 47,4% (n=9) e intersticial nos restantes 10,5% (n=2). A necrose e/ou apoptose hepatocitária também se revelaram presentes em 100% (n=19) da amostra, mas não foram caracterizadas quanto à sua extensão, localização ou grau, nos relatórios disponíveis. Para além destas características-chave para o diagnóstico de hepatite crónica, também outras referidas na literatura se encontravam descritas, nomeadamente a presença de hiperplasia ductal em 31,6% (n=6) dos canídeos e distorção da arquitetura lobular em 36,8% (n=7). Observou-se ainda vacuolização hepatocitária em 52,6% (n=10) dos espécimes hepáticos, congestão sinusoidal em 15,8% (n=3), hematopoiese extramedular em 5,3% (n=1) e peliose em 5,3% (n=1). Detetou-se ainda a acumulação de lipofuscina no interior dos macrófagos em 21,1% (n=4), de hemossiderina em 10,5% (n=2) e de pigmento biliar intracelular em 5,3% (n=1). Foi ainda identificada colestase e sobrecarga metabólica, individualmente, em 10,5% (n=2).

Relativamente ao rastreio de cobre através da coloração com rodanina, este foi realizado em 42,1% (n=8) da população, tendo resultado positivo em 26,3% (n=5). Segundo a sua localização predominante, em 10,5% (n=2) esta era centrilobular (Zona 3), sendo compatível com CuHC primária, e nos restantes 15,8% (n=3) centroacinar (Zona 1), correspondendo a CuHC secundária. A quantificação de Cu só foi realizada num destes canídeos, tendo sido 152mg/kg ps, concordante com a suspeita de retenção secundária (<1000mg/kg) sugerida pela localização centroacinar.

**Tabela 9 - Principais alterações histopatológicas encontradas nos canídeos com HCC**

Categoria	Tipo	n
Grau de fibrose	Ligeira	1
	Moderada	7
	Grave	11
	Terminal (cirrose)	8
Infiltrado inflamatório	Linfoplasmocitário	8
	Granulomatoso	3
	Piogranulomatoso	2
	Misto	1
Distorção arquitetura lobular	Presente	7
	Ausente	12
Hiperplasia ductos biliares	Presente	6
	Ausente	13

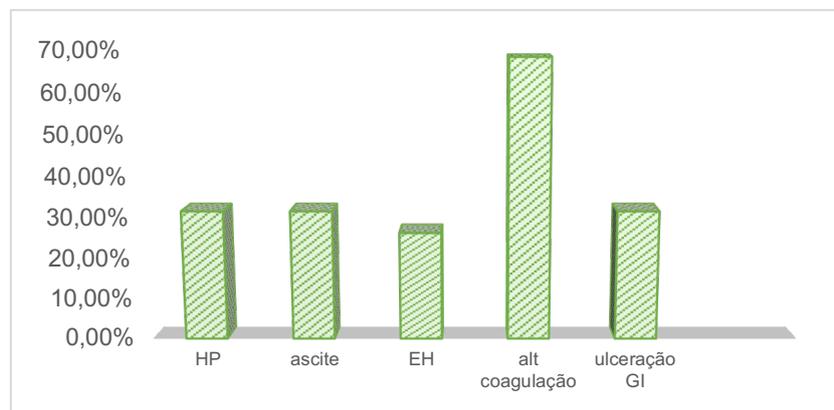
Acumulação de cobre	Primária (centrilobular)	2
	Secundária (centroacinar)	3

A cultura do parênquima hepático só foi realizada em 21,1% (n=4) da população, tendo resultado negativa em todas as amostras. No caso da bÍlis, a cultura foi realizada em 36,8% (n=7) dos casos, com resultado positivo em 15,8% (n=3). Foram isolados os seguintes organismos: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Kocuria kristinae*.

### 3.6 Complicações e comorbilidades identificadas

Tanto na apresentação clínica como durante o internamento foram detetadas complicações associadas à HCC, ilustradas no Gráfico 8.

**Gráfico 8 - Frequência relativa das complicações associadas à HCC presentes na amostra.**



Tal como ilustrado, as mais frequentes foram alterações da coagulação, presentes em 68,4% (n=13) dos animais, que incluíram elevações nos TP e TTPa em 42,1% (n=8), trombocitopénia sem AP em 21,1% (n=4), trombocitose em 15,8% (n=3), suspeita de CID em 5,3% (n=1), com elevação do valor dos Dímeros-D e deteção de equimoses em 5,3% (n=1). Houve ainda um caso de trombose da veia esplénica e um sangramento gengival espontâneo.

Por sua vez, sinais compatíveis com ulceração GI, HP e ascite, estiveram presentes em 31,6% (n=6) da amostra. Os indicadores de ulceração GI traduziram-se pela presença de melena em 21,1% (n=4) e hematoquécia em 10,5% (n=2). Por sua vez, os sinais sugestivos de HP foram observados tanto na ecografia, como na histopatologia, como mencionado anteriormente nos pontos 3.4 e 3.5. A ascite, que é uma consequência direta da HP, foi detetada tanto visualmente, pela presença de distensão abdominal, como ecograficamente, através da visualização de líquido abdominal anecogénico. Dos 6 animais ascíticos, encontrava-se disponível o resultado da análise do líquido em 26,3% (n=5), sendo que, 15,8% (n=3) possuíam características de transudado puro e 10,5% (n=2) de transudado modificado. Adicionalmente, 26,3% (n=5) dos cães evidenciaram sinais de EH, entre eles: tremores em 5,3% (n=1), ataxia em 10,5% (n=2), hipersíalía em 5,3% (n=1), *head pressing* em 5,3% (n=1), apatia em 10,5% (n=2) e convulsão em 5,3% (n=1). Entre estes, 2 foram classificados com EH grau I, apresentando apatia e ligeira dificuldade na locomoção devido a tremores/ataxia ligeira; outros 2 foram classificados como EH Grau III, por presença de *head pressing* e ataxia

acentuada num caso, e hipersialia e apatia profunda noutro; e por último, o restante animal foi classificado como exibindo EH Grau IV por episódio de convulsão, segundo a Tabela 3, presente no ponto **2.2.3 Complicações**.

Conclui-se que 78,9% (n=15) dos pacientes apresentavam pelo menos uma complicação da HCC. Relativamente às comorbilidades encontradas nos animais da amostra durante os exames complementares de diagnóstico, 36,8% (n=7) manifestaram sinais de pancreatite e outros 36,8% (n=7) colangite/colecistite.

### **3.7 Etiologia**

A maioria dos casos foi considerada idiopática. Em nenhum caso foi detetado um agente infeccioso. Em apenas 2 LR foi obtido o diagnóstico definitivo de CuHC primária.

Relativamente a suspeita de etiologia medicamentosa, dos dois cães epiléticos, um deles, com 8 anos, estava medicado com fenobarbital desde os 5 meses e, no controlo, a dose sanguínea encontrava-se acima da dose terapêutica, tendo sido colocada a hipótese de o seu potencial efeito hepatotóxico ter contribuído para o desenvolvimento de HCC neste animal. Da mesma forma, um dos animais com problemas ortopédicos tinha registo de administrações intermitentes de carprofeno. Por fim, um cão fez quimioterapia para o tratamento de um mastocitoma cutâneo. Apesar de não estar especificado na ficha do animal qual foi o protocolo quimioterápico, a lomustina é frequentemente utilizada no tratamento de mastocitomas e está descrita como potencial agente etiológico de HCC (Heading et al. 2011).

Quanto a possível etiologia imunomediada, ainda não foram desenvolvidos exames de diagnóstico para a sua confirmação nos cães. Dentro dos critérios sugestivos de componente imunomediada possíveis de avaliar neste estudo, é de realçar um caso que incluía todos eles: doença com componente imunomediada concomitante (dermatite atópica), ser fêmea, ter um infiltrado linfoplasmocitário e resposta favorável à corticoterapia, tendo levantado uma forte suspeita de HCIM. Dos restantes, 15,8% (n=3) integravam 2 dos 4 critérios avaliados neste estudo e 57,9% (n=11) preenchiam apenas 1 critério. Resumindo, 78,9% (n=15) da amostra apresentava pelo menos um critério associado a doença imunomediada. Realça-se a melhoria clínica em 36,8% (n=7) dos animais após corticoterapia e a presença de comorbilidades associadas ao sistema imunitário em 26,3% (n=5) (3 dermatite atópica, 1 dermatite atópica associada a rinite alérgica e 1 suspeita de anemia hemolítica imunomediada).

Apesar das suspeitas, não foi possível comprovar nenhuma etiologia medicamentosa nem imunomediada, pelo que 89,5% (n=17) dos casos foram considerados idiopáticos.

### **3.8 Tratamento e evolução clínica**

Existem registos de hospitalização em 84,2% (n=16) da população. Dos animais hospitalizados para estabilização clínica, todos beneficiaram de fluidoterapia. Em 68,4% (n=13) o fluido de manutenção utilizado foi Lactato de Ringer (Braun), e em 15,8% (n=3) uma

solução de NaCl 0,9% (Braun). Destes 15,8%, 10,5% (n=2) foram suplementados com KCl 7,45% (Braun) e 5,3% (n=1) com glucose G-5% (Braun).

Relativamente ao manejo da dor, a 31,6% (n=6) dos canídeos foram administrados analgésicos. Em 10,5% (n=2) foi necessária uma combinação de metadona (Semfortan® 10 mg/ml) e buprenorfina (Bupaq® Multidose 0,3 mg/ml) e em 5,3% (n=1) apenas metadona. Em casa, 10,5% (n=2) receberam tramadol (Tralieve®) e outros 10,5% (n=2) fentanil (Durogesic®). Como terapêutica antiemética, 63,2% (n=12) foram medicados com maropitant (Cerenia®) e, em 21,1% (n=4) foi necessária a adição de metaclopramida (Primperan®). Em 26,3% (n=5) foi necessária a colocação de um tubo de esofagotomia. A terapêutica para prevenção de ulceração GI envolveu a administração de omeprazol em 63,2% (n=12), sucralfato (Ulcermin®) em 36,8% (n=7) e famotidina (Lasa®) em 26,3% (n=5), sendo que em 15,8% (n=3) dos animais foram administrados omeprazol e famotidina em simultâneo.

Para o manejo de alterações na coagulação, foi utilizada vitamina K em 26,3% (n=5) da população. Quanto à hipoalbuminemia, foi administrado PFC e albumina humana em 5,3% (n=1). Nos animais que apresentaram ascite, a espironolactona (Aldactone®) foi adicionada ao tratamento em 21,1% (n=4) dos animais. Para prevenção ou gestão da EH foi usada lactulose (Laevolac®) e metronidazol (Metrobactim®) em 21,1% (n=4) dos pacientes. Nos animais com critério para antibioterapia, a combinação amoxicilina + ácido clavulânico com metronidazol foi a mais recomendada, em 31,6% (n=6), sendo que em 21,1% (n=4) se adicionou enrofloxacina (Baytril®). Relativamente à corticoterapia (Prednicortone®), esta foi prescrita a 63,2% (n=12) dos canídeos. A colchicina foi utilizada em 5,3% (n=1).

Quanto à suplementação com antioxidantes, o suplemento utilizado foi especificado em 73,7% (n=14) da amostra. Assim, está registado o uso de suplementos com uma combinação de SAME e silibina [Zentonyl® *advanced* em 36,8% (n=7), WePatic® em 21,1% (n=4) e Samylin® em 5,3% (n=1)] e silimarina (Legalon®) em 10,5% (n=2). Adicionalmente, 52,6% (n=10) beneficiaram da toma de ácido ursodesoxicólico (Ursofalk®).

A todos os animais foi recomendada uma transição para uma dieta hepática ou hipoalergénica, pobre em ácidos aminados, com proteína de alta qualidade, sendo que em 42,1% (n=8) esta recomendação foi seguida pelos donos.

Nos casos de CuHC primária, o tratamento foi uniforme: restrição de cobre para a vida (Purina HP ou Hill's I/d) e um quelante, tendo sido prescrita DPA nos 10,5% (n=2) da população diagnosticada e, posteriormente, transição para gluconato de zinco.

Dos cães incluídos neste estudo, 36,8% (n=7) morreram, sendo que 31,6% (n=6) foram eutanasiados por causas associadas à HCC e 5,3% (n=1) sucumbiram durante o internamento. Por outro lado, 21,1% (n=4) estabilizaram com o tratamento e em 42,1% (n=8)

perdeu-se o seguimento, provavelmente pelo grande número de casos referenciados, que voltaram ao veterinário assistente após estabilização no HEV e/ou por terem morrido.

#### **4 – Discussão**

O presente estudo de caráter retrospectivo analisou detalhadamente a apresentação clínica de pacientes com HCC. Na grande maioria, as anomalias na história, exame clínico, análises laboratoriais, exame ecográfico, histopatologia e complicações associadas, encontram-se em concordância com os documentados na literatura. Por vezes, a incidência dos sinais clínicos, a elevação das enzimas e/ou marcadores de função hepática e as complicações mostraram-se superiores aos da bibliografia, o que se pensa ser justificado por um conjunto de fatores: a grande percentagem de casos referenciados (63,2%), que indica que a doença já poderia estar em desenvolvimento há algum tempo; a inexistência de animais assintomáticos; a elevada média de sinais clínicos por doente (4,8 sinais); a percentagem de animais com suspeita de insuficiência hepática (36,8%) pela presença de alteração de 3 ou mais marcadores de função, remetendo para uma perda de parênquima funcional de 70 a 80%; a percentagem de animais que apresentaram FH marcada e/ou cirrose (57,9%); a percentagem de animais que apresentaram pelo menos uma complicação da doença (78,9%). Estes fatores indicam que a maioria dos animais se apresentava numa fase avançada da doença, alguns com alterações irreversíveis do parênquima e da circulação portal, podendo estar sobrerrepresentados face aos animais em estádios iniciais da doença, levando a uma sobrestimação de alguns destes sinais clínicos e analíticos.

##### **4.1 Caracterização da amostra**

À apresentação clínica os canídeos eram sobretudo de meia-idade a idosos, tendo sido a idade média aproximadamente 8,16 anos, indo de encontro a estudos anteriores (Bexfield 2012; Hirose et al. 2014; Ullal et al. 2019). Os LR apresentaram-se com idades ligeiramente mais jovens (média 8,12), em concordância com uma coletânea de estudos que demonstra que a média de idades nesta raça é inferior à média geral (Webster et al. 2019). O género feminino está sobrerrepresentado, como já reportado previamente (Boisclair et al. 2001; Poldervaart et al. 2009), com um rácio fêmea/macho aproximadamente de 3,75:1. Na literatura, várias são as raças identificadas como tendo predisposição feminina, entre elas os LR (Andersson and Sevelius 1991; Hoffman et al. 2006; Smedley et al. 2009; Bexfield et al. 2012; Fieten et al. 2014; Hirose et al. 2014; Webster et al. 2019), o que está de acordo com os resultados deste estudo, em que entre os 9 LR presentes, 5 eram do sexo feminino, com um rácio fêmea/macho 1,7:1. Também os LR se encontram sobrerrepresentados neste estudo, constituindo a maioria relativa da amostra, seguindo-se os cães SRD, os Terriers (1 Jack Russell terrier e 1 Fox terrier), e os restantes pertencentes a outras raças (1 Whippet e 1 Teckel). Estudos anteriores mencionam a predisposição dos LR (Poldervaart et al. 2009; Bexfield 2012; Favier et al. 2013; Hille Fieten et al. 2013; Dirksen and Fieten 2017) e de vários

terriers, entre eles, os Jack Russell (Andersson and Sevelius 1991; Watson et al. 2011; Bexfield 2012). Foi também detetada uma elevada incidência de colangiohepatite crónica em Teckels machos, no Japão, o que pode estar relacionado com a presença de um Teckel do sexo masculino neste estudo, que também apresentava colangite concomitante com a HCC (Hirose et al. 2014). A grande proporção de cães SRD nesta amostra pode ser explicada pela maior popularidade das raças nos diferentes países onde foram realizados os estudos, especialmente no RU. Das raças identificadas neste estudo, apenas os Whippet não estão descritos como potencialmente predispostos para HCC na literatura. Contudo, estudos anteriores provaram que a predisposição racial pode variar consoante a localização geográfica e ao longo do tempo, devido a fatores genéticos e ambientais, podendo ser a explicação para o aparecimento desta raça. Não existir nenhum estudo realizado previamente em Portugal relativamente à distribuição racial da HCC e o tamanho reduzido da amostra, impossibilitam tirar uma conclusão deste achado.

#### **4.2 História e apresentação clínica**

Os sinais clínicos iniciais foram inespecíficos, o que vai de encontro com a bibliografia (Poldervaart et al. 2009; Bexfield 2017; Webster et al. 2019). Os mais prevalentes foram a anorexia/hiporexia (89,5%) e a letargia (89,5%), estando de acordo com outros autores. No entanto, segundo uma meta-análise de 15 estudos, a sua prevalência está na ordem dos 61% e 56%, respetivamente (Webster et al. 2019). Já num estudo de Kanemoto et al. (2013), a inapetência surgiu em 84,6% dos canídeos. Esta discrepância pode dever-se ao facto de os animais presentes nos diversos estudos estarem em fases diferentes da doença, sendo que, nesta amostra, uma grande parte dos canídeos mostrava sinais de doença avançada e insuficiência hepática. A anorexia pode indicar ulceração GI grave ou EH subclínica, podendo ser um indicador de insuficiência hepática e mau prognóstico. Para além de malnutrição do paciente, piorando o seu estado clínico, pode levar à decisão de eutanásia (Shih et al. 2007). A estes, seguiram-se o vómito (63,2%), diarreia (57,9%), dor abdominal (52,6%), icterícia (52,6%), perda de peso (47,4%) e PU/PD (42,1%). Também estes se apresentaram com uma frequência superior a outros estudos, o que está provavelmente relacionado com a fase avançada da doença destes animais, com grande percentagem de complicações instaladas. A icterícia é uma consequência visual da hiperbilirrubinémia, que surge quando os níveis de bilirrubina excedem os 2 mg/dL. A perda de peso pode ser justificada pela diminuição do consumo de nutrientes, como resultado da inapetência e do aumento do catabolismo tecidual (Elhiblu et al. 2015). A PU/PD, assim como a urina isostenúrica/inapropriadamente concentrada detetada em alguns animais, pode ser explicada pela diminuição do metabolismo do cortisol, por alteração dos osmoreceptores da VP, perda do gradiente de concentração da medula renal e/ou encefalopatia, na sequência da presença de insuficiência hepática. A presença de PU/PD está descrita em cães com cirrose (Elhiblu et al. 2015). Contudo, nos

cães que se encontravam sob o efeito de corticoterapia (2 em 8) na altura da sua deteção, esta pode ser a explicação para a sua ocorrência.

No exame físico, grande parte dos animais apresentou condições corporais elevadas, na maioria LR. Embora ainda não esteja estabelecida uma relação entre a obesidade e a HCC, já tinham sido descritas condições corporais elevadas em LR com HCC (Shih et al. 2007). A halitose, presente em 15,8% da amostra, também já foi associada à presença de cirrose (Elhiblu et al. 2015), a par com a desidratação clínica, também presente em 15,8% dos canídeos avaliados neste estudo. Tanto a hipotermia como a hipertermia foram encontradas numa pequena percentagem da amostra, não estando diretamente associadas à HCC na literatura. A hipotermia poderá ser consequência da administração de sedativos para a realização da biópsia hepática, de anorexia prolongada e/ou do estado crítico do animal. Acresce o facto de idosos (a maioria neste estudo) estarem predispostos a apresentar temperaturas mais baixas. A hipertermia, por sua vez, parece ser justificada pela presença concomitante de colangite e/ou colecistite. Além disto, num dos casos, o infiltrado encontrado na histopatologia era granulomatoso, estando descrita a maior probabilidade de apresentarem febre os canídeos com este tipo de infiltrado (Webster et al. 2019). A distensão abdominal e o edema observados estão associados à presença de líquido abdominal, uma complicação da HCC decorrente da presença de HP, cuja incidência está de acordo com a reportada na bibliografia, cerca de 32% (Webster et al. 2019). A palidez das mucosas ilustra a anemia presente, que vai ser abordada no próximo tópico, ou HP.

### **4.3 Exames complementares de diagnóstico**

#### **4.3.1 Análises laboratoriais**

Semelhante aos resultados de diversos estudos, recolhidos por Webster et al. (2019), surgiram anemia, leucocitose e trombocitopenia nos cães incluídos neste estudo.

A anemia presente pode ser a clássica anemia secundária a doença crónica, ou consequência da maior fragilidade dos eritrócitos devido a elevadas concentrações sanguíneas de ácidos biliares (Elhiblu et al. 2015). Pode ainda ser consistente com a presença de ulceração GI secundária a HP e edema intestinal, no caso do animal que apresentou uma anemia não regenerativa hipocrómica e microcítica, típica desta situação, ou uma consequência de uma potencial coagulopatia em curso. Nesta amostra, cerca de metade (52,6%) dos cães apresentou anemia, sendo que a maioria (42,1%) apresentou uma anemia ligeira, que é o expectável na HCC (Webster et al. 2019). Esta prevalência vai de encontro aos 52,4% identificados por Poldervaart et al. (2009). A elevada incidência de anemia é concordante com a elevada incidência de complicações presentes nestes animais, entre elas coagulopatias e ulceração GI, com consequente presença de melena e hematoquezia. A microcitose normalmente acompanha os APSS (James et al. 2008), o que foi constatado num caso da nossa amostra que apresentou microcitose e neovascularização.

A leucocitose com neutrofilia é explicada pela resposta inflamatória do organismo à hepatite e/ou pelo stress. Nesta amostra esta foi identificada em 52,6% dos cães, à semelhança da incidência relatada por Poldervaart et al. (2009). Concordante com os resultados de Shih et al. (2007), 2 animais apresentaram desvio à esquerda, provavelmente justificado pela estimulação da produção e libertação de neutrófilos maduros e imaturos pelas citoquinas inflamatórias presentes devido à hepatite.

Relativamente ao trombograma, estima-se que a prevalência da trombocitopénia em animais com HCC ronde os 23%, o que vai ao encontro dos resultados deste estudo (21,1%) (Shih et al. 2007; Elhiblu et al. 2015). Existem vários mecanismos sugeridos para a sua ocorrência, entre os quais, diminuição da produção de trombopoietina pelo fígado, aumento da destruição de plaquetas devido à presença de auto-anticorpos e/ou aumento do consumo devido à presença de CID. Outro mecanismo, descrito nos humanos, é o aumento do sequestro de plaquetas pelo baço (hiperesplenismo), em resultado da esplenomegália secundária à HP, no entanto, o hiperesplenismo ainda não foi associado à HCC (Buob et al. 2011). A trombocitose, presente em 15,8% dos animais, também já foi descrita em animais com diagnóstico de HCC (Shih et al. 2007; Elhiblu et al. 2015), contudo, parece não estar diretamente relacionado com a doença. Pode ser considerado fisiológico em animais idosos, o que pode explicar esta alteração, uma vez que grande parte da população corresponde a canídeos de idade avançada. Pode, por outro lado, ser uma resposta ao stress, ou uma reação à inflamação ou hemorragia crónica (Gough et al. 2015).

O aumento ligeiro a moderado dos tempos de coagulação, TP e TTPa, está retratado em cerca de 42% dos animais com HCC (Webster et al. 2019), à semelhança do que aconteceu nesta amostra (42,1%). Este aumento reflete presumivelmente uma falha na sua síntese ou uma deficiência em vitamina K (Kavanagh et al. 2011), consequência da destruição de parênquima hepático funcional. Segundo alguns estudos, o fibrinogénio encontra-se diminuído em 60% dos animais afetados (Prins et al. 2010; Fry et al. 2017), especialmente em raças como os LR (Kavanagh et al. 2011), uma vez que é também produzido pelos hepatócitos. Nesta amostra o fibrinogénio não foi consistentemente avaliado, tendo apenas sido medido em 3 animais, e apenas 1 cão (LR) o apresentou diminuído. Apesar deste animal corresponder a um terço dos avaliados para este efeito, não está, ainda assim, de acordo com os valores apresentados na bibliografia. No entanto, a inconsistência da sua medição e o número diminuído da amostra impossibilitam a análise credível destes resultados. As alterações da coagulação vão ser novamente abordadas mais à frente, no tópico **4.6 Complicações e comorbilidades**.

Relativamente à enzimologia hepática, todos os cães apresentaram elevação da atividade de uma ou mais enzimas hepatobiliares, sendo que mais de metade apresentou elevação de todas. A ALT encontrou-se aumentada na totalidade dos canídeos, o que reforça

a ideia de ser o teste de rastreio de eleição para a deteção de HCC (Webster et al. 2019). Apesar disto, todos os cães se apresentaram sintomáticos, o que impediu a avaliação da sua sensibilidade para detetar HCC subclínica. O padrão de distribuição destas elevações correspondeu ao característico das doenças primárias do fígado, com ALT>FAS. Tal como expectável, os animais cirróticos tinham os valores da ALT tendencialmente mais baixos, dando lugar a aumentos aparentemente ligeiros, o que se explica pela destruição do parênquima hepático e a sua substituição por tecido fibroso nestes pacientes. A maioria dos animais, no entanto, apresentou um aumento grave (>10 vezes o limite de referência superior), o que aponta para lesão primária do fígado. Por sua vez, a FAS encontrava-se aumentada em 94,8% da população, uma percentagem que vai de encontro aos 84%±16%, documentados por Webster et al. (2019). Também a GGT se apresentou aumentada em 52,5% da população, indo de encontro com os 61%±12 registados por Webster et al. (2019).

A hiperbilirrubinémia é explicada pela lesão hepatocitária e consequente diminuição da eliminação de bilirrubina, tendo sido detetada em 52,6% dos canídeos, à semelhança dos 50% descritos por Gómez et al. (2014). Este é um fator de prognóstico negativo, o que é compatível com o número de cães eutanasiados neste estudo que apresentavam a bilirrubina elevada (5 de 6), embora não se tenha realizado nenhuma associação estatística pelo elevado número de animais cujo seguimento foi perdido. Destes, 21,1% apresentou bilirrubinúria e urina de cor alaranjada, sinais já anteriormente associados a HCC (Bexfield 2017). A hipoalbuminémia está associada a insuficiência hepática, uma vez que o fígado é o local da sua síntese. No entanto, é um marcador de função tardio, uma vez que este órgão contém uma grande reserva desta proteína. O facto de 57,9% dos cães apresentarem a albumina baixa ilustra o grau avançado de doença presente na maioria dos animais incluídos neste estudo, não sendo discrepante com os 49%±19% relatados por Webster et al. (2019) após uma análise de 15 estudos. Também a hipoproteinemia foi identificada na amostra, mais uma vez retratando a diminuição da capacidade de síntese do fígado, corroborando estudos anteriores (Poldervaart et al. 2009; Elhiblu et al. 2015). Tanto os valores de albumina como das proteínas totais encontraram-se mais baixos nos animais cirróticos, como expectável, uma vez que estes animais estão numa fase terminal da doença, com a maior parte do parênquima hepático transformado em tecido fibroso, não funcional e, portanto, incapaz de produzir proteínas. A hipoalbuminémia faz também parte da lista de fatores de mau prognóstico e estava presente em 4 dos 6 animais eutanasiados. A hipoglicémia apareceu em 15,8% da população, embora na bibliografia seja documentada como rara e mais frequente em casos de insuficiência hepática aguda (Webster et al. 2019). O facto de três animais a terem desenvolvido poderá ser explicado pela anorexia total prolongada, em que alguns se encontravam, ou por causas relacionadas diretamente com uma diminuição da função hepática, como uma redução das reservas de glicogénio, atraso na *clearance* de insulina ou

diminuição da gliconeogénese (Chapman and Hostutler 2013). A hiperglicemia, presente em 10,5%, não está diretamente associada à HCC na literatura, podendo a sua presença ser atribuída ao stress da hospitalização, uma vez que estes animais não apresentavam nenhuma outra comorbilidade que a justificasse, ou a uma diminuição da sua absorção na circulação portal, pelo fígado (Chapman and Hostutler 2013). Segundo a literatura, uma diminuição da ureia e do colesterol desenvolve-se em cerca de  $40\% \pm 29\%$  e  $40\% \pm 12$  de animais com HCC, respetivamente, sendo mais comum em animais cirróticos (Webster et al. 2019). Neste estudo, a ureia encontrava-se diminuída em 21,1% da população, sendo que, em média, os animais com cirrose apresentaram valores mais baixos, corroborando estudos anteriores (Elhiblu et al. 2015). Por outro lado, a ureia encontrou-se elevada em 15,8% dos animais, podendo este facto ser justificado por alterações renais presentes nestes canídeos ou por presença concomitante de hemorragia GI. Já o colesterol foi medido apenas em 4 animais, sendo que em 3 se mostrou aumentado, ao contrário do esperado na HCC segundo a bibliografia supramencionada. No entanto, num estudo recente, Assawarachan et al. (2021) detetaram uma concentração de colesterol sanguínea significativamente superior em cães com HCC, comparativamente aos cães saudáveis, bem como dos triglicéridos. No nosso estudo a concentração dos triglicéridos foi apenas medida em dois animais, encontrando-se elevada num deles. A relação causa-efeito entre a hiperlipidémia e a HCC ainda não foi estabelecida, no entanto pensa-se que o papel central do fígado no metabolismo lipídico possa ser a base da sua explicação (Assawarachan et al. 2021). A hipertrigliceridémia em pacientes com doença hepática poderá ser o resultado de um aumento da produção de lipoproteínas ricas em triglicéridos ou diminuição do catabolismo dos triglicéridos devido à redução da atividade da lipase (Yuan et al. 2007). De igual forma, a lesão das células do parênquima hepático poderá levar à redução da eliminação do excesso de colesterol através da secreção biliar, levando ao excesso de colesterol sanguíneo (Assawarachan et al. 2021). Além disso, a hiperlipidémia pode ser secundária a colestase, que é um achado frequente em cães com HCC (Boisclair et al. 2001). Por outro lado, também se levanta a hipótese da hiperlipidémia estar envolvida na patogénese da HCC, à semelhança do que acontece na MH, uma vez que a acumulação de lípidos nos hepatócitos pode levar a hepatotoxicidade e ativação da fibrinogénese, levando a FH e, conseqüentemente, cirrose (Kushner and Cobble 2016). São, no entanto, necessários mais estudos no futuro para perceber esta relação causal, sendo que até à data a hiperlipidémia está apenas descrita como fator de risco para colelitíase e mucocelo biliar em cães (Kutsunai et al. 2014; Lee et al. 2017). No estudo de Assawarachan et al. (2021), 62,2% da população de cães com HCC demonstrou hipertrigliceridémia (33,3%), hipercolesterolemia (11,1%) ou ambas (17,8%). Contudo, no nosso estudo não se consegue avaliar a incidência destas variáveis uma vez que não foram consistentemente avaliadas. Como sugerido anteriormente (Assawarachan et al. 2021), deve

ser tornada regular a medição do perfil lipídico em cães com suspeita ou confirmação de HCC, uma vez que o controlo da hiperlipidémia poderá ser benéfico para atrasar a progressão da doença e prevenir o aparecimento de comorbilidades como pancreatite, resistência à insulina e convulsões.

Os ácidos biliares, apesar de serem o teste de função com maior sensibilidade para avaliar a função hepática, uma vez que raramente estão aumentados em doenças extra-hepáticas e não são afetados pela administração de antiepiléticos nem corticoesteroides, não foram consistentemente avaliados, porque nos animais com a bilirrubina aumentada estes estarão invariavelmente elevados, sendo redundante a sua medição. Por isso, neste estudo, em que mais de metade da população apresentava hiperbilirrubinémia, apenas se detetou o aumento dos ácidos biliares em 36,8% da amostra, sendo uma sub-representação dos seus valores, muito abaixo do que está documentado por Webster et al. (2019) após a análise de nove estudos, que indicam um aumento dos ácidos biliares em  $75\% \pm 14\%$  dos canídeos com HCC. Por outro lado, está provado que a sua sensibilidade para estádios iniciais da doença é fraca, não sendo um bom teste de rastreio de HCC (Webster et al. 2019), podendo também ter sido essa a razão pela qual não foram medidos consistentemente.

Relativamente ao ionograma, foi detetada a presença de hipocalemia, hiponatremia e hipercalemia. A hiponatremia pode ser uma consequência do mesmo aumento da pressão hidrostática que leva ao desenvolvimento de ascite em animais com HP, denominada por hiponatremia por diluição (hipervolémica) (Buob et al. 2011), sendo nos humanos considerada um marcador de doença avançada e fator de mau prognóstico. Além disto, pode também ser provocada pelas perdas GI, devido ao vómito e diarreia que muitas vezes acompanham esta doença. Já a hiper e hipocalemia não estão diretamente associadas à HCC na literatura, no entanto, a hipocalemia pode também ser uma consequência do vómito e diarreia. A hipercalemia, por sua vez, pode ser secundária à administração de espirolactona ou um artefacto resultante de um atraso na centrifugação da amostra de sangue em casos de leucocitose e/ou trombocitose (Gough et al. 2015).

Os cristais de biurato de amónia detetados num LR podem traduzir uma hiperamoniémia transitória (Webster et al. 2019), sendo um achado já anteriormente descrito na bibliografia. O aumento da amónia tem uma sensibilidade semelhante aos ácidos biliares para deteção de HCC e/ou cirrose, sendo até superior por não estar dependente da colestase (Gerritzen-Bruning et al. 2006). No entanto, a nível técnico a sua medição é muito mais exigente, não sendo uma prática rotineira. O animal em questão não apresentou sinais de EH, o que pode ser explicado pelo carácter transitório do achado, ou pela presença de EH subclínica, impossível de detetar em animais. A proteinúria registada em 15,8% dos cães também já tinha sido descrita em cães com HCC (Shih et al. 2007), podendo estar associada a CuHC (Webb et al. 2002; Smedley et al. 2009). Não foi possível averiguar esta associação,

uma vez que em nenhum destes animais foi pesquisada a presença de cobre. O facto de a urina tipo II não ter sido consistentemente efetuada pode ser explicado por não ser considerado um exame essencial para o diagnóstico de HCC (Webster et al. 2019).

#### **4.3.2 Exame ecográfico**

A totalidade da população avaliada neste estudo demonstrou alterações difusas no fígado durante o exame ecográfico e, cerca de metade, exibiu sinais ecográficos que apontaram a HCC e/ou cirrose como diagnóstico diferencial privilegiado. Isto justifica o facto deste ser o método imagiológico de eleição, recomendado para a avaliação inicial do fígado de cães com suspeita de doença hepática, segundo Webster et al. (2019). A sua utilidade assenta ainda em poder-se excluir outros diagnósticos (massa hepática, por exemplo), na sua capacidade para detetar complicações associadas à HCC (HP, ascite, APSS, trombos) e na assistência nas biópsias percutâneas. No entanto, a sua sensibilidade para detetar HCC em estádios iniciais é considerada baixa por vários autores (Larson 2016; Lidbury 2017), uma vez que nestes casos o tamanho e a ecotextura estão minimamente alterados, estimando-se que 64% dos cães com fígados imaculados na ecografia apresentam alterações hepáticas na histopatologia (Kemp et al. 2013). O facto de 100% da amostra ter exibido alterações hepáticas difusas demonstrou que os animais, na sua maioria, provavelmente não se encontravam numa fase inicial da doença.

Relativamente ao tamanho, o achado mais comum foi a microhepatia (42,1%), embora também tenha sido observada hepatomegália (31,6%), bem como dimensões normais (26,3%), todas elas já descritas anteriormente na literatura (Shih et al. 2007; Webster et al. 2019). A microhepatia deve-se à transformação do parênquima hepático em tecido fibroso, sendo este o parâmetro ecográfico mais frequentemente associado a HCC, especialmente em casos de doença avançada e cirrose (Elhiblu et al. 2015; Webster et al. 2019). O facto de ter sido o achado mais frequente neste estudo é concordante com os já mencionados sinais de doença avançada numa grande parte dos canídeos. A hepatomegália aparece numa percentagem superior aos 4,2% relatados por Shih et al. (2007), podendo dever-se a alterações histopatológicas presentes na amostra, como vacuolização hepatocitária e sobrecarga metabólica. No entanto, deve também ser tido em consideração que o tamanho do fígado é avaliado de forma subjetiva, suscetível de variação entre raças e pela posição e possível dilatação gástrica do paciente. Acresce o facto de ser altamente dependente da experiência do ecografista e do tipo de equipamento usados, o que resulta numa grande divergência entre os resultados publicados (Webster et al. 2019). Já a percentagem de fígados normodimensionados vai ao encontro do intervalo sugerido por Webster et al. (2019), 14%-57%, de acordo com a análise integrada de vários estudos.

Relativamente à ecogenicidade, no nosso estudo, a tendência foi a presença de hiperecogenicidade ou ecogenicidade mista tal como descrito por vários autores (Shih et al.

2007; Elhiblu et al. 2015; Webster et al. 2019). A hiperecogenicidade comparativamente ao baço surge devido à presença de FH. A ecogenicidade mista, resultante da presença de pequenos focos hipoeecogénicos correspondentes a nódulos de regeneração dispostos ao longo do parênquima, está associada à progressão da doença. Por sua vez, uma minoria apresentou o parênquima hipoeecogénico, o que pode ser explicado pela presença de vacuolização hepatocitária e/ou sobrecarga metabólica, à semelhança da hepatomegália. A heterogeneidade que confere o aspeto marmoreado, as margens irregulares e o aspeto nodular à superfície são típicos de doença em progressão (Elhiblu et al. 2015; Webster et al. 2019), e foram identificados no nosso estudo. A linfadenomegália portal, presente em 36,8% da população, encontra-se associada a cães com HCC, sendo considerada um fator de mau prognóstico por alguns autores (Poldervaart et al. 2009).

A presença de sinais de colangite/colecistite (como estase biliar) vai de encontro ao descrito, sendo a colangiohepatite crónica um achado frequente em cães com HCC (Bexfield 2017). Foi ainda identificada a presença de lamas biliares e, em raros casos, colelitíase, provavelmente associadas à presença de colestase. O líquido abdominal livre, a presença da veia gonadal esquerda visível, a neovascularização, a redução da velocidade do fluxo da VP (<10cm/s em média) e o edema da vesícula biliar foram também sinais identificados neste estudo, associados a HP, que corresponde a uma complicação da HCC (Szatmári and Rothuizen 2006; Webster et al. 2019). Ainda foi possível, através da ecografia, observar uma trombose da veia esplénica, também ela considerada uma complicação de HCC (Webster et al. 2019), secundária a uma alteração da coagulação. Este achado reforça a importância de uma avaliação cuidadosa da vasculatura hepática durante o exame ecográfico e a utilidade da ecografia como meio complementar de diagnóstico de alterações da coagulação.

#### **4.3.3 Citologia, Histopatologia e Cultura hepáticas**

A citologia, tal como relatado na literatura, apesar de ser um método seguro e fácil de realizar, não foi um meio de diagnóstico útil no caso da HCC, uma vez que o resultado se revelou inespecífico na maioria dos animais e, nos restantes, deu resultados discordantes dos da histopatologia. Isto vai de encontro a outro estudo em que em 20 cães com doença inflamatória, a identificação citológica apenas foi correta em 5 (Wang et al. 2004). Não é, assim sendo, um método recomendado quando há suspeita clínica de HCC, por não ser um método fidedigno para deteção de infiltrado inflamatório, determinação da extensão da fibrose, bem como de acumulação anormal de cobre. No nosso estudo, apesar dos resultados da histopatologia se terem baseado nos critérios estabelecidos pelo WSAVA, o facto de não terem sido realizados pelo mesmo histopatologista, pode levar a alguma variabilidade na interpretação da presença e da gravidade de certos aspetos histopatológicos, sendo a concordância entre histopatologistas considerada baixa em relação ao grau de FH e à atividade necro-inflamatória. Além disto, os métodos utilizados para a realização de biópsia

também variaram, o que pode contribuir para a diminuição da fidelidade dos resultados. A FH pode ainda ter sido sub ou sobrestimada em alguns casos devido a erros na colheita das amostras, nomeadamente tamanho insuficiente, heterogeneidade da distribuição das lesões e avaliação subjetiva das alterações (Menard et al. 2019).

De acordo com o WSAVA, duas amostras corretamente colhidas com agulha são geralmente suficientes para uma avaliação confiável, e biopsar pelo menos 2 lobos diferentes permite identificar a alteração histológica predominante em 98,6% dos casos. Estes critérios foram respeitados em todas as biópsias realizadas, tendo sido recolhidas no mínimo duas amostras por animal, sendo que em alguns casos foram colhidas 5 amostras, que é o procedimento atualmente recomendado: três para histopatologia, uma para bacteriologia (cultura hepática) e outra para coloração específica (rodanina) para deteção da acumulação de cobre. Sabe-se que a biópsia por laparotomia é o método que permite a obtenção de amostras de maior tamanho, o que leva a uma maior representabilidade de tríades portais, comparativamente à laparoscopia e ao método percutâneo. No entanto, tem como desvantagem ser o método mais invasivo, mais predisposto a hemorragia e mais dispendioso. Na população em estudo, o método mais utilizado foi a biópsia percutânea ecoguiada, provavelmente por ser o mais acessível, mais fácil em termos técnicos, em que o equipamento se encontra disponível na maioria das clínicas e, mais importante, o menos invasivo. A segurança deste método é um ponto fulcral na decisão de muitos detentores, que se mostram muitas vezes hesitantes em realizar biópsia hepática, principalmente em pacientes que se encontram clinicamente instáveis. Apesar de ser o método que permite a amostra com menor representabilidade, foram utilizadas agulhas de 16G, descritas na literatura como capazes de providenciar amostras adequadas se realizadas corretamente (Webster et al. 2019). A laparotomia foi o segundo método mais utilizado, uma vez que dá acesso às melhores amostras, tendo sido o aconselhado para os pacientes clinicamente estáveis. Por fim, apenas dois pacientes realizaram a biópsia por laparoscopia. Apesar deste método ser menos invasivo que a laparotomia, e permitir a obtenção de amostras de boa qualidade, exige equipamento especializado, indisponível na maioria das clínicas, assim como treino especializado do operador, sendo ainda pouco utilizado na atualidade em Portugal.

O tipo de infiltrado inflamatório deve ser caracterizado, uma vez que pode apontar para a etiologia subjacente (tema abordado no tópico **4.7 Etiologia**). O predominante neste estudo foi o linfoplasmocitário, seguido de infiltrado misto (neutrófilos, linfócitos e macrófagos em igual proporção), granulomatoso e piogranulomatoso. A sua localização portal/periportal vai de encontro ao descrito noutros estudos (Shih et al. 2007). A presença de lesão/morte celular foi descrita em todas as amostras, sendo essencial para o diagnóstico de HCC segundo o WSAVA, no entanto o tipo de células, a sua extensão e distribuição nem sempre foram esclarecidas nos relatórios histopatológicos. A FH, considerada o marco da cronicidade,

esteve presente na maioria dos animais de forma marcada, com uma grande percentagem a apresentar cirrose (42,1%), com distorção da arquitetura lobular, o que veio confirmar o estágio avançado da doença na maioria da população. A localização da FH foi predominantemente periportal, o mais comum segundo a bibliografia (Webster et al. 2019).

A proliferação dos ductos biliares observada em 6 amostras, pode ser explicada pela compressão exercida sobre eles, num fígado fibrótico e/ou por indução provocada pelas citocinas (Boisclair et al. 2001) sendo considerada um achado muito comum em animais com HCC (Webster et al. 2019). A presença de vacuolização hepatocitária e sobrecarga metabólica pode coexistir com HCC (Webster et al. 2019), como verificado neste estudo. A hematopoiese extramedular, identificada numa pequena proporção da população, já foi descrita em animais com doença hepática (Hirose et al. 2014; Pena-Ramos et al. 2021), e especificamente em cães diagnosticados com HCC (Kanemoto et al. 2013).

Associados a HP, foram descritas congestão sinusoidal e peliose em alguns canídeos. Foi ainda descrita a acumulação de lipofuscina (pigmento associado a lesão oxidativa ou idade avançada), hemossiderina e pigmento biliar (secundário a colestase intra-hepática) nos hepatócitos e/ou nas células de Kupffer, anteriormente descritos em cães com HCC (Jensen and Nielsen 1991) e outras alterações hepáticas (Pena-Ramos et al. 2021). A hemossiderose corresponde à acumulação de ferro que pode estar associada à acumulação de cobre hepático e contribuir para lesões oxidativas (Smedley et al. 2009; Lidbury 2017).

Relativamente à semiquantificação de cobre, esta foi realizada em poucos cães, particularmente nos LR, possivelmente por estarem descritos como raça predisposta (Webster et al. 2019). Nos restantes, apesar de nos últimos anos ter vindo a tornar-se uma prática comum a pesquisa de cobre em todos os animais que realizam biópsia hepática, nos casos mais antigos esta não se verificou, talvez por na altura não existir sensibilização para a prevalência da acumulação de cobre como etiologia da HCC. Por esta razão, o facto de os dois casos primários de acumulação de cobre, predominantemente na zona centrilobular, corresponderem a LR, pode ser o resultado de uma sobrerrepresentação desta raça, por ter sido mais testada que as restantes, ou por, tal como descrito em diversos artigos publicados, ser uma raça com predisposição para CuHC (Hoffman et al. 2006; Poldervaart et al. 2009; Smedley et al. 2009). Os restantes três canídeos em que foi detetada a presença de cobre, corresponderam a casos de acumulação secundária deste metal, com localização centroacinar, e em quantidade significativamente menor que os anteriores. Para o diagnóstico de CuHC primária neste estudo foram tidos em conta 2 dos 3 critérios sugeridos pelo *consensus* do ACVIM em 2019: evidencia histológica de HCC associada a acumulação de cobre, frequentemente localizada na área centrilobular (zona 3) e coloração histoquímica que demonstra acumulação de cobre nos hepatócitos nas áreas centrilobulares, neste caso coloração especial com rodanina. O terceiro critério, a quantificação de cobre hepático com

concentrações superiores a 1000 µg/g peso seco de fígado (Webster et al. 2019) não foi considerado, uma vez que só se realizou a quantificação de cobre num animal e resultou inferior a este valor. Num futuro próximo, em Portugal, é expectável que a pesquisa e quantificação deste metal se tornem um procedimento rotina nos animais que realizam biópsia hepática, agora que a sua associação à HCC está amplamente documentada na bibliografia. De facto, neste estudo, verifica-se que os animais cuja pesquisa de cobre foi requisitada correspondem aos casos mais recentes.

A cultura de parênquima hepático resultou negativa em todos os animais em que foi realizada, corroborando a suspeita de que a etiologia infecciosa é negligenciável no caso da HCC (Webster et al. 2019). Quanto à cultura de biliar sabe-se que, em cães com inflamação hepática, os organismos mais frequentemente isolados são *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Streptococcus* spp., e *Clostridium* spp. (Webb 2017). Neste estudo, para além de *Streptococcus* spp., isolou-se *Kocuria kristinae* e *Staphylococcus* spp. A *Kocuria kristinae* é uma espécie Gram +, comensal da pele, da mesma família dos estafilococos, cujo significado clínico deve ser interpretado cuidadosamente, uma vez que faz parte da flora cutânea e das membranas mucosas nos humanos e nos animais, não sendo o seu isolamento necessariamente sinal de infeção. No entanto, o número crescente de casos de infeções (urinárias e colecistite) associados a esta bactéria em humanos, levou a que os clínicos deixassem de subestimar a sua presença. Associada a infeções com *Kocuria* encontram-se as seguintes comorbilidades: litíase biliar, diabetes *mellitus*, tuberculose e pacientes transplantados (Kandi et al. 2016). No caso do cão avaliado no nosso estudo, este apresentava sinais de colecistite na ecografia, bem como presença de lamas biliares, o que indica que, à semelhança dos humanos, esta bactéria pode causar infeção, não sendo inofensiva para o sistema biliar.

#### **4.6 Complicações e comorbilidades**

A HP é uma complicação da HCC extensamente relatada na literatura, estando ela própria na base do desenvolvimento de muitas outras complicações, tais como, ascite e ulceração GI (Bexfield 2017). A igual incidência (31,6%) de HP, ascite e ulceração GI neste estudo pode ser explicada pelo facto das duas últimas serem consequências diretas da primeira. No entanto, a ulceração GI está relatada como sendo menos frequente, contudo pode estar sobrestimada por ter sido considerada em todos os animais que apresentaram melena e/ou hematoquezia, sendo que estes acontecimentos podem aparecer devido a uma coagulopatia, embora a ulceração seja a explicação mais provável, uma vez que a hemorragia espontânea é rara em cães com HCC (Webster et al. 2019).

A ascite desenvolve-se secundariamente ao aumento da pressão sinusoidal, sendo considerada um sinal clínico da HP. Apesar da hipoalbuminémia poder contribuir para este fenómeno, raramente é suficiente para provocar a ascite por si só. A acumulação de líquido

abdominal livre está fortemente associada a um mau prognóstico, uma vez que normalmente significa que já existem alterações irreversíveis na circulação portal. Dos fluidos ascíticos analisados, todos foram de encontro ao descrito na bibliografia associados a HP secundária a HCC, tendo sido classificados como transudado puro ou modificado (Raffan et al. 2009). Em alguns casos não foi possível realizar a análise citológica pela quantidade insuficiente de líquido presente. Também associado à HP (Buob et al. 2011) e identificado no nosso estudo através do exame ecográfico, está o desenvolvimento de APPS. Por sua vez, estes podem levar a que o sangue, rico em amónia proveniente da circulação esplâncnica, passe ao lado do fígado, não sendo destoxificado, o que pode levar ao desenvolvimento de EH. Esta complicação, identificada através de sinais neurológicos (*apatia, ataxia, head pressing, tremores, convulsão*) também foi diagnosticada em alguns cães deste estudo, que demonstraram sinais de HP na ecografia e/ou histopatologia. Esta está estreitamente associada à HCC (Lidbury 2015). No entanto, animais com EH grau I são assintomáticos e impossíveis de diagnosticar, podendo esta complicação ser, por vezes, subestimada em MV. Alguns dos fatores descritos por Lidbury (2015) como precipitantes da EH identificados neste estudo foram: hipocalémia (comum a todos), a presença de hemorragia GI (melena, hematoquezia) e ureia elevada. A hipocalémia leva ao desenvolvimento de alcalose extracelular, o que pode levar ao aprisionamento dos iões de amónia entre as células do córtex cerebral (Lidbury et al. 2015).

Relativamente às alterações da coagulação, estas podem surgir devido a alterações na hemostase primária, secundária ou da fibrinólise, que podem estar afetadas nos cães com doença hepato-biliar. Uma vez que o fígado desempenha um papel crítico tanto na formação como na destruição de procoagulantes e anticoagulantes, bem como de componentes da fibrinólise, não é surpreendente que uma grande variedade de distúrbios da coagulação possam acompanhar uma insuficiência hepática. Neste estudo, 68,4% da população apresentou pelo menos um parâmetro de coagulação alterado, estando esta prevalência um pouco acima dos 57% reportados por Prins et al. (2009). Isto pode ser explicado pela elevada percentagem de animais com suspeita de insuficiência hepática e cirrose confirmada por histopatologia no nosso estudo, ao contrário do que se passou no estudo de Prins et al. (2009), em que nem todos os animais foram diagnosticados com HCC e cujas lesões hepáticas apresentavam-se, no geral, menos graves. Apesar destes sinais que levam à suspeita de coagulopatia, nenhum dos cães incluídos na amostra experienciou hemorragia clinicamente significativa após a biópsia, tendo sido realizada monitorização tanto ecográfica como do Hct, que não apresentaram alterações em nenhum animal. Este facto pode, no entanto, ser justificado pela administração preventiva de vitamina K nos animais em que se observou prolongamento dos tempos de coagulação, ou por deficiências concomitantes em anticoagulantes (Kavanagh et al. 2011). Coletivamente, conforme a informação disponível

sobre alterações da coagulação em animais com HCC e/ou cirrose, a suspeita mais provável é as alterações dos parâmetros de coagulação serem explicadas por falha na capacidade sintética do fígado, no entanto, são necessários mais estudos para descartar o papel de uma deficiência em vitamina K e de coagulopatias de consumo (Kavanagh et al. 2011).

A suspeita de CID surgiu devido à presença de trombocitopenia, trombose do segmento terminal da veia esplénica e elevação dos dímeros D (Kavanagh et al. 2011). Esta complicação, apesar de estar descrita como sendo mais comum em doença hepática aguda, também já foi relatada em animais com HCC (Prins et al. 2010; Kavanagh et al. 2011). Existem fatores de risco sugeridos para a formação de trombos nos pacientes com doença hepática, entre eles a corticoterapia, que estava a ser realizada no animal que desenvolveu trombose da veia esplénica neste estudo.

As equimoses apresentadas por um dos pacientes dever-se-ão provavelmente à trombocitopenia presente, assim como o sangramento gengival espontâneo observado noutro animal, com prolongamento concomitante do TP e TTPa.

Um dos pacientes apresentava insuficiência renal, que já foi associada a doença hepática por diminuição da capacidade de desintoxicação do fígado, com aumento da ureia e da creatinina (Elhiblu et al. 2015). As comorbilidades colangite/colecistite e pancreatite foram detetadas em 36,8% da amostra, sendo comum a sua associação a HCC (Watson et al. 2010).

#### **4.7 Etiologia**

O cobre foi a única etiologia comprovada neste estudo, como esperado, uma vez que a CuHC é o tipo de HCC mais bem documentado na literatura, estando descrito que pode corresponder até 35% dos casos de hepatite num hospital de referência (Favier et al. 2013). Além desta etiologia, os restantes casos de HCC confirmados por histopatologia neste estudo, permaneceram classificados como idiopáticos.

Nos LR, o envolvimento do cobre na HCC difere entre países e ao longo do tempo. No RU, este metal não está associado à HCC (House et al. 2013), no entanto nos Estados Unidos e na Holanda há evidência da sua relação com a doença num terço dos casos (Hoffman et al. 2006; Poldervaart et al. 2009; Smedley et al. 2009). Mais recentemente, em França, também foi comprovada esta relação (Rodrigues et al. 2020). Neste estudo, os 2 casos de acumulação primária de cobre foram detetados em LR, levantando a suspeita desta poder ser uma raça com predisposição para CuHC em Portugal. Contudo, como já foi mencionado anteriormente, a pesquisa de cobre na amostra não foi consistente, tendo sido na sua maioria realizada nos LR, por ser uma raça descrita como predisposta, o que pode ter levado a uma sobre-representação desta raça nos resultados.

Para além do cobre, outros potenciais fatores etiológicos foram considerados neste estudo. Um dos cães da amostra (LR) apresentava problemas ortopédicos e tinha, na sua história clínica, registo de medicação intermitente com carprofeno. Apesar de fármacos como

os AINEs serem conhecidos como agentes etiológicos de hepatite aguda, está comprovado que esta pode progredir para HCC se o animal sobreviver à lesão inicial (Webster et al. 2019). A reforçar esta ideia, está a suspeita de suscetibilidade dos LR à toxicidade por carprofeno, mencionada por Watson (2017). Noutro caso, um animal com historial de mastocitoma cutâneo foi submetido a quimioterapia, cujo protocolo mais comum inclui a lomustina que também está descrita na literatura como um dos fármacos com maior evidência de associação à HCC (Webster et al. 2019). Contudo, não foi possível estabelecer uma associação temporal com o uso destes fármacos e o desenvolvimento da HCC. Também o uso crónico de fenobarbital foi sugerido como hipotética etiologia num dos animais epiléticos devido ao seu uso prolongado (desde os 5 meses de idade) e a níveis sanguíneos elevados, acima da dose terapêutica. Apesar de estar provado que o fenobarbital induz o aumento da atividade enzimática da FAS, tal como os glucocorticoides, estudos que avaliaram as características histopatológicas do fígado sugerem que o aumento concomitante da ALT pode ser resultado de lesão hepática provocada pelo uso crónico deste fármaco (Gaskill et al. 2005). Não é possível, no entanto, comprovar esta etiologia, embora neste caso haja uma clara relação temporal entre o uso do fármaco e o desenvolvimento da doença, e este seja o fármaco mais fortemente associado a HCC (Webb 2017).

Todos os testes realizados para pesquisa de agentes infecciosos resultaram negativos, o que corrobora a literatura, que afirma que esta é uma etiologia negligenciável de HCC (Webster et al. 2019). No entanto, no caso particular dos animais com infiltrado granulomatoso e piogranulomatoso, associados a etiologias infecciosas como leptospirose, leishmaniose ou bartonelose (Webster et al. 2019), a pesquisa através de testes serológicos e/ou PCR mostrou-se infrutífera, ao contrário do esperado. No entanto, não foi realizada nenhuma coloração especial na histopatologia nem a técnica de hibridização fluorescente *in situ*, aconselhada nestes casos, podendo ser o motivo da falha na deteção destes agentes.

Atualmente, existe a suspeita de que uma grande parte dos animais com HCC idiopática possam ter uma componente imunitária associada à doença. Na população incluída neste estudo, 31,6% dos animais apresentavam comorbilidades associadas ao sistema imunitário (dermatite atópica, rinite alérgica, suspeita de anemia hemolítica imunomediada). Se é uma coincidência ou se é indicativo de uma etiologia imunomediada como comprovado na MH nos casos hepatite autoimune é, ainda, desconhecido. A sobrerrepresentação de fêmeas e de infiltrado linfoplasmocitário, bem como uma percentagem considerável de resposta à corticoterapia (36,8%) são tudo fatores ligados à suspeita de etiologia imunomediada (Webster et al. 2019). No entanto, não foi realizada nenhuma pesquisa de autoanticorpos caninos contra o fígado, não sendo possível confirmar uma etiologia autoimune.

O facto da maioria dos casos deste estudo serem idiopáticos, tal como noutros estudos (Watson 2017), evidencia a necessidade de futura investigação de potenciais fatores etiológicos para a HCC e do desenvolvimento de métodos de diagnóstico para deteção de etiologia imunomediada. Uma vez que atualmente se sabe que o cobre representa uma etiologia frequente de HCC, como já foi mencionado anteriormente, aconselha-se também tornar rotineira a pesquisa da acumulação deste metal para perceber a epidemiologia de CuHC primária em Portugal, bem como detetar a acumulação de cobre secundária, uma vez que o seu tratamento deve ser realizado de forma a evitar lesões hepáticas adicionais e, dessa forma, atrasar/travar a progressão da doença.

#### **4.8 Tratamento e evolução clínica**

O tratamento da hepatite crónica idealmente tem como principais focos a) remoção do agente etiológico, b) administração de fármacos anti-inflamatórios e antioxidantes, c) administração de terapia de suporte consoante a sintomatologia apresentada (fluidoterapia, antieméticos, diuréticos...) e d) maneio das complicações. Como na realidade a maioria dos casos são idiopáticos, a remoção do agente etiológico não é possível, à exceção do cobre, que vai ser referido mais à frente. Quanto aos pontos b), c) e d) estes vão de encontro, regra geral, ao que foi prescrito aos 19 cães incluídos nesta amostra. Uma vez que este estudo tem um carácter retrospectivo, o tratamento e a monitorização dos animais não foram protocolados nem uniformizados para todos os animais e, além disto, foi sempre prescrita uma terapia multimodal, o que não permitiu avaliar a eficácia dos fármacos individualmente.

Quanto ao tratamento de suporte, a totalidade dos pacientes hospitalizados beneficiaram de fluidoterapia de manutenção ou reposição de perdas provocadas pelo vómito e diarreia. Em caso de hipocalémia, foi realizada suplementação com potássio, para evitar a precipitação de EH e repor o equilíbrio eletrolítico do paciente. Nos pacientes com doença hepática, está recomendada fluidoterapia com taxa de administração lenta, especialmente em casos de HP e ascite, sendo recomendada a monitorização constante do estado clínico do animal. Além disto, para a dor abdominal associada à HCC, foi prescrita analgesia e, numa tentativa de colmatar a anorexia e os vómitos, comuns na HCC, foram prescritos antieméticos.

Na maioria dos pacientes foi realizada a administração de corticosteroides, uma vez que tinham indicadores de doença imunomediada, especificados no tópico anterior. No entanto, o seu uso deve ser cauteloso, especialmente em caso de ascite e ulceração GI, sendo importante não ultrapassar a sua dose anti-inflamatória (prednisolona 1mg/kg/dia), bem como não estender a sua utilização por longos períodos (Willard 2011). No caso dos animais deste estudo, foi respeitada a dose anti-inflamatória e a prednisolona foi a escolha de eleição, no entanto, nunca houve a passagem para outro imunomodulador a longo prazo, como azatioprina ou ciclosporina. Alguns cães pararam o tratamento com prednisolona por perda muscular (catabolismo proteico) ou pioria da condição hepática, provavelmente por

desenvolvimento concomitante de hepatopatia vacuolar, embora não tenha sido confirmada pela histopatologia. Por esta razão, quando os animais respondem bem ao tratamento com corticosteroide, está aconselhada a passagem para outro imunomodulador, que apresente menos efeitos secundários. Hoje em dia, já existe evidência da eficácia da ciclosporina em cães com HCC (Ullal et al. 2019). Apesar disto, muitos casos pareceram responder favoravelmente à corticoterapia, com melhoria clínica do animal, favorecendo a hipótese do envolvimento do sistema imunitário. No entanto, não se realizou nova biópsia para comprovar o seu efeito na redução da inflamação e atraso da progressão da doença.

Os antioxidantes estão recomendados em todos os animais com HCC, uma vez que o stress oxidativo e a lesão celular causada por radicais livres são um mecanismo importante da fisiopatologia da doença. No entanto, não estão recomendados como terapia única, sendo a sua eficácia superior quando associado a outros fármacos (Bexfield 2017). Neste estudo, todos os animais beneficiaram de tratamento antioxidante. A formulação de eleição é uma combinação de SAME com silibina (Zentonyl® *advanced*), que possuiu um revestimento entérico para evitar que a SAME seja digerida pelo ácido gástrico, de forma a garantir a sua máxima disponibilidade quando absorvida pelo duodeno. Apesar do seu efeito estar pouco estudado em cães, existe evidência da sua eficácia em pessoas com hepatite crónica. O facto de não estar associado a efeitos adversos justifica a sua adição ao tratamento (Bexfield 2017).

Por sua vez, o ácido ursodesoxicólico mostrou benefícios em humanos e animais com colestase, possuindo características hepatoprotetoras, coleréticas e imunomoduladoras. Os pacientes que evidenciaram aumento das enzimas marcadoras de colestase (FAS e GGT) beneficiaram todos da toma deste fármaco, uma vez que a estase biliar é muito comum em cães com HCC. Apesar da sua ampla utilização em MV, existe pouca evidência da sua eficácia, uma vez que as terapias são, regra geral, multimodais, não permitindo detetar o efeito específico de cada fármaco (Bexfield 2017).

Outra parte importante do tratamento da HCC é o maneio das complicações que vão surgindo, numa tentativa de retardar a progressão da FH, bem como um correto aporte nutricional. Infelizmente, não existe nenhum fármaco capaz de controlar a HP em cães, sendo apenas recomendada a monitorização do estado de hidratação do animal para prevenir sobrecarga de fluidos. Os animais que apresentaram ascite foram medicados com diuréticos, mais especificamente espironolactona, por ser um antagonista da aldosterona e, portanto, o mais eficaz a resolver a acumulação de fluido abdominal secundária à HP. Em nenhum dos casos foi prescrita furosemida, sendo que esta foi inclusivamente substituída pela espironolactona num caso referenciado, uma vez que está demonstrada a sua capacidade de precipitar complicações em humanos com ascite, especialmente distúrbios eletrolíticos como hipocalémia (Bexfield 2017). Para a prevenção da ulceração GI foram prescritos anti-ácido (famotidina), inibidor da bomba de prótons (omeprazol) e protetor da mucosa gástrica

(sucralfato). Nos casos mais antigos verificou-se uma associação do omeprazol com famotidina, o que hoje se sabe estar contraindicado. O tratamento dos animais com suspeita de EH passou pela administração preventiva de antibiótico (preferencialmente metronidazol), lactulose e restrição proteica. Nos animais com alteração dos tempos de coagulação, foi administrada vitamina K pré-biópsia, o que normalizou o TP e o TTPa em todos os casos.

Uma vez que as bactérias não estão aparentemente envolvidas na etiologia da HCC, os antibióticos não são um tratamento de rotina, no entanto são muitas vezes recomendados para a prevenção da EH e de infecções secundárias à HCC, uma vez que está comprovado que pode ocorrer colonização bacteriana em cães com doença hepática, devido à disfunção das células de Kupffer, que normalmente funcionam como purificadoras, ao filtrar as bactérias e os produtos tóxicos presentes no sangue. Tal como indicado na literatura, os antibióticos prescritos para estes animais foram a amoxicilina com ácido clavulânico e o metronidazol, que por sua vez também apresenta propriedades imunomoduladoras (Bexfield 2017). A enrofloxacinina foi adicionada nos casos em que a cultura da bÍlis foi positiva, uma vez que a combinação de uma fluoroquinolona com amoxicilina+ácido clavulânico e metronidazol é a terapêutica recomendada nestes casos (Trapanier 2008).

Para além da descrita atividade anti-fibrótica dos corticosteroides, apenas num animal foi utilizado um anti-fibrótico específico, a colchicina. O facto deste não ser rotineiramente prescrito pelos clÍnicos que seguiram estes casos, deve-se provavelmente à falta de evidência científica da sua eficácia em cães e a possíveis efeitos adversos, como supressão da medula óssea, sinais neurológicos, anorexia e diarreia, que aparentam ser frequentes e podem mimetizar a HCC (Bexfield 2017).

Relativamente à dieta, não existem estudos que avaliem as necessidades energéticas ou uma composição dietética específica para cães com HCC, sendo as recomendações dos artigos derivadas de estudos realizados em MH, cujo foco são pacientes com doença hepática avançada complicada com EH. Posto isto, pela experiência de alguns autores (Bexfield 2017), muitos cães sofrem restrição proteica inadequada e excessiva, o que leva à inibição da regeneração hepática e a défices nutritivos, deteriorando a condição clínica do animal. Se o metabolismo proteico e energético dos cães com doença hepática avançada for semelhante ao dos humanos, estes cães têm na verdade necessidades proteicas aumentadas (Bexfield 2017). No entanto, vários animais neste estudo passaram a ser alimentados com dieta hepática, incluindo os diagnosticados com CuHC primária, cuja percentagem de proteína se encontra abaixo do recomendado. Nestes casos, sugere-se a suplementação com proteína de alta qualidade, altamente digerível, preferencialmente de origem vegetal ou derivada da caseína. A exceção a esta regra são os cães com EH, sendo a única ocasião em que se deve efetivamente recomendar restrição proteica.

No animal com forte suspeita de hepatotoxicidade provocada pelo fenobarbital, seria ideal parar esta medicação e avaliar a sua resposta à terapêutica com antioxidantes.

Nos casos de CuHC primária, o tratamento foi também prescrito de acordo com a literatura: dieta com restrição de cobre para toda a vida (Purina HP ou Hill's L/d); um quelante para remoção do metal acumulado, sendo o de eleição e utilizado neste estudo a DPA (até 1 mês após a normalização da atividade da ALT, por ser difícil prever a duração da quelação necessária para cada animal, uma vez que esta depende também da concentração inicial de cobre); transição para gluconato de zinco que vai impedir a absorção intestinal de cobre (Webster et al. 2019). É importante ter em conta que a quelação não vai ser eficaz se não se fizer a restrição dietética e, por sua vez, a alteração da dieta não substitui a necessidade do tratamento quelante. O gluconato de zinco apenas se adiciona após a descontinuação da DPA, porque em conjunto antagonizam o efeito um do outro. Adicionalmente, o tratamento com os antioxidantes supracitados encontra-se igualmente recomendado, uma vez que o cobre provoca lesões oxidativas no fígado.

Tendo em conta os fatores de mau prognóstico associados a HCC, estavam presentes neste estudo nos animais eutanasiados: cirrose (Poldervaart et al. 2009), ascite (Poldervaart et al. 2009; Raffan et al. 2009), prolongamento do TP e TTPa (Shih et al. 2007; Poldervaart et al. 2009), hipoalbuminémia (Poldervaart et al. 2009), hiperbilirrubinémia e hiperbilirrubinúria (Gómez Selgas et al. 2014; Bexfield 2017), hipoglicémia (Webster et al. 2019), microhepatia e adenomegália portal (Poldervaart et al. 2009). No entanto, não foi possível fazer uma associação significativa destes fatores com a eutanásia/morte dos animais, uma vez que foi perdido o seguimento clínico de 8 animais.

## **5 – Conclusão**

A HCC é a doença hepática primária mais comum em cães, sendo um fator importante de morbidade e mortalidade em cães. Assim sendo, é fundamental a sensibilização do clínico para a sua deteção precoce. O facto da maioria dos casos serem diagnosticados em estádios avançados, como aconteceu neste estudo, torna menos provável a eficácia do tratamento. É crucial para o prognóstico a sua deteção antes do desenvolvimento de complicações, como HP, e cirrose, sendo nestes casos o tratamento apenas paliativo. Deve, por isso, ser um diagnóstico diferencial a ter em conta em cães de meia-idade a velhos com elevação injustificada e prolongada das enzimas hepáticas. A dificuldade do seu diagnóstico assenta na inespecificidade dos sinais clínicos ou, por vezes, na sua inexistência até ao início insidioso das complicações. A dificultar a abordagem terapêutica reside o facto da maioria dos casos permanecerem idiopáticos, tal como confirmado neste estudo. Além disso, o facto do seu único meio de diagnóstico definitivo ser a biópsia, um procedimento invasivo, acaba por levar ao seu adiamento ou recusa por parte dos donos, tanto pelos seus potenciais riscos, como por motivos financeiros. Além disto, diferentes etiologias podem produzir alterações

histológicas semelhantes, contribuindo para a dificuldade na deteção da etiopatogenia da doença e da escolha da abordagem terapêutica. Em termos de tratamento, são raros os estudos randomizados e controlados com placebo realizados para avaliar a eficácia e a farmacocinética dos fármacos usados na HCC. O tratamento acaba muitas vezes por ser empírico, extrapolado da MH, ou consoante a experiência do clínico.

Em suma, atualmente, os maiores desafios para a hepatologia canina são: a descoberta da etiopatogenia da HCC; uniformização da interpretação das alterações histomorfológicas do fígado; desenvolvimento de um método não invasivo de diagnóstico e monitorização da HCC (biomarcadores de lesão hepatocelular e FH); estudos randomizados e controlados dos fármacos utilizados na HCC para maximizar a eficácia do tratamento.

Este estudo retrospectivo permitiu atualizar os dados clínicos existentes relativamente à epidemiologia, apresentação clínica, sinais ecográficos, características histopatológicas e complicações associadas a esta doença. Além disto, permitiu obter uma visão aproximada da realidade portuguesa sobre os meios de diagnóstico e a terapêutica visto que, alguns dos estudos disponíveis envolvem abordagens que não são ajustáveis à prática clínica em Portugal. A maioria dos resultados obtidos estão de acordo com a literatura. Contudo, estes foram inferidos a partir de uma amostra reduzida e inserida num contexto hospitalar específico, carecendo de cuidado na sua interpretação e extrapolação. A epidemiologia demonstrou uma sobrerrepresentação do género feminino, da raça LR e de cães de meia-idade a velhos. Os sinais clínicos e os resultados das análises laboratoriais foram ao encontro do esperado, sendo a anorexia e a letargia os sinais mais consistentes e o aumento da ALT o achado comum a toda a amostra, reforçando a ideia de ser o teste de rastreio de eleição para a deteção de HCC. Quanto à ecografia, os sinais mais frequentes foram a hiperecogenicidade do parênquima e a microhepatia, considerados os sinais mais comuns (Webster et al. 2019). Na histopatologia predominou um infiltrado do tipo inflamatório e fibrose marcada. Foram ainda verificadas diversas complicações (HP, ascite, ulceração GI, EH, alterações da coagulação), situações para as quais os Médicos Veterinários devem estar sensibilizados durante o maneio destes pacientes.

A maioria das limitações apresentadas são secundárias ao carácter retrospectivo do estudo. Em primeiro lugar, o facto dos casos clínicos surgirem da casuística de um hospital gerou uma falta de padronização na abordagem diagnóstica e terapêutica. Cada caso foi acompanhado por um clínico diferente, não tendo sido homogénea a solicitação dos meios complementares de diagnóstico. Este cenário conduziu a resultados inconsistentes de alguns parâmetros como fibrinogénio, colesterol, triglicéridos, quantificação de cobre, entre outros, inviabilizando a análise da sua incidência na população. Outra limitação deste estudo foi o facto dos relatórios ecográficos e histopatológicos não terem sido realizados por um único especialista, uma vez que está relatada a falta de concordância entre indivíduos. Também a

ausência de um grupo controlo e o tamanho limitado da amostra enfraqueceram o poder estatístico, carecendo de cuidado a interpretação dos resultados. Finalmente, este estudo foi realizado com dados recolhidos de um único hospital veterinário, conseqüentemente os seus resultados devem ser aplicados cautelosamente a outros ambientes clínicos.

Como perspectivas futuras seria interessante realizar um estudo prospetivo com um grupo controlo com animais saudáveis e um grupo de HCC comprovada por histopatologia, com uma amostra mais extensa e com padronização da abordagem diagnóstica e terapêutica. Adicionalmente poder-se-ia incluir a avaliação consistente do colesterol, triglicéridos, fibrinogénio e pesquisa de cobre através de coloração especial com rodanina. Desta forma, poderia conhecer-se melhor a relação da hiperlipidémia com a HCC, o valor do fibrinogénio na predição do risco de hemorragia e a incidência de CuHC primária e secundária em Portugal, assim como a sua epidemiologia. Poderia ainda ser interessante, um estudo retrospectivo para pesquisa de fatores associados a pior prognóstico, sendo que para isso teriam de ser excluídos todos os pacientes que se encontrassem vivos e contactar os detentores ou os colegas cujo seguimento do caso tivesse sido perdido. Também seria útil para a monitorização da doença a adaptação para MV de um sistema de pontuação clínica, existente na MH, baseado na presença de determinados sinais clínicos e complicações que pudesse estimar o grau de FH, de forma a tornar mais fácil a avaliação da eficácia do tratamento, progressão da doença e, conseqüentemente, a determinação do prognóstico.

## 6. Referências bibliográficas

Andersson M, Sevelius E. 1991. Breed, sex and age distribution in dogs with chronic liver disease: a demographic study. *J Small Anim Pract.* 32(1):1–5. doi:10.1111/j.1748-5827.1991.tb00844.x.

Assawarachan SN, Chuchalernporn P, Maneesaay P, Thengchaisri N. 2021. Changes in Serum Lipid Profiles among Canine Patients Suffering from Chronic Hepatitis. :14.

Bayton W, Watson PJ, Bexfield NH. 2020. Prednisolone therapy for chronic hepatitis in English springer spaniels: a prospective study of 12 cases. *Vet Rec.* 186(18). doi:10.1136/vr.105642. [accessed 2022 Oct 7].

Bexfield N. 2017. Canine Idiopathic Chronic Hepatitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 47(3):645–663. doi:10.1016/j.cvsm.2016.11.012.

Bexfield NH. 2012. Breed, age and gender distribution of dogs with chronic hepatitis in the United Kingdom. *Vet J.*:5.

Bexfield NH, Andres-Abdo C, Scase TJ, Constantino-Casas F, Watson PJ. 2011. Chronic hepatitis in the English springer spaniel: clinical presentation, histological description and outcome. *Vet Rec.* 169(16):415–415. doi:10.1136/vr.d4665.

Boisclair J, Doré M, Beauchamp G, Chouinard L, Girard C. 2001. Characterization of the Inflammatory Infiltrate in Canine Chronic Hepatitis. *Vet Pathol.* 38(6):628–635. doi:10.1354/vp.38-6-628.

Boomkens SY, Penning LC, Egberink HF, van den Ingh TSGAM, Rothuizen J. 2004. Hepatitis with special reference to dogs. A review on the pathogenesis and infectious etiologies, including unpublished results of recent own studies. *Vet Q.* 26(3):107–114. doi:10.1080/01652176.2004.9695174.

Buob S, Johnston AN, Webster CRL. 2011. Portal Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment: Portal Hypertension. *J Vet Intern Med.* 25(2):169–186. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00691.x.

Center SA, Warner KL, Erb HN. 2002. Liver glutathione concentrations in dogs and cats with naturally occurring liver disease. *Am J Vet Res.* 63(8):1187–1197. doi:10.2460/ajvr.2002.63.1187.

Center SA, Warner KL, McCabe J, Foureman P, Hoffmann WE, Erb HN. 2005. Evaluation of the influence of S-adenosylmethionine on systemic and hepatic effects of prednisolone in dogs. *Am J Vet Res.* 66(2):330–341. doi:10.2460/ajvr.2005.66.330.

Chapman SE, Hostutler RA. 2013. A Laboratory Diagnostic Approach to Hepatobiliary Disease in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 43(6):1209–1225. doi:10.1016/j.cvsm.2013.07.005.

Dirksen K, Fieten H. 2017. Canine Copper-Associated Hepatitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 47(3):631–644. doi:10.1016/j.cvsm.2016.11.011.

Dirksen K, Verzijl T, Grinwis GC, Favier RP, Penning LC, Burgener IA, Laan LJ, Fieten H, Spee B. 2016. Use of Serum Micro RNA s as Biomarker for Hepatobiliary Diseases in Dogs. *J Vet Intern Med.* 30(6):1816–1823. doi:10.1111/jvim.14602.

Dyggve H, Kennedy LJ, Meri S, Spillmann T, Lohi H, Speeti M. 2011. Association of Doberman hepatitis to canine major histocompatibility complex II. *Tissue Antigens.* 77(1):30

Elhiblu MA, Dua K, Mohindroo J, Mahajan SK, Sood NK, Dhaliwal PS. 2015. Clinico-hemato-biochemical profile of dogs with liver cirrhosis. *Vet World*. 8(4):487–491. doi:10.14202/vetworld.2015.487-491.

Eulenberg VM, Lidbury JA. 2018. Hepatic Fibrosis in Dogs. *J Vet Intern Med*. 32(1):26–41. doi:10.1111/jvim.14891.

Favier RP, Poldervaart JH, van den Ingh TSGAM, Penning LC, Rothuizen J. 2013. A retrospective study of oral prednisolone treatment in canine chronic hepatitis. *Vet Q*. 33(3):113–120. doi:10.1080/01652176.2013.826881.

Fieten H, Biourge VC, Watson AL, Leegwater PAJ, van den Ingh TSGAM, Rothuizen J. 2014. Nutritional management of inherited copper-associated hepatitis in the Labrador retriever. *Vet J*. 199(3):429–433. doi:10.1016/j.tvjl.2013.12.017.

Fieten H, Biourge VC, Watson AL, Leegwater PAJ, van den Ingh TSGAM, Rothuizen J. 2015. Dietary Management of Labrador Retrievers with Subclinical Hepatic Copper Accumulation. *J Vet Intern Med*. 29(3):822–827. doi:10.1111/jvim.12574.

Fieten Hille, Dirksen K, van den Ingh TSGAM, Winter EA, Watson AL, Leegwater PAJ, Rothuizen J. 2013. d-penicillamine treatment of copper-associated hepatitis in Labrador retrievers. *Vet J*. 196(3):522–527. doi:10.1016/j.tvjl.2012.12.013.

Fieten H., Huguenot S, van den Ingh TSGAM, Hendriks WH, Vernooij JCM, Bode P, Watson AL, Leegwater PAJ, Rothuizen J. 2013. Urinary excretion of copper, zinc and iron with and without D-penicillamine administration in relation to hepatic copper concentration in dogs. *Vet J*. 197(2):468–473. doi:10.1016/j.tvjl.2013.03.003.

Fry W, Lester C, Etedal NM, Shaw S, DeLaforcade A, Webster CRL. 2017. Thromboelastography in Dogs with Chronic Hepatopathies. *J Vet Intern Med*. 31(2):419–426. doi:10.1111/jvim.14639.

Gaschen L. 2009. Update on Hepatobiliary Imaging. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 39(3):439–467. doi:10.1016/j.cvsm.2009.02.005.

Gómez Selgas A, Bexfield N, Scase TJ, Holmes MA, Watson P. 2014. Total serum bilirubin as a negative prognostic factor in idiopathic canine chronic hepatitis. *J Vet Diagn Invest*. 26(2):246–251. doi:10.1177/1040638713520602.

Gow AG. 2017. Hepatic Encephalopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 47(3):585–599. doi:10.1016/j.cvsm.2016.11.008.

Guo T, Chang L, Xiao Y, Liu Q. 2015. S-Adenosyl-L-Methionine for the Treatment of Chronic Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Bruns H, editor. *PLOS ONE*. 10(3):e0122124. doi:10.1371/journal.pone.0122124.

Heading K, Brockley L, Bennett P. 2011. CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002-07): SMALL ANIMALS. *Aust Vet J*. 89(4):109–116. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00690.x.

Hirose N, Uchida K, Kanemoto H, Ohno K, Chambers JK, Nakayama H. A Retrospective Histopathological Survey on Canine and Feline Liver Diseases at the University of Tokyo between 2006 and 2012. :6.

Hoffmann G. Copper-Associated Chronic Hepatitis in Labrador Retrievers. :6. Ingh TSGAM, Rothuizen J. 1994. Lobular Dissecting Hepatitis in Juvenile and Young Adult

Dogs. *J Vet Intern Med.* 8(3):217–220. doi:10.1111/j.1939-1676.1994.tb03219.x.

James F, Knowles G, Mansfield C, Robertson I. 2008. Ascites due to pre-sinusoidal portal hypertension in dogs: a retrospective analysis of 17 cases. *Aust Vet J.* 86(5):180–186. doi:10.1111/j.1751-0813.2008.00284.x.

Jensen AL, Nielsen OL. 1991. Chronic Hepatitis in Three Young Standard Poodles. *J Vet Med Ser A.* 38(1–10):194–197. doi:10.1111/j.1439-0442.1991.tb01001.x.

Kanemoto H, Ohno K, Sakai M, Nakashima K, Takahashi M, Fujino Y, Tsujimoto H. 2009. Blood Hyaluronic Acid as a Marker for Canine Cirrhosis. *J Vet Med Sci.* 71(9):1251–1254. doi:10.1292/jvms.71.1251.

Kanemoto H, Sakai M, Sakamoto Y, Spee B, van den Ingh TSGAM, Schotanus BA, Ohno K, Rothuizen J. 2013. American Cocker Spaniel Chronic Hepatitis in Japan. *J Vet Intern Med.* 27(5):1041–1048. doi:10.1111/jvim.12126.

Kavanagh C, Shaw S, Webster CRL. 2011. Coagulation in hepatobiliary disease. *J Vet Emerg Crit Care.* 21(6):589–604. doi:10.1111/j.1476-4431.2011.00691.x.

Kilpatrick S. 2016. Pathogenesis of Canine Liver Disease. :92.

Kushner PA, Cobble ME. 2016. Hypertriglyceridemia: the importance of identifying patients at risk. *Postgrad Med.* 128(8):848–858. doi:10.1080/00325481.2016.1243005.

Kutsunai M, Kanemoto H, Fukushima K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. 2014. The association between gall bladder mucocoeles and hyperlipidaemia in dogs: A retrospective case control study. *Vet J.* 199(1):76–79. doi:10.1016/j.tvjl.2013.10.019.

Larson MM. 2016. Ultrasound Imaging of the Hepatobiliary System and Pancreas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 46(3):453–480. doi:10.1016/j.cvsm.2015.12.004.

Lee S, Kweon O, Kim WH. 2017. Associations between serum leptin levels, hyperlipidemia, and cholelithiasis in dogs. Guccione J, editor. *PLOS ONE.* 12(10):e0187315. doi:10.1371/journal.pone.0187315.

Lidbury JA. 2017. Getting the Most Out of Liver Biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 47(3):569–583. doi:10.1016/j.cvsm.2016.11.007.

Lidbury JA. 2015. Canine Chronic Hepatitis: Diagnostic Evaluation and Complicating Syndromes. :126.

Lidbury JA, Ivanek R, Suchodolski JS, Steiner JM. 2015. Putative precipitating factors for hepatic encephalopathy in dogs: 118 cases (1991–2014). *J Am Vet Med Assoc.* 247(2):176–183. doi:10.2460/javma.247.2.176.

Mandigers PJJ, van den Ingh TSGAM, Spee B, Penning LC, Bode P, Rothuizen J. 2004. Chronic hepatitis in Doberman pinschers. A review. *Vet Q.* 26(3):98–106. doi:10.1080/01652176.2004.9695173.

Mazaki-Tovi M, Segev G, Yas-Natan E, Lavy E. 2012. Serum gastrin concentrations in dogs with liver disorders. *Vet Rec.* 171(1):19–19. doi:10.1136/vr.100627.

McCallum KE, Constantino-Casas F, Cullen JM, Warland JH, Swales H, Lingham N, Kortum AJ, Sterritt AJ, Cogan T, Watson PJ. 2019. Hepatic leptospiral infections in dogs

without obvious renal involvement. *J Vet Intern Med.* 33(1):141–150. doi:10.1111/jvim.15340.

Menard M, Lecoindre A, Cadoré J-L, Chevallier M, Pagnon A, Hernandez J, Oliveira Leal R, Hugonnard M, Miette V, Destro M, et al. 2019. Use of serum biomarkers in staging of canine hepatic fibrosis. *J Vet Diagn Invest.* 31(5):665–673. doi:10.1177/1040638719866881.

Oosthuizen W, Ten Berg PWL, Francis B, Campbell S, Macklin V, Milne E, Gow AG, Fisher C, Mellanby RJ, Dear JW. 2018. Sensitivity and specificity of microRNA-122 for liver disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 32(5):1637–1644. doi:10.1111/jvim.15250.

Pena-Ramos J, Barker L, Saiz R, Walker DJ, Tappin S, Hare CHZ, Roberts ML, Williams TL, Bexfield N. 2021. Resting and postprandial serum bile acid concentrations in dogs with liver disease. *J Vet Intern Med.* 35(3):1333–1341. doi:10.1111/jvim.16134.

Petre SL, McClaran JK, Bergman PJ, Monette S. 2012. Safety and efficacy of laparoscopic hepatic biopsy in dogs: 80 cases (2004–2009). *J Am Vet Med Assoc.* 240(2):181–185. doi:10.2460/javma.240.2.181.

Poldervaart JH, Favier RP, Penning LC. Primary Hepatitis in Dogs: A Retrospective Review (2002–2006). :9.

Prins M, Schellens CJMM, van Leeuwen MW, Rothuizen J, Teske E. 2010. Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *Vet J.* 185(2):163–168. doi:10.1016/j.tvjl.2009.05.009.

Raffan E, McCallum A, Scase TJ, Watson PJ. 2009. Ascites is a Negative Prognostic Indicator in Chronic Hepatitis in Dogs. *J Vet Intern Med.* 23(1):63–66. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0230.x.

Reece J, Pavlick M, Penninck DG, Webster CRL. 2020. Hemorrhage and complications associated with percutaneous ultrasound guided liver biopsy in dogs. *J Vet Intern Med.* 34(6):2398–2404. doi:10.1111/jvim.15942.

Rodrigues A, Leal RO, Girod M, Dally C, Guery E, Gomes E, Hernandez J. 2020. Canine copper-associated hepatitis: A retrospective study of 17 clinical cases. *Open Vet J.* 10(2). doi:10.4314/ovj.v10i2.2. [accessed 2022 Sep 20]. <https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/198668>.

Sakamoto Y, Sakai M, Watari T. Hepatic and Plasma Endothelin-1 in Dogs with Chronic Hepatitis. :6.

Sevelius E, Andersson M. 1994. Hepatic Accumulation of Alpha-I-antitrypsin in Chronic Liver Disease in the Dog. :12.

Shih JL, Keating JH, Freeman LM, Webster CRL. 2007. Chronic Hepatitis in Labrador Retrievers: Clinical Presentation and Prognostic Factors. *J Vet Intern Med.* 21(1):33–39. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb02925.x.

Smedley R, Mullaney T, Rumbleha W. 2009. Copper-Associated Hepatitis in Labrador Retrievers. *Vet Pathol.* 46(3):484–490. doi:10.1354/vp.08-VP-0197-S-FL.

Speeti M, Ståhls A, Meri S, Westermarck E. 2003. Upregulation of major histocompatibility complex class II antigens in hepatocytes in Doberman hepatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 96(1–2):1–12. doi:10.1016/S0165-2427(03)00134-X.

Szatmári V, Rothuizen J. 2006. Ultrasonographic identification and characterization of

congenital portosystemic shunts and portal hypertensive disorders in dogs and cats. In: WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases. Elsevier. p. 15–39. [accessed 2023 Jan 6].  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702027918500071>.

Twedt DC. 1998. Reactive Hepatopathies and Chronic Hepatitis in the Dog. *Vet Q.* 20(sup1):S46–S47. doi:10.1080/01652176.1998.10807405.

Ullal T, Ambrosini Y, Rao S, Webster CRL, Twedt D. 2019. Retrospective evaluation of cyclosporine in the treatment of presumed idiopathic chronic hepatitis in dogs. *J Vet Intern Med.* 33(5):2046–2056. doi:10.1111/jvim.15591.

Wagner KA, Hartmann FA, Trepanier LA. 2007. Bacterial Culture Results from Liver, Gallbladder, or Bile in 248 Dogs and Cats Evaluated for Hepatobiliary Disease: 1998-2003. *J Vet Intern Med.* 21(3):417–424. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb02984.x.

Wang KY, Panciera DL, Al-Rukibat RK, Radi ZA. 2004. Accuracy of ultrasound-guided fine-needle aspiration of the liver and cytologic findings in dogs and cats: 97 cases (1990–2000). *J Am Vet Med Assoc.* 224(1):75–78. doi:10.2460/javma.2004.224.75.

Watson P. 2017. Canine Breed-Specific Hepatopathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 47(3):665–682. doi:10.1016/j.cvsm.2016.11.013.

Watson PJ. 2004. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. *Vet J.* 167(3):228–241. doi:10.1016/S1090-0233(03)00118-7.

Watson PJ, Roulois AJA, Scase TJ, Irvine R, Herrtage ME. 2010. Prevalence of hepatic lesions at post-mortem examination in dogs and association with pancreatitis. *J Small Anim Pract.* 51(11):566–572. doi:10.1111/j.1748-5827.2010.00996.x.

Webb CB, Twedt DC, Meyer DJ. 2002a. Copper-Associated Liver Disease in Dalmatians: A Review of 10 Dogs (1998-2001). *J Vet Intern Med.* 16(6):665–668. doi:10.1111/j.1939-1676.2002.tb02405.x.

Webb CB. 2017. Canine Inflammatory/Infectious Hepatic Disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8<sup>th</sup> edition. St. Louis, Missouri: Elsevier. Chapter 282, Chronic Hepatitis; p.3971-3978

Webster CRL, Center SA, Cullen JM, Penninck DG, Richter KP, Twedt DC, Watson PJ. 2019. ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. *J Vet Intern Med.* 33(3):1173–1200. doi:10.1111/jvim.15467.

Webster CRL, Cooper J. 2009. Therapeutic Use of Cytoprotective Agents in Canine and Feline Hepatobiliary Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 39(3):631–652. doi:10.1016/j.cvsm.2009.02.002.

Wilkinson A, Panciera D, DeMonaco S, Boes K, Leib M, Clapp K, Ruth J, Cecere T, McClendon D. 2022. Platelet function in dogs with chronic liver disease. *J Small Anim Pract.* 63(2):120–127. doi:10.1111/jsap.13342.

Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. 2007. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *Can Med Assoc J.* 176(8):1113–1120. doi:10.1503/cmaj.060963.