

JOÃO PAULO CÂMARA FLORÊNCIO

**Caracterização do carcinoma colangiocelular e da apoptose em
papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*)**

São Paulo

2022

JOÃO PAULO CÂMARA FLORÊNCIO

**Caracterização do carcinoma colangiocelular e da apoptose em papagaios-
verdadeiros (*Amazona aestiva*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Claudia Momo

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4170
FMVZ

Florêncio, João Paulo Câmara
Caracterização do carcinoma colangiocelular e da apoptose em papagaios-verdadeiros
(*Amazona aestiva*) / João Paulo Câmara Florêncio. – 2022.
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Momo.

1. Aves. 2. Fígado. 3. Neoplasia. 4. Psitacídeos. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 9th February 2022

CERTIFIED

We certify that the Research "CHARACTERIZATION OF COLANGIOCELLULAR CARCINOMA AND LOCAL INFLAMMATORY INFILTRATE IN BLUE FRONTED AMAZON (*Amazona aestiva*)", protocol number CEUAX 1212280120 (ID 001318), under the responsibility Cláudia Momo, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day February 12, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DO CARCINOMA COLANGIOCELULAR E DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO LOCAL EM PAPAGAIOS-VERDADEIROS (*Amazona aestiva*)", protocolado sob o CEUAX nº 1212280120, sob a responsabilidade de Cláudia Momo, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 12 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 03 de fevereiro de 2022

CEUax N [1212280120](#)

(ID 001470)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Cláudia Momo
Área: Patologia Experimental E Comparada

Título da proposta: "CARACTERIZAÇÃO DO CARCINOMA COLANGIOCELULAR E DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO LOCAL EM PAPAGAIOS-VERDADEIROS (Amazona aestiva)".

CERTIFICADO (Emenda versão de 29/agosto/2021)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 29/agosto/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Devido á dificuldade na aquisição de material para o projeto, realizamos a alteração do enfoque e do título, para "Caracterização do carcinoma colangiocelular e da apoptose em papagaios-verdadeiros (Amazona aestiva)[]".

Comentário da CEUA: Solicitação de alteração do título. Sem óbices para aprovação.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FLORENCIO, João Paulo Câmara

Título: Caracterização do carcinoma colangiocelular e da apoptose em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho aos incansáveis pesquisadores brasileiros que, mesmo frente a tantas adversidades, são capazes de produzir ciência nesse injusto país.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.476232/2020-00.

Um projeto como esse não surge do nada e não é possível apenas pela força de um ou dois pesquisadores, pois, aqueles que nos rodeiam e nos mantêm firmes são essenciais para a continuidade da ciência. Agradeço, inicialmente, aos animais do meu estudo pela contribuição inenarrável ao avanço da pesquisa na medicina veterinária.

Agradeço aos meus pais, Vilson e Ana pelo companheirismo em todos esses meus 25 anos de trajetória e por sempre apoiarem meus ideais por mais estranhos que pudessem parecer na época. Obrigado pelos conselhos, por ouvirem meus choros, por me ajudarem na transição a São Paulo e por me manterem de pé. Eu não seria nada sem vocês.

Não poderia esquecer também de meu irmão Luiz, agora de família formada, com minha cunhada Grasi e meu sobrinho Guilherme, que sempre esteve do meu lado em todas as adversidades e sempre me apoiou nos momentos mais difíceis. Na finalização desse trabalho, estamos aguardando a chegada da mais nova integrante da família, minha sobrinha Letícia. Que venha com muita saúde!

Agradeço também aos meus amigos, todos de diversas origens, que conheci nos locais e momentos mais aleatórios. Alguns encontrei há mais de dez anos e formaram parte preponderante de minha trajetória, outros ainda tão recentes, contudo, que já cravaram seu nome em minha história. Suas conversas, companhias em festas e bares, danças com música alta na sala de estar e conselhos foram essenciais na

manutenção de minha saúde mental. Espero que logo possamos comemorar a obtenção desse novo título em minha vida.

Agradeço ao Instituto Federal Catarinense pela minha formação como médico veterinário através de professores incríveis e uma equipe técnica exemplar que lutam todos os dias pela manutenção de uma educação pública, gratuita e de qualidade. Os momentos que tive dentro da instituição são belas memórias que guardarei comigo pela eternidade.

Agradeço à FMVZ pelo espaço que me foi dado para execução desse projeto e, essencialmente, ao VPT e toda sua equipe tão dedicada e sempre tão preparada para ouvir meus anseios, sanar minhas dúvidas e me ajudar em tudo que foi necessário. Aos técnicos, professores e outros, meu muito obrigado!

Agradeço também aos motoristas de ônibus, cozinheiros do restaurante universitário, pessoal da limpeza e todas as outras profissões tão apagadas no dia a dia, porém que são tão necessárias na manutenção da formação dessa incrível instituição que é a USP.

Um agradecimento especial aos colegas pós-graduandos, residentes e estagiários com os quais passei os momentos mais incríveis de toda minha estadia no VPT desde 2019, sempre dispostos a me ajudar, ensinar, conversar e contar ocasionais fofocas acompanhadas de uma xícara de café. Os momentos com vocês foram inesquecíveis!

Por fim, o agradecimento maior desse estudo vem acompanhado de uma saudade também: minha orientadora Claudia Momo. Conheci-a no estágio em 2019 e, desde então, formamos um grupo infalível de trabalho, ainda que tão diferentes. Nessa loucura que foi meu mestrado, a professora Claudia foi meu maior alicerce, a pessoa que me manteve ali firme em todos esses anos. Se não fosse por ela, eu teria

desistido muito antes, entretanto, com seu sorriso no rosto, paciência e compaixão, ela me demonstrou que o caminho da ciência também carrega consigo suas alegrias.

Tudo a você, prof!

“Vocês jovens, doutores, cientistas do futuro, não se deixem abalar por um ceticismo estéril, nem se deixem desencorajar pela tristeza de certas horas que as nações passam.”

Louis Pasteur (1822-1895)

RESUMO

FLORÊNCIO, J.P.C. **Caracterização do carcinoma colangiocelular e da apoptose em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*)**. 2022. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022

O carcinoma colangiocelular é um importante tumor primário de ductos biliares que acomete várias espécies, porém, é tido como mais comum em aves não domésticas do que em outros animais. Suas etiologias não são bem identificadas e vários fatores podem levar ao desenvolvimento da neoplasia, especialmente aqueles que propiciam inflamação crônica em vias biliares. Diferentes padrões do tumor já foram classificados na microscopia em humanos e auxiliam na determinação do prognóstico e curso da enfermidade e possíveis protocolos terapêuticos que podem ser instituídos. Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo realizar caracterização completa da microscopia do carcinoma colangiocelular. Dessa forma, foram avaliados fígados de doze papagaios-verdadeiros provenientes do Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo através de exame histopatológico de fragmentos do órgão em lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina, além da submissão dos fragmentos à técnica de imuno-histoquímica com os marcadores Bcl-2 e Caspase-3. Observou-se a apresentação de duas formas distintas da neoplasia na microscopia, uma com formação de ductos biliares bem diferenciados e outra com um arranjo sólido de células e ocasionais ductos biliares irregulares. Também, constatou-se diferença significativa entre animais acometidos pela neoplasia e os do grupo controle em células basais de ductos biliares para ambos os marcadores.

Palavras-chave: Aves. Fígado. Neoplasia. Psitacídeos.

ABSTRACT

FLORÊNCIO, J.P.C. **Characterization of cholangiocellular carcinoma and apoptosis in turquoise-fronted amazon (*Amazona aestiva*)**. 2022. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Cholangiocellular carcinoma is an important primary bile duct tumor that affects several species, however, it is considered to be more common in non-domestic birds than in other animals. Its etiologies are not well identified, and many factors can lead to the neoplasm's development, especially those that provide chronic inflammation in the bile ducts. Different tumor patterns have already been classified in human microscopy and help to determine the prognosis and course of the disease and possible therapeutic protocols that can be instituted. Therefore, the present study aimed to perform a complete characterization of the microscopy of cholangiocellular carcinoma. Thus, livers of twelve parrots from the Animal Pathology Service of the Veterinary Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics of the University of São Paulo were evaluated through histopathological examination of organ fragments on slides stained with Hematoxylin and Eosin, in addition to the fragments submission to the immunohistochemistry technique with Bcl-2 and Caspase-3 markers. The presentation of two distinct neoplasm forms on microscopy was observed, one with well-differentiated bile duct formation and other with a solid arrangement of cells and occasional irregular bile ducts. Also, there was a significant difference between animals affected by the neoplasm and those of the control group in basal cells of bile ducts for both markers.

Keywords: Birds. Liver. Neoplasm. Psittacines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões microscópicos do carcinoma colangiocelular	22
Tabela 2 - Anticorpos primários, diluições, anticorpos secundários, local de marcação celular e forma de recuperação antigênica utilizados na reação imuno-histoquímica de fígados de papagaios-verdadeiros com carcinoma colangiocelular	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PAPAGAIO-VERDADEIRO	17
2.2	FÍGADO DE AVES	18
2.2.1	Anatomia	18
2.2.2	Histologia	18
2.3	CARCINOMA COLANGIOCELULAR	19
2.3.1	Epidemiologia e fatores de risco	19
2.3.2	Descrição e classificação	20
2.3.3	Sinais clínicos	22
2.3.4	Diagnóstico	23
2.3.5	Tratamento e prognóstico	23
2.4	APOPTOSE	24
3	DESCRIÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DO CARCINOMA COLANGIOCELULAR EM DOZE PAPAGAIOS-VERDADEIROS (<i>Amazona aestiva</i>)	26
3.1	INTRODUÇÃO	26
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1	Caracterização da neoplasia	27
3.2.2	Análise imuno-histoquímica	28
3.2.3	Análise estatística	29
3.3	RESULTADOS	29
3.3.1	Caracterização da neoplasia	29
3.3.2	Análise imuno-histoquímica	31
3.4	DISCUSSÃO	32
3.5	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE A – Fotomicrografias dos fígados avaliados	41
4	CONCLUSÕES GERAIS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, com o aumento da procura por psitacídeos como animais de estimação, a longevidade e alimentação dos papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) mudaram significativamente, permitindo o aparecimento de enfermidades consideradas pouco vistas nessa espécie, a exemplo de diversas neoplasias (TULLY; DORRESTEIN; JONES, 2009).

O carcinoma colangiocelular (CC) é um tumor primário que acomete o fígado, apresenta crescimento rápido e alta capacidade invasiva. É composto por proliferação neoplásica de ductos biliares, podendo afetar uma série de espécies domésticas e selvagens, considerado mais frequente em aves do que nos mamíferos (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015; CULLEN, 2017). É um tumor pouco estudado na medicina veterinária, com a maior parte das informações provenientes de pesquisas realizadas em cães e gatos.

A maioria dos casos de CC não possui etiologia conhecida e é considerada como uma neoplasia de desenvolvimento espontâneo. Contudo, alguns fatores podem estimular a carcinogênese do CC, como enfermidades que propiciam inflamação crônica, alguns vírus, o parasita *Clonorchis sinensis*, a aflatoxina e diversos agentes químicos (CHANG, 1965; DAVIES, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Em aves, existe uma relação previamente relatada entre tumores de vias biliares e papilomas cloacais, comumente diagnosticados em papagaios neotropicais e frequentemente causados por herpesvirus e papilomavirus, entretanto, tal relação ainda não foi extensivamente pesquisada (JOHNE et al., 2002; SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015).

Os sinais clínicos apresentados são inespecíficos e mimetizam afecções hepáticas comuns. Os animais podem apresentar dores abdominais, êmese, letargia, anorexia, perda de peso e ascite e, ademais, diversas aves podem não apresentar sinais aparentes até fases mais avançadas da enfermidade, e a morte súbita pode ser o único indicativo (TULLY; DORRESTEIN; JONES, 2009; NAGY et al., 2014).

Hemograma e exame bioquímico de função hepática podem não apresentar alterações ou demonstrarem apenas indícios da existência de lesão no fígado, e os exames ultrassonográfico e radiográfico, ainda que oportunos, não são exames diagnósticos (PATNAIK; HURVITZ; LIEBERMAN, 1980; CULLEN, 2017).

O CC possui apresentações macro e microscópicas distintas, possibilitando que seja classificado em uma série de padrões. Anatomicamente, são divididos em intra-hepático, peri-hilar e distal, podendo, também, ser classificados por seu aspecto macroscópico, que varia desde uma grande formação única até nódulos disseminados pelo parênquima hepático, ou, ainda, pelo aspecto microscópico, segundo a aparência do tecido e morfologia celular (NAKANUMA; KAKUDA, 2015). Na medicina veterinária, entretanto, estudos do tipo em papagaios-verdadeiros não foram realizados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PAPAGAIO-VERDADEIRO

O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é uma ave pertencente à ordem Psittaciformes e família Psittacidae que habita uma variedade de países da América do Sul, como Argentina, Bolívia, Paraguai e, predominantemente, no Brasil, no qual ocorre nas regiões norte e nordeste (GRES PAN; RASO, 2014). Com o avanço da urbanização, destruição de habitats e tráfico, passou a ser encontrada em regiões urbanizadas do país, como sul e sudeste (TULLY; DORRESTEIN; JONES, 2009).

É considerado um animal quase ameaçado de extinção, com uma tendência de diminuição populacional em todos os países nos quais é encontrado originalmente (SCHUNCK et al., 2011). Pesquisas recentes demonstraram quedas maiores na Bolívia e menores no serrado brasileiro e no chaco argentino, contudo, os dados de estudos genéticos completos realizados com a espécie revelaram uma estabilidade na sua diversidade (LEITE et al., 2008; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019). São variados os ecossistemas nos quais a espécie pode habitar; desde o cerrado, florestas de palmeiras, florestas subtropicais e, atualmente, áreas urbanas pelo escape e liberação (SICK, 1997).

O desbalanço nutricional da espécie em cativeiro é um dos desafios encontrados na clínica, pois muitos indivíduos recebem alimentação constituída apenas de sementes ou frutas, acarretando deficiência proteica, de cálcio e de outros nutrientes essenciais (GRES PAN; RASO, 2014). Ademais, dietas altamente energéticas susceptibilizam a ave a afecções hepáticas e acúmulo de gordura subcutânea (TULLY; DORRESTEIN; JONES, 2009).

Finalmente, como se trata de uma espécie sociável e de bom temperamento, além da capacidade de mimetizar sons e adaptar-se ao convívio com o ser humano, é procurada como animal de estimação frequentemente (SICK, 1997; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019). Esse fato pode permitir maior longevidade e a maior propensão de neoplasias primárias aparecerem, incluindo o carcinoma colangiocelular.

2.2 FÍGADO DE AVES

2.2.1 Anatomia

O fígado das aves é bilobado e de cada lobo origina-se um ducto biliar que desemboca em diferentes regiões dependendo da presença ou não de vesícula biliar. Em papagaios, o lobo direito é maior, serve como passagem à veia cava caudal e conecta-se ao esquerdo cranialmente, na região dorsal do coração, assim como, pela ausência de diafragma, ambos envolvem a porção caudal deste órgão (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994).

À abertura da cavidade celomática, o fígado é um dos primeiros órgãos a ser visualizado, pelo seu tamanho relativamente grande em relação a outros órgãos, e superficialidade (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015). Sua face parietal é próxima às costelas e esterno, e a face visceral comunica-se com baço, proventrículo, ventrículo, duodeno e jejuno (COLVILLE; BASSERT, 2016).

Vesícula biliar pode estar presente ou ausente dependendo da espécie. Galinhas, patos, gansos e tucanos, por exemplo, possuem a vesícula localizada na superfície visceral do fígado, drenando conteúdo do ducto biliar direito, enquanto em pombos, papagaios e avestruzes, há ausência do órgão e ambos os ductos desembocam na porção distal do duodeno (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994).

2.2.2 Histologia

Microscopicamente, o fígado não se organiza na estrutura característica em lóbulos de mamíferos, portanto, é visualizado como um parênquima homogêneo com distribuição de vasos sanguíneos (BACHA; BACHA, 2012). Placas de hepatócitos de duas células de largura se constituem com cordões dispostos radialmente a uma veia central ou centrolobular, separadas por capilares sinusoides e canálculos biliares (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015). Paralelamente aos sinusoides, organizam-se macrófagos modificados conhecidos como células de Kupffer (ABDUL-AZIZ; FLETCHER, 2016).

A veia porta, responsável pela drenagem de órgãos abdominais, divide-se ao entrar no fígado em distintos ramos que desembocam em regiões conhecidas como

tríade ou espaço porta, compostos, também, por ramos da artéria hepática e ductos biliares (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994). Dessa forma, o sangue flui do espaço porta a uma veia centrolobular, enquanto a bile flui dos canalículos biliares próximos à veia centrolobular e direciona-se aos ductos biliares anexos ao ramo da veia porta (COLVILLE; BASSERT, 2016).

Essa conformação entre espaço porta e veia central permite um arranjo da histologia hepática em três zonas: Z1 ou periportal, próxima ao espaço porta; Z3 ou centrolobular, adjacente à veia central; Z2 ou mediozonal, localizada entre as outras zonas (ABDUL-AZIZ; FLETCHER, 2016).

Ademais, a superfície do fígado é revestida por uma fina cápsula formada de tecido conjuntivo denso recoberta por peritônio e, também, podem ser visualizados pequenos agregados linfóides e áreas focais de hematopoiese extramedular (BACHA; BACHA, 2012).

2.3 CARCINOMA COLANGIOCELULAR

2.3.1 Epidemiologia e fatores de risco

A neoplasia já foi reportada em uma série de espécies domésticas, como cães, gatos, equinos e galinhas, além de espécies não domésticas, contudo, ainda que possa acometer diversos animais, é um tumor pouco estudado na medicina veterinária, com dados conflituosos (CULLEN; STALKER, 2016). A maior parte das informações disponíveis deriva de estudos realizados em cães e gatos.

Na espécie canina, neoplasias primárias de fígado são incomuns e o carcinoma hepatocelular é o representante mais frequente, ao passo que o carcinoma colangiocelular representa menos de 1% de todos os tumores diagnosticados nesses animais (CULLEN, 2017). Em aves, entretanto, esses valores invertem-se, pois neoplasias de ductos biliares são mais comuns nessas espécies do que as de hepatócitos (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015).

Em cães, o tumor acomete, normalmente, animais acima de dez anos, sem predisposição racial ou de gênero; em gatos, indivíduos acima de nove anos são mais afetados, também sem nenhuma predisposição (PATNAIK; HURVITZ; LIEBERMAN, 1980). Menos ainda se sabe sobre a incidência em grandes animais e nas aves. Nos

humanos, a frequência é ligeiramente maior em homens e em pacientes acima de 45 anos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

A maioria dos CC diagnosticados nas distintas espécies não possui uma etiologia conhecida e é considerada uma neoplasia de desenvolvimento espontâneo, entretanto, existem alguns fatores reconhecidos, notadamente em humanos, que estão associados com a neoplasia (CULLEN, 2017). Salieta-se que agentes etiológicos podem estar relacionados a tipos específicos do tumor, enquanto outros são concomitantes em todas as formas relatadas.

Enfermidades que propiciam inflamação crônica de vias biliares são consideradas um fator de risco comum em vários casos, pois predisõem à hiperplasia de células do epitélio biliar (CULLEN; STALKER, 2016). Ademais, existe uma associação relatada entre colangite esclerosante primária em pacientes humanos e o desenvolvimento de CC (CHAPMAN et al., 2012). Além disso, vírus como da hepatite B e C, parasitas hepáticos, tal qual *Clonorchis sinensis*, a aflatoxina e agentes químicos carcinogênicos foram identificados como agentes etiológicos tanto em animais quanto em humanos (CHANG, 1965; DAVIES, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Em aves, existe uma associação relatada em estudos prévios entre displasia em ductos biliares e papilomas cloacais, comumente diagnosticados em araras e papagaios, e frequentemente causados por herpesvirus ou papilomavirus (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015). Ademais, herpesvirus dos psitacídeos tipo 1 (PsHV1) é um achado recorrente em papilomas de mucosas em papagaios neotropicais (JOHNE et al., 2002). Em outras espécies, como tartarugas e carpas, também foi encontrada relação entre herpesvirus e papilomas cloacais (HEDRICK et al., 1990; QUACKENBUSH et al., 1998).

2.3.2 Descrição e classificação

Anatomicamente, o CC pode ser classificado em intra-hepático, peri-hilar e distal. A forma intra-hepática é definida como uma neoplasia localizada nos ductos biliares secundários no fígado; peri-hilar manifesta-se nos ductos hepáticos esquerdo e direito ou na junção dos mesmos; e o tipo distal acomete o ducto colédoco (KENDALL et al., 2019).

Macroscopicamente, a forma intra-hepática se apresenta como formadora de massa, em que há um largo tumor único de coloração acinzentada e consistência firme no parênquima hepático; periductal, com a visualização da neoplasia margeando os ductos biliares; e intraductal, no qual identifica-se um tumor polipoide ou papilar no lúmen de ductos dilatados (NAKANUMA & KAKUDA, 2015). A variedade formadora de massa é a mais frequente em humanos, representando cerca de 78% dos carcinomas intra-hepáticos diagnosticados, seguida pelas formas periductal e intraductal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Os padrões peri-hilar e distal possuem macroscopia semelhante, com um tipo esclerosante achatado, mais comum, e uma variedade intraductal papilar (NAKANUMA et al., 2010).

Na microscopia, a forma intra-hepática pode ser classificada em diferentes subtipos. O tipo convencional refere-se a um adenocarcinoma invasivo com estruturas ductulares de variados tamanhos, formadas por células cuboidais a colunares de citoplasma basofílico, além de diferentes graus de desmoplasia, processo inflamatório e a probabilidade da presença de mucina no interior dos ductos e necrose (KENDALL et al., 2019).

O tipo convencional pode, ainda, ser classificado em dois subtipos: ductos pequenos e ductos grandes. A forma de ductos pequenos é caracterizada por estruturas ductulares pequenas, de crescimento, geralmente, nodular e com lúmen distinto, e constituídas por células cuboidais ou colunares baixas de citoplasma escasso, ou formando estruturas que se assemelham a cordões com fendas (NAKANUMA & KAKUDA, 2015).

O padrão de ductos grandes é composto por largas estruturas ductulares, ocasionalmente esclerosadas ou coalescendo, que se originam dos espaços porta e invadem o parênquima hepático, com desmoplasia moderada à intensa e células colunares apresentando, comumente, cariomegalia (SIGEL et al., 2018). Ambas as formas podem ser estagiadas segundo a sua apresentação na histologia em bem, moderadamente ou pouco diferenciadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Outra apresentação de CC é a ductular biliar, composta por estruturas ductulares bem a moderadamente diferenciadas e de crescimento homogêneo que, eventualmente, podem ser visualizadas como cordões de células neoplásicas sem a presença de lúmen, além de possuírem células cuboidais e marcante deposição de colágeno (KENDALL et al., 2019).

Ademais, o CC pode ser classificado como intraductal, um padrão considerado desafiador de ser identificado por suas formas distintas de crescimento. Ocasionalmente, manifesta-se como um tumor de crescimento papilar ou polipoide com boa a moderada diferenciação e ocasionais áreas compactas de adenocarcinoma, podendo também, raramente, disseminar-se de forma extensa por ductos extra e intra-hepáticos (NAKANUMA; KAKUDA, 2015).

Infrequentemente, algumas variantes menos comuns podem ser encontradas na histologia, como a forma escamosa ou adenoescamosa, mucinosa, de células claras, indiferenciada e linfoepitelial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Todas apresentam características específicas que permitem sua classificação e diferenciação.

As informações explicitadas acima podem ser visualizadas de forma resumida na tabela 1.

Tabela 1 - Padrões microscópicos do carcinoma colangiocelular

Convencional
<i>Ductos pequenos</i>
<i>Ductos grandes</i>
Ductular biliar
Intraductal
<i>Papilar</i>
<i>Tubular</i>
<i>Disseminado na superfície</i>
Variantes raras
<i>Escamoso</i>
<i>Mucinoso</i>
<i>Células claras</i>
<i>Indiferenciado</i>
<i>Linfoepitelial</i>

Fonte: Adaptado de Nakanuma e Kakuda, 2015.

2.3.3 Sinais clínicos

Na maioria dos casos, os sinais clínicos são inespecíficos e muito similares dentre as espécies. Ademais, os exames físico e laboratorial não são suficientes para diferenciar CC de carcinoma hepatocelular (CULLEN, 2017). Letargia, anorexia, êmese, perda de peso e dispneia são relatados em cães e gatos, e, ocasionalmente, animais cursam com polidipsia, poliúria e ascite, além da possível presença de uma massa hepática palpável no exame físico (PATNAIK; HURVITZ; LIEBERMAN, 1980;

NAGY et al., 2014; JARDIM et al., 2019). Também, aves podem não apresentar sinais clínicos reconhecíveis e a morte súbita torna-se o único indicativo da presença de enfermidade no animal (TULLY; DORRESTEIN; JONES, 2009; SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015).

Hemograma e exames bioquímicos podem não apresentar nenhuma alteração relevante, e enzimas que avaliam função hepática, como alanina aminotransferase e lactato desidrogenase, apenas demonstram indícios da existência de lesão no fígado, entretanto, não auxiliam na identificação ou diferenciação do tipo (PATNAIK; HURVITZ; LIEBERMAN, 1980).

2.3.4 Diagnóstico

Massas hepáticas podem ser identificadas em exames radiográfico e ultrassonográfico, porém, são melhores avaliadas em outras técnicas de imagem, como tomografia computadorizada (VALLE et al., 2016).

A realização de exame histopatológico é a forma de diagnosticar, classificar e diferenciar a neoplasia de outros tipos com o objetivo de instituir o melhor protocolo terapêutico ao paciente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Lâminas coradas com hematoxilina e eosina são suficientes para diferenciação entre CC e carcinoma hepatocelular pela ausência de estruturas ductulares ou acinares completas no segundo (KENDALL et al., 2019).

Maiores dificuldades ocorrem na diferenciação do CC de adenocarcinomas metastáticos pelas suas apresentações similares na microscopia, portanto, nesses casos, é impreterível conhecer o histórico completo do animal e realizar observação minuciosa na cirurgia ou necropsia na busca de identificar massas ou nódulos em outros órgãos, com especial atenção para pâncreas, intestino e útero (CULLEN; STALKER, 2016).

2.3.5 Tratamento e prognóstico

O tratamento de CC deve levar em conta vários aspectos envolvendo a classificação da neoplasia, seu tamanho, invasão tecidual, presença ou ausência de metástases e o estado geral do paciente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). A ressecção cirúrgica pode ser indicada, contudo, como os sinais clínicos são

inespecíficos, muitas neoplasias são descobertas em estados avançados nos quais a cirurgia não é mais recomendada e apenas tratamentos paliativos devem ser realizados (CULLEN, 2017). Na medicina veterinária não há tratamento paliativo específico e indicado para CC. Em humanos, quimioterapia sistêmica com o uso de gentamicina e cisplatina é prescrita na maioria dos pacientes (VALLE et al., 2016).

Como os animais afetados estão, frequentemente, em uma faixa etária mais elevada, outras enfermidades intercorrentes podem ser presenciadas, levando à necessidade de terapia de suporte na busca de manter o animal estável durante todos os procedimentos (PATNAIK; HURVITZ; LIEBERMAN, 1980).

A neoplasia possui um padrão altamente invasivo e faz metástases frequentes em várias espécies, podendo aparecer em 60 a 80% dos casos diagnosticados em cães, e com números altos também em gatos e bovinos, tendo como locais mais comuns de metástases os linfonodos, pulmões, peritônio e intestino, denotando que diversos sistemas podem ser atingidos (CULLEN; STALKER, 2016).

Dessa forma, por se tratar de um tumor agressivo e metastático, o prognóstico tende a ser desfavorável na maioria dos casos, especialmente nos que não há mais a possibilidade de ressecção cirúrgica (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015).

2.4 APOPTOSE

A apoptose é um processo complexo realizado por uma série de moléculas interligadas que culminarão na morte celular programada. É importante em distintos mecanismos fisiológicos para manutenção da homeostase e eliminação de células lesadas ou em mutações que são danosas ao organismo (ZACHARY; MCGAVIN, 2012). Apoptose ocorre, de forma simplificada, em duas vias: extrínseca e intrínseca.

A via extrínseca inicia-se pela associação e indução de outra célula àquela que sofrerá a morte celular. Através de sinalização realizada por receptores na membrana plasmática e proteínas ligantes, ocorre a transmissão de informação necessária à execução do processo no meio intracelular, ativando caspases iniciadoras da apoptose (ELMORE, 2007).

A via intrínseca, em contrapartida, envolve sinalizações intracelulares centradas na mitocôndria com o objetivo de promover modificações na membrana da organela (CZABOTAR et al., 2014). Essa via é controlada por proteínas da família Bcl-2, responsáveis pelas alterações em permeabilidade da membrana mitocondrial, que

são categorizadas em pró-apotóticas (Bax e Bak) ou anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x), e que constituem um balanço essencial para o funcionamento da morte celular e ordenação da liberação de conteúdo mitocondrial no citoplasma (GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999).

As vias intrínseca e extrínseca convergem na via de execução, na qual caspases executoras, especialmente caspase-3, ativam endonucleases citoplasmáticas e proteases responsáveis pela degradação de material celular (PORTER; JÄNICKE, 1999). A evasão de apoptose é uma das características mais preponderantes de neoplasias. Células neoplásicas são mantidas vivas e proliferam ao invés de submeterem-se à morte celular através da capacidade de desregular ou inativar diferentes moléculas controladoras do processo (ZACHARY; MCGAVIN, 2012).

3 ARTIGO: DESCRIÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DO CARCINOMA COLANGIOCELULAR E APOPTOSE EM DOZE PAPAGAIOS-VERDADEIROS (*Amazona aestiva*)

3.1 INTRODUÇÃO

Neoplasias que acometem ductos biliares são consideradas mais prevalentes em aves do que mamíferos e podem atingir qualquer ordem, contudo, relatos são comumente realizados em Psittaciformes (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015). CC já foi diagnosticado em distintas aves não domésticas, como periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*), pinguim-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*), flamingo-pequeno (*Phoeniconaias minor*) e ema (*Rhea americana*), entretanto, são poucos os estudos que visam caracterizar e classificar o tumor em aves (RENNER; ZAIAS; BOSSART, 2001; WETTERE; DEGERNES; BARNES, 2010; NOURI; MARJANMEHR; SASANI, 2012; ROCHA et al., 2015).

Frequentemente, CC é reportado como uma neoplasia sem etiologias identificáveis, porém, alguns fatores são potencialmente promotores desse tumor. A aflatoxina, toxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, foi caracterizada, em estudos prévios, como agente etiológico de hiperplasia em ductos biliares e lesões crônicas em fígado que podem levar ao desenvolvimento de tumores em aves domésticas (KUMAR; BALACHANDRAN, 2009). Ademais, pesquisas realizadas com vírus frequentemente diagnosticados em psitacídeos neotropicais, a exemplo de PsHV1, relataram uma associação com neoplasias de ductos biliares (JOHNE et al., 2002; STYLES et al., 2004).

Não há protocolos terapêuticos de eleição para CC na medicina veterinária e ressecção cirúrgica é, comumente, não recomendada, visto que a maioria dos tumores são diagnosticados tardiamente (CULLEN; STALKER, 2016). Também, como trata-se de uma neoplasia maligna e de alto potencial invasivo e metastático, seu prognóstico é reservado a desfavorável em todas as espécies (CULLEN, 2017). Metástases são frequentes em aves e foram relatadas, por exemplo, em pinguim e águia-real, atingindo rins, pulmões, testículos, pâncreas, adrenais, sacos aéreos, pericárdio, meninges e cloaca (MIKAELIAN et al., 1998; RENNER; ZAIAS; BOSSART, 2001).

Estudos realizados em humanos identificaram e caracterizaram diferentes padrões de CC, permitindo sua classificação em distintos tipos macro e microscopicamente, além da descrição de lesões pré-neoplásicas. Tais padrões permitem determinar a evolução da enfermidade após o diagnóstico, bem como auxiliar na delimitação de tratamentos curativos e paliativos e estipular o prognóstico do paciente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi realizar uma caracterização do carcinoma colangiocelular, por meio da avaliação macro e microscópica, além da quantificação da atividade apoptótica, por meio de análise imuno-histoquímica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da neoplasia

Foram avaliados fígados de doze papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) portadores de carcinoma colangiocelular, e outros seis sem alterações hepáticas para uso como grupo controle, todos provenientes da rotina do Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, previamente necropsiados

Os relatórios das necropsias foram revisados e as imagens capturadas no momento foram reavaliadas, com o intuito de obter a descrição macroscópica dos fígados das aves do estudo. Após, o exame histopatológico foi realizado utilizando fragmentos de fígado coletados durante a necropsia e fixados em formalina tamponada a 10% para confecção de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE).

Realizou-se avaliação microscópica dos tecidos corados nas lâminas e descrição da neoplasia, evidenciando características como seu tamanho, margens, formato, invasão tecidual, população e grau de diferenciação celular. Aspectos das células também foram avaliados, como tamanho, formato e características de núcleo e citoplasma. A aparência de estroma e infiltrado inflamatório e a presença ou não de mitoses, necrose e/ou hemorragia foram igualmente descritos.

Também se efetuou avaliação de outros órgãos, à procura de possíveis metástases e alterações pertinentes ao projeto. Os dados da avaliação foram tabelados, para melhor visualização de todos os pontos.

Ademais, a descrição microscópica foi relacionada com os achados macroscópicos descritos durante a necropsia para caracterização completa da neoplasia.

3.2.2 Análise imuno-histoquímica

A imunoimarrocação foi feita em cortes incluídos em parafina, por meio da técnica de imuno-histoquímica, conforme protocolo descrito por Tafuri et al. (2004). Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 2. O protocolo de imuno-histoquímica utilizado seguiu, resumidamente, os seguintes passos:

- 1) desparafinização dos cortes de fígado em estufa a 60°C por 1 hora;
- 2) hidratação dos cortes em soluções decrescentes de xilol e álcool e banho em água destilada;
- 3) recuperação antigênica (tabela 2), em solução tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0);
- 4) bloqueio da peroxidase endógena, utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 60 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura;
- 5) bloqueio das reações inespecíficas, com leite Molico® a 8% (92 mL de água destilada e 8g de leite Molico®) por 60 minutos, à temperatura ambiente;
- 6) incubação dos cortes com anticorpo primário, em diluição específica (tabela 2), e tempo de incubação de 18 horas a 4°C;
- 7) incubação dos cortes com o anticorpo secundário por 1 h, à temperatura ambiente (tabela 2);
- 8) utilização do cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – Dakocytomation (cód. K3468- 1) para revelar a reação.

Entre cada um dos passos descritos anteriormente realizaram-se lavagens em solução tampão Tris HCl, pH 7,9.

- 9) A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck, cód. HX888585).

Como controle negativo, foi excluído o anticorpo primário da reação, utilizando-se apenas o diluente de anticorpo (Dakocytomation, cód. S302283-2). Já, para o controle positivo, foram utilizados tecidos animais de acordo com a orientação do

fabricante de cada anticorpo. Para quantificar a imunomarcção em cada corte, foram contadas as células marcadas em cinco campos aleatórios, no aumento de 400X (microscópio Nikon Eclipse E200). A partir dos valores obtidos nestes campos, calculou-se uma média do número de células imunomarcadas por lâmina, sendo essas médias avaliadas em cada grupo. Médias foram obtidas a partir da contagem de células basais, ductais e inflamatórias com o intuito de analisar todos os grupos celulares marcados pelos anticorpos.

Tabela 2 – Anticorpos primários, diluições, anticorpos secundários, local de marcação celular e forma de recuperação antigênica utilizados na reação imuno-histoquímica de fígados de papagaios-verdadeiros com carcinoma colangiocelular

Anticorpo primário	Marcação celular	Recuperação antigênica	Diluição	Anticorpo secundário	Origem/marca/código
Anti-Bcl-2	Células em apoptose	<i>Steamer</i> a 60°C por 60 minutos	1:600	EnVision® ¹	Coelho policlonal/Rheabiotec/IM0015
Anti-Caspase-3	Células em apoptose	<i>Steamer</i> a 60°C por 60 minutos	1:400	EnVision® ¹	Coelho policlonal/Rheabiotec/IM0035

1 – Kit EnVision® (Dakocytomation, código K4065).

Fonte: Dados do autor (2021).

3.2.3 Análise estatística

Inicialmente, a contagem de células basais, ductulares e inflamatórias imunomarcadas foi submetida ao teste de Shapiro-Wilk com o intuito de averiguar se os dados seguiam um padrão de distribuição normal. Após, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (nível de significância $p < 0,05$) na busca de determinar a existência de diferença significativa entre animais com neoplasia e os do grupo controle. Esses procedimentos foram repetidos para cada tipo celular avaliado. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Prism® (GraphPad, versão 8.0.2).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização da neoplasia

Macroscopicamente, todos os animais (12/12) do estudo apresentaram áreas esbranquiçadas a amareladas, variando entre 2 a 4 mm de diâmetro, distribuídas aleatoriamente pela superfície e parênquima hepático. Em uma das aves, o fígado estava aumentando de tamanho.

Microscopicamente, 67% (8/12) das aves apresentaram unicamente formações neoplásicas não encapsuladas, irregulares, proliferativas e com desenvolvimento de estruturas ductulares que, por vezes, coalesciam. Essas estruturas eram compostas por ductos biliares bem diferenciados e definidos por uma ou mais camadas de células neoplásicas, ou indiferenciadas, com formações irregulares e de difícil identificação.

Em 8% (1/12) dos casos ocorreu o desenvolvimento apenas de áreas menores pouco delimitadas e formadas por células agrupadas em um arranjo sólido, com ocasionais estruturas ductulares. Além disso, em 25% (3/12) dos animais era possível identificar os dois padrões morfológicos citados no mesmo fragmento avaliado. 33% (4/12) das aves ainda exibiram presença de material eosinofílico ocupando o lúmen dos ductos biliares neoformados.

Em 67% (8/12) dos casos, o tecido neoplásico era encontrado de forma multifocal e distribuído aleatoriamente pelo parênquima hepático ou concentrado na região periportal. Por vezes, os ductos neoformados abrangiam a extensão de dois espaços porta. Em 33% (4/12), apresentava-se como uma lesão focalmente extensa que cobria mais de 50% do fragmento analisado, abrangendo as regiões periportal e mediozonal.

Ainda na neoplasia, necrose foi encontrada em 58% (7/12) dos casos, normalmente multifocal e discreta à moderada. Identificou-se hemorragia em 25% (3/12) dos fragmentos avaliados, multifocal e discreta. Edema esteve presente em 25% (3/12) das neoplasias, focal e discreto, ocasionalmente com presença de fibroblastos. Raras mitoses típicas foram observadas em 17% (2/12).

O estroma das formações neoplásicas era discreto a moderado, abundante em dois animais, sendo este composto por tecido conjuntivo e, ocasionalmente, vasos sanguíneos. Infiltrado inflamatório local foi observado em 83% (10/12) dos casos, discreto a moderado e localizado no interstício. Desses, 70% (7/10) era misto, com abundante presença de heterófilos (70%), por vezes degenerados, e menor quantidade de linfócitos e macrófagos. Em 10% (1/10) caracterizava-se como mononuclear, constituído apenas por linfócitos e macrófagos e, em 20% (2/10), era heterofílico.

Nas áreas compostas por ductos biliares bem diferenciados, as células eram cuboidais a colunares, de contornos bem definidos, citoplasma discretamente basofílico, ocasionalmente granular, formando estruturas ductais estratificadas em uma ou mais camadas. Núcleo basal redondo a oval, com baixo pleomorfismo e cariomegalia, podendo conter até cinco nucléolos evidentes.

Já nas regiões sólidas e de ductos biliares indiferenciados, as células eram poligonais, de contornos pouco definidos, citoplasma escasso e núcleo central redondo com até cinco nucléolos evidentes. Pleomorfismo e anisocariose eram acentuados nessas áreas.

Em um dos casos avaliados, no pâncreas, observaram-se neoformações ductulares com aspecto morfológico semelhante ao padrão de ductos diferenciados do fígado, compatível com metástase, distribuídas de forma focalmente extensa pelo parênquima do órgão.

No tecido hepático adjacente à neoplasia, observou-se hepatócitos vacuolizados e degenerados em 50% (6/12) das lâminas avaliadas, além de necrose em 33% (4/12) dos animais, discreta a moderada e mais predominante em região centrolobular. Constatou-se infiltrado inflamatório multifocal em regiões mediozonal e periportal em 58% (7/12) dos casos, discreto a moderado, com predomínio de heterófilos (80%) e menor quantidade de linfócitos e macrófagos. Ademais, 42% (5/12) das aves também apresentaram edema discreto e multifocal.

3.3.2 Análise imuno-histoquímica

Na avaliação dos fragmentos de fígado submetidos à técnica de imuno-histoquímica, observou-se marcação no citoplasma de células basais, ductais e inflamatórias. Utilizando o anticorpo Bcl-2, o teste de Mann-Whitney revelou diferença significativa ($U = 0$; $p = 0,015$) na contagem de células basais entre animais acometidos pela neoplasia ($Md = 2,2$; $n = 10$) e do grupo controle ($Md = 0,2$; $n = 2$), o que não ocorreu para células ductais e inflamatórias.

Os resultados foram semelhantes com o anticorpo Caspase-3, no qual verificou-se diferença significativa ($U = 0$; $p = 0,02$) entre os grupos acometido ($Md = 4,7$; $n = 8$) e controle ($Md = 1$; $n = 2$) para células basais e não para ductais e inflamatórias.

3.4 DISCUSSÃO

Pesquisas referentes ao carcinoma colangiocelular em aves são raras e seu enfoque, frequentemente, envolve apenas relatos de caso e não compreende a caracterização completa da neoplasia. Aliado ao fato de se tratar de uma neoplasia incomum na medicina veterinária, dados acerca de seu aspecto macro e microscópico são impreteríveis.

Há uma variedade de apresentações macro e microscópicas de CC, o que torna sua identificação e diagnóstico complexos. Macroscopicamente, o tumor pode se apresentar como uma grande formação única ou com a presença de nódulos de tamanhos variados disseminados pelo parênquima hepático (NAKANUMA; KAKUDA, 2015).

Os achados macroscópicos nos doze casos avaliados são semelhantes aos relatados em galinha e flamingo-pequeno, com fígados aumentados de tamanho e presença de áreas neoplásicas esbranquiçadas a amareladas multifocais e que não excedem 1 cm de diâmetro, além de um órgão difusamente firme (WETTERE; DEGERNES; BARNES, 2010; NÓIA et al., 2013).

Em contrapartida, a macroscopia dos fígados do presente estudo difere do que foi observado em ema e gatos domésticos, nos quais grandes massas amareladas, irregulares e firmes, ocasionalmente umbilicadas, de até 6 cm de diâmetro, alastraram-se por todo o órgão (ROCHA et al., 2015; JARDIM et al., 2019). Eventualmente, áreas maiores podem ser observadas, atingindo até 3 cm de diâmetro, formato irregular, difusas e de consistência firme ao corte, como relatado em aves não domésticas (TAFTI et al., 2019; VÁSQUEZ; PERALES; ICOCHEA, 2020).

O CC é uma neoplasia considerada invasiva e que frequentemente apresenta metástases observáveis nos órgãos, contudo, nas aves do presente estudo, não foram constatadas áreas neoplásicas semelhantes às do fígado em outros órgãos na macroscopia. Diversos relatos já observaram a presença de formações metastáticas visualizáveis na necropsia em rapinantes e felinos (HARTUP; STEINBERG; FORREST, 1996; ASLAN et al., 2014; JARDIM et al., 2019).

Microscopicamente, os animais avaliados exibiram dois padrões de desenvolvimento distintos: um que consistia na formação de estruturas ductulares

bem diferenciadas ou indiferenciadas, e outro com predomínio de um arranjo sólido de células com ocasionais ductos biliares.

O primeiro é considerado o padrão mais frequente de CC em aves e mamíferos, no qual identificam-se ductos formados por uma única camada de células cuboidais a colunares e desmoplasia intensa que entremeia as estruturas (JARDIM et al., 2019; CARVALHO et al., 2020). Nessa apresentação, a neoplasia é irregular e não encapsulada, ocupando um largo espaço no parênquima do órgão, como foi exibido em nos animais do estudo e descrito em ganso e papagaios-verdadeiros (HILLYER et al., 1991; CARVALHO et al., 2020).

Outras possíveis apresentações da neoplasia, ainda que infrequentes, são aquelas com formação de estruturas acinares ou papilares com escassos ductos biliares irregulares, ocasionalmente sem lúmen, concentrados em região periportal (NÓIA et al., 2013; NAKANUMA; KAKUDA, 2015). Arranjos sólidos como os observados em diversos casos do presente estudo são incomuns na medicina veterinária, todavia, há relatos em ruminantes e aves, nos quais evidenciou-se formação de conjuntos de células neoplásicas poligonais com moderado a acentuado pleomorfismo e eventuais ductos biliares ou ácinos rudimentares (RENNER; ZAIAS; BOSSART, 2001; RAVAL et al., 2015; TAFTI et al., 2019).

Estudos prévios em flamingo e cão relataram, também, ocorrência de colangiocarcinoma-hepatocelular combinado, uma variante incomum que une elementos de carcinoma hepatocelular e CC, agregados como uma formação única ou separados por finas camadas de tecido conjuntivo (SHIGA; SHIROTA; ENOMOTO, 2001; WETTERE; DEGERNES; BARNES, 2010).

Os aspectos de estroma dos animais do estudo são semelhantes àqueles de relatos na literatura em aves e felinos, nos quais a neoplasia apresenta, frequentemente, um estroma abundante constituído de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, e permeando os arranjos neoplásicos, ou discreto, com camadas delgadas entre as células (NOURI; MARJANMEHR; SASANI, 2012; JARDIM et al., 2019).

O infiltrado inflamatório observado nas aves avaliadas era misto, com predomínio de heterófilos e linfócitos margeando os ductos neoformados ou paralelos às áreas de necrose, condizendo com o descrito anteriormente em diferentes espécies. Relatos prévios descrevem o predomínio desses leucócitos em um infiltrado moderado localizado em tecido neoplásico e adjacente, também presente nas áreas

de necrose e hemorragia, com menor quantidade de macrófagos e plasmócitos (CLYDE; OROSZ; MUNSON, 1996; MIKAELIAN et al., 1998; ROCHA et al., 2015).

Pesquisas realizadas em aves selvagens evidenciaram, no tecido hepático adjacente à neoplasia, presença de necrose, hepatócitos vacuolizados e degenerados, e infiltrado inflamatório composto de heterófilos e linfócitos, corroborando com os achados do presente estudo (CLYDE; OROSZ; MUNSON, 1996; WETTERE; DEGERNES; BARNES, 2010).

Metástase foi observada em apenas um dos casos avaliados na microscopia, localizada no pâncreas, indicado como um local frequente pela sua proximidade com o fígado. Estudos prévios realizados em mamíferos domésticos e aves relataram presença de tecido metastático em pâncreas, pulmão, intestino, linfonodos, omento, rins e adrenais (MIKAELIAN et al., 1998; ASLAN et al., 2014; NAGY et al., 2014).

A identificação de metástases auxilia na determinação do melhor protocolo terapêutico, indicação de procedimento cirúrgico, e para precisar a sobrevivência geral do paciente. Em cães domésticos, metástases extra-hepáticas são presenciadas em mais de 50% dos casos diagnosticados de CC, e podem atingir, potencialmente, qualquer tecido do organismo dessa espécie (PATNAIK; HURVITZ; LIEBERMAN, 1980).

O papel dessas no prognóstico em animais ainda é incerto, entretanto, em pesquisas realizadas em humanos, a identificação de metástase em linfonodos auxilia a estipular o prognóstico de pacientes após ressecção do tumor, dado que indivíduos com mais de um linfonodo acometido pela neoplasia podem ter uma sobrevida de menos de cinco anos, além da necessidade de tratamentos mais rigorosos (UCHIYAMA et al., 2011; KIRIYAMA et al., 2015; NAVARRO et al., 2020).

Caspases compreendem uma família de proteínas essenciais na execução e regulação da morte celular programada. Sua classificação depende do seu mecanismo de ação no processo de apoptose, podendo ser iniciadoras ou efetoras, no qual se encontra a caspase-3 (PORTER; JÄNICKE, 1999). Fisiologicamente, caspase-3 é liberada nas células de forma inativada, necessitando de fatores pró-caspase para ser proteoliticamente ativada e desempenhar seu papel, degradando proteínas essenciais de núcleo e citoplasma (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

Observou-se diferença significativa entre animais acometidos pela neoplasia e grupo controle em relação à expressão de caspase-3 nas células basais. Na medicina veterinária, são escassas as pesquisas relacionando essa proteína e neoplasias. Um

estudo realizado em cães com tumores mamários revelou maior porcentagem de células positivas em neoplasias benignas do que em malignas e nenhuma relação entre caspase-3 e prognóstico dos casos (RODRIGUES et al., 2016). Ademais, o estudo de Bongiovanni e colaboradores (2012) demonstrou maior presença de células positivas à proteína em osteossarcomas caninos do que em tecido saudável, também com pouco valor prognóstico.

Em humanos, existe uma possível relação entre o aumento na expressão de caspase-3 nas células e diminuição na sobrevivência de pacientes com diversos tipos de neoplasias, como as de estômago e ovário (HU et al., 2014). Já foi demonstrado, também, superexpressão dessa molécula em diferentes linhagens de carcinoma hepatocelular, outro tumor primário de fígado que pode acometer animais e humanos (PERSAD et al., 2004).

Ainda que caspase-3 possua uma atuação preponderante na execução de apoptose, o papel de sua desregulação na carcinogênese não é totalmente compreendido. Estudos prévios já relataram expressão reduzida e mutações específicas do gene que a codifica em distintas neoplasias, provavelmente relacionado com a diminuição de caspases iniciadoras, todavia, alterações do tipo são consideradas raras em humanos, diferente do que ocorre com outras moléculas pró-apoptóticas (PHILCHENKOV et al., 2004; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013).

Bcl-2 é uma proteína de uma família homônima responsável por importantes processos no controle de sobrevivência celular e apoptose, estando relacionada com alterações fisiológicas e patológicas, e presente integralmente na membrana de mitocôndrias e no retículo endoplasmático (HARDWICK; SOANE, 2013). A sua associação com outras proteínas reguladoras da família e ação na permeabilidade da membrana mitocondrial, evitando a liberação de citocromo c no citosol, é fundamental para garantir que a apoptose não ocorra erroneamente (GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999).

Assim como ocorre com caspase-3, estudos associando Bcl-2 e neoplasias em animais são raros. Em aves domésticas, os trabalhos realizados, frequentemente, relacionam deficiências ou presença de toxinas na dieta e possíveis efeitos no organismo que levam à mudança na expressão de Bcl-2. No estudo de Solcan e colaboradores (2013), por exemplo, observou-se aumento de Bcl-2 em tecido renal de galinhas alimentadas com dieta contendo ocratoxina.

Em uma pesquisa produzida em cães com osteossarcoma encontrou-se maior expressão de Bcl-2 em tecido neoplásico quando comparado a tecido saudável (PIRO; LEONARDI, 2015). Em outro estudo, conduzido também em cães, porém, dessa vez com linfomas, os autores observaram aumento na quantidade dessa proteína em tecido afetado por linfoma de células T (MEICHNER et al., 2016).

No presente projeto, notou-se maior presença de células positivas para Bcl-2 em tecido neoplásico quando comparado a tecido saudável. Semelhantemente, nos estudos realizados em CC de humanos constatou-se superexpressão de Bcl-2 em tecido neoplásico, notadamente em pacientes mais velhos e com formas mais agressivas do tumor (HARNOIS et al., 1997; KANG, et al., 2018).

Defeitos na via mitocondrial da apoptose e aumento na expressão de Bcl-2 estão relacionados com diferentes neoplasias. O bloqueio de processos de morte celular permite a sobrevivência de células tempo suficiente para que adquiram mutações oncogênicas e promovam carcinogênese, além da manutenção de oncogenes (CZABOTAR et al., 2014). Tais alterações já foram observadas em mastocitomas cutâneos e osteossarcomas caninos e CC em humanos. (HARNOIS et al., 1997; VASCELLARI et al., 2013; PIRO; LEONARDI, 2015).

3.5 CONCLUSÕES

Nas lâminas coradas por HE, os animais avaliados apresentaram dois padrões morfológicos de carcinoma colangiocelular, um com formação de estruturas ductulares diferenciadas e outro com aspecto sólido, formado por células agrupadas e raros ductos biliares indiferenciados. Ademais, na avaliação imuno-histoquímica, constatou-se diferença significativa entre animais com a neoplasia e os do grupo controle em células basais para os dois marcadores utilizados.

REFERÊNCIAS

- ASLAN, O.; ÇAKIR, L.; BEKDIK, I.K.; DOĞAN, Z.; TUNÇ, A.S. Cholangiocarcinoma of intrahepatic bile ducts with disseminated metastases in a Siamese cat : a case report. **Veterinarni Medicina**, v. 59, n. 7, p. 359–367, 2014.
- BONGIOVANNI, L.; MAZZOCCHETTI, F.; MALATESTA, D.; ROMANUCCI, M.; CICCARELLI, A.; BURACCO, P.; MARIA, R.; PALMIEIRI, C.; MARTANO, M.; MORELLO, E.; MANISCALCO, L.; SALDA, L.D. Immunohistochemical investigation of cell cycle and apoptosis regulators (Survivin, β -Catenin, P53, Caspase 3) in canine appendicular osteosarcoma. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 78, 2012.
- CARVALHO, T.P.; SANTOS, D.O.; PAULA, N.F.; MOREIRA, L.G.A.; OLIVEIRA, A.R.; LIMA, P.A.; TINOCO, H.P.; COSTA, M.E.L.T.; COELHO, C.M.; PESSANHA, A.T.; SANTOS, R.L. Cholangiocarcinoma in an Australian goose. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 1, p. 53–56, 2020.
- CLYDE, V.L.; OROSZ, S.E.; MUNSON, L. Severe Hepatic Fibrosis and Bile Duct Hyperplasia in Four Amazon Parrots. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 10, n. 4, p. 252–257, 1996.
- CULLEN, J.M. Tumours of the Liver and Gallbladder. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames: Wiley Blackwell, 2017. p. 602–631.
- CULLEN, J.M.; STALKER, M.J. Liver and Biliary System. In: MAXIE, M.G. (Ed.). **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2**. 6. ed. St, Louis: Elsevier, Inc., 2016. p. 258-353.
- CZABOTAR, P.E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.
- GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, n. 15, p. 1899-1911, 1999.
- HARDWICK, J.M.; SOANE, L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, 2013.
- HARNOIS, D.M.; QUE, F.G.; CELLI, A.; LARUSSO, N.F.; GORES, G.J. Bcl-2 is Overexpressed and Alters the Threshold for Apoptosis in a Cholangiocarcinoma Cell Line. **Hepatology**, v. 26, n. 4, p. 884-890, 1997.
- HARTUP, B.K.; STEINBERG, H.; FORREST, L.J. Cholangiocarcinoma in a Red-Tailed Hawk (*Buteo jamaicensis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 27, n. 4, p. 539–543, 1996.
- HILLYER, E.V.; MOROFF, S.; HOEFER, H.; QUESENBERRY, K.E. Bile Duct Carcinoma in Two out of Ten Amazon Parrots with Cloacal Papillomas. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 5, n. 2, p. 91–95, 1991.

HU, Q.; PENG, J.; LIU, W.; HE, X.; CUI, L.; CHEN, X.; YANG, M.; LIU, H.; LIU, S.; WANG, H. Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 8, p. 5057-5070, 2014.

JARDIM, M.P.B.; CID, G.C.; OLIVEIRA, M.C.; ASSUMÇÃO, R.F.; BASTOS, M.J.; SILVA, S.L.; NOGUEIRA, V.A.; SOUZA, H.J.M. Cholangiocarcinoma in Young Cats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 3–8, 2019.

JOHNE, R.; KONRATH, A.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E.; KALETA, E.F.; GERLACH, H.; MÜLLER, H. Herpesviral, but no papovaviral sequences, are detected in cloacal papillomas of parrots. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1869–1880, 2002.

KANG, Q.; ZOU, H.; YANG, X.; CAI, J.B.; LIU, L.X.; XIE, N.; WANG, L.M.; HUALI, Y.; ZHANG, X.W. Characterization and prognostic significance of mortalin, Bcl-2 and Bax in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Oncology Letters**, v. 15, n. 2, p. 2161-2168, 2018.

KIRIYAMA, M.; EBATA, T.; AOBA, T.; KANEOKA, Y.; ARAI, T.; SHIMIZU, Y.; NAGINO, M. Prognostic impact of lymph node metastasis in distal cholangiocarcinoma. **British Journal of Surgery**, v. 102, n. 4, p. 399–406, 2015.

KUMAR, R.; BALACHANDRAN, C. Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. **Veterinarski Arhiv**, v. 79, n. 1, p. 31-40, 2009.

MCILWAIN, D.R.; BERGER, T.; MAK, T.W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p. 1-28, 2013.

MEICHNER, K.; FOGLE, J.E.; ENGLISH, L.; SUTER, S.E. Expression of apoptosis-regulating proteins bcl-2 and bax in lymph node aspirates from dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 819-826, 2016.

MIKAELIAN, I.; PATENAUDE, R.; GIRARD, C.; MARTINEAU, D. Metastatic cholangiocellular carcinoma and renal adenocarcinoma in a golden eagle (*Aquila chrysaetos*). **Avian Pathology**, v. 27, n. 3, p. 321–325, 1998.

NAGY, A.; TABARAN, A.; MIHAIU, M.; CĂTOI, C.; BOUARI, C.; OROS, A. Morphological Evaluation of Metastatic Cholangiocarcinoma in a Dog. **Bulletin UASVM Veterinary Medicine**, v. 71, n. 2, p. 511–512, 2014.

NAKANUMA, Y.; KAKUDA, Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 29, p. 277–293, 2015.

NAVARRO, J.G.; LEE, J.H.; KANG, I.; RHO, S.Y.; CHOI, G.H.; HAN, D.H.; KIM, K.S.; CHOI, J.S. Prognostic significance of and risk prediction model for lymph node metastasis in resectable intrahepatic cholangiocarcinoma: do all require lymph node dissection? **Hpb**, v. 22, n. 10, p. 1411–1419, 2020.

NÓIA, F.H.S.; PALMA, P.D.; ABREU, R.F.; BERNARDI, S.O.U.; CASSALI, G.D.; BOELONI, J.N.; ALMEIDA, A.P. Cholangiocarcinoma in Backyard Chicken. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 6, n. 3, p. 116–119, 2013.

NOURI, M.; MARJANMEHR, S.H.; SASANI, F. Intrahepatic cholangiocarcinoma and encephalomalacia in a budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v. 6, n. 1, p. 51–55, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Classification of Tumours: Digestive System Tumours**. 5. ed. Lyon: Who Classification Of Tumours Editorial Board, 2019.

PATNAIK, A.K.; HURVITZ, A.I.; LIEBERMAN, P.H. Canine Hepatic Neoplasms: A Clinicopathologic Study. **Veterinary Pathology**, v. 17, n. 5, p. 553–564, 1980.

PERSAD, R.; LIU, C.; WU, T.T.; HOULIHAN, P.S.; HAMILTON, S.R.; DIEHL, A.M.; RASHID, A. Overexpression of caspase-3 hepatocellular carcinomas. **Modern Pathology**, v. 17, n. 7, p. 861-867, 2004.

PHILCHENKOV, A.; ZAVELEVICH, M.; KROCZAK, T.J.; LOS, M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. **Experimental Oncology**, v. 26, n. 2, p. 82-97, 2004.

PIRO, F.; LEONARDI, L. Expression of Bcl-2 in canine osteosarcoma. **Open Veterinary Journal**, v. 5, n. 1, p. 27-29, 2015.

PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.

RAVAL, S.H.; JOSHI, D.V.; ERIN, B.; BRUCE, W.; PATEL, B.J.; PATEL, J.G.; PARMAR, S.N. Metastatic cholangiocellular carcinoma in Kankrej bullock. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 39, n. 3, p. 243–246, 2015.

RENNER, M.S.; ZAIAS, J.; BOSSART, G.D. Cholangiocarcinoma with metastasis in a captive Adelie penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 32, n. 3, p. 384–386, 2001.

ROCHA, P.R.D.A.; LOPES, L.L.; ARRUDA, L.P.; PESCADOR, C.A.; CRUZ, R.A.S.; COLODEL, E.M. Cholangiocarcinoma in an American Rhea (*Rhea Americana araneipes*). **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 284–287, 2015.

RODRIGUES, H.; CARVALHO, M.I.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F.L. Clinicopathological significance of caspase-3 and KI-67 expression in Canine mammary gland tumours. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 64, n. 1, p. 78-89, 2016.

SCHMIDT, R.E.; REAVILL, D.R.; PHALEN, D.N. (EDS.). Liver. In: **Pathology of Pet and Aviary Birds**. 2. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2015. p. 95–125.

SHIGA, A.; SHIROTA, K.; ENOMOTO, M. Combined Hepatocellular and Cholangiocellular Carcinoma in a Dog. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 4, p. 483–486, 2001.

SOLCAN, C.; TIMOFTE, D.; FLORISTEAN, V.C.; CARTER, S.D.; SOLCAN, G. Ultrastructural lesions and immunohistochemical analysis of Bcl-2 protein expression in the kidney of chickens with experimental ochratoxicosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, n. 3, p. 344-353, 2013.

STYLES, D.K.; TOMASZEWSKI, E.K.; JAEGER, L.A.; PHALEN, D.N.; Psittacid herpesviruses associated with mucosal papillomas in neotropical parrots. **Virology**, v. 325, p. 24-35, 2004.

TAFTI, A. K.; ABDI-HACHESOO, B.; NAKHAE, P.; NEMATOLLAHI, F. Multicentric intrahepatic cholangiocellular carcinoma in a budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): a case report. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, n. 2, p. 579–582, 2019.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N. MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, p.17-23, 2004.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

UCHIYAMA, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAUE, H.; ARIIZUMI, S.; AOKI, T.; KOKUDO, N.; EBATA, T.; NAGINO, M.; OHTSUKA, M.; MIYAZAKI, M.; TANAKA, E.; KONDO, S.; UENISHI, T.; KUBO, S.; YOSHIDA, H.; UNNO, M.; IMURA, S.; SHIMADA, M.; UENO, M.; TAKADA, T. Impact of nodal involvement on surgical outcomes of intrahepatic cholangiocarcinoma: A multicenter analysis by the Study Group for Hepatic Surgery of the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**, v. 18, n. 3, p. 443–452, 2011.

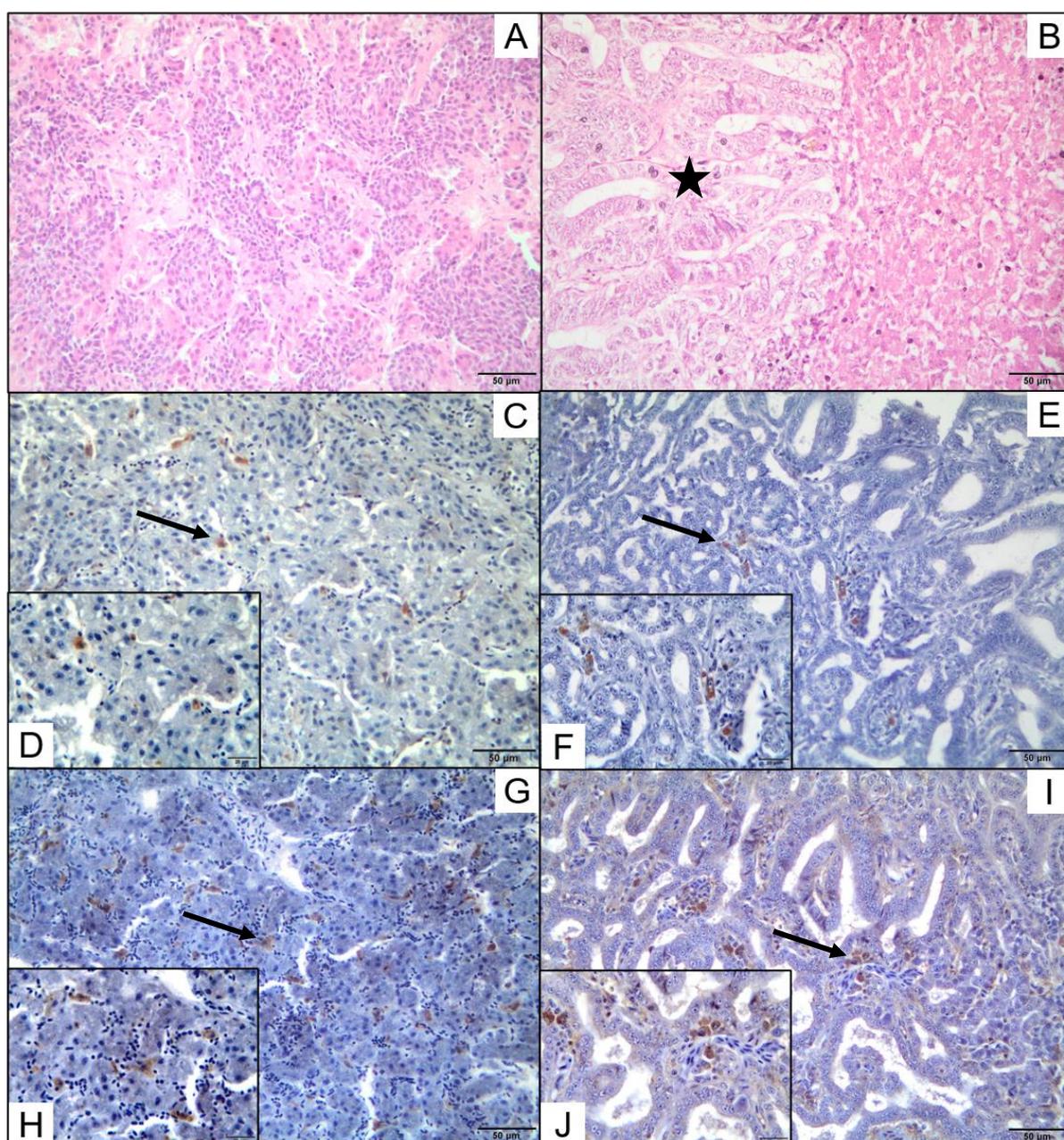
VASCELLARI, M.; GIANTIN, M.; CAPELLO, K.; CARMINATO, A.; MORELLO, E.M.; VERCELLI, A.; GRANATO, A.; BURACCO, P.; DACASTO, M.; MUTINELLI, F. Expression of ki67, bcl-2, and cox-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2013.

VÁSQUEZ, G.; PERALES, R.; ICOCHEA, E. Reporte de caso: colangiocarcinoma y disgerminoma en pava aliblanca (*Penelope albipennis*), Perú. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 31, n. 4, 2020.

WETTERE, A.J. VAN; DEGERNES, L.A.; BARNES, H.J. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in a lesser flamingo (*Phoenicopterus minor*). **Avian Pathology**, v. 39, n. 4, p. 275–278, 2010.

APÊNDICE A – Fotomicrografias dos fígados avaliados

(A) Área neoplásica formada por um arranjo sólido de células e ocasionais ductos biliares irregulares (HE. Aumento de 400X). (B) Área neoplásica (estrela) composta por ductos biliares bem diferenciados anexa a tecido hepático normal (HE. Aumento de 400X). (C) Imunomarcação positiva para Bcl-2 em células basais (seta) de área neoplásica sólida (Aumento de 400X). (D) Aumento de 1000X. (E) Imunomarcação positiva para Bcl-2 em células basais (seta) de área neoplásica bem diferenciada (Aumento de 400X). (F) Aumento de 1000X. (G) Imunomarcação positiva para Caspase-3 em células basais (seta) de área neoplásica sólida. (Aumento de 400X). (H) Aumento de 1000X. (I) Imunomarcação positiva para Caspase-3 em células basais (seta) de área neoplásica bem diferenciada (Aumento de 400X). (J) Aumento de 1000X.



4 CONCLUSÕES GERAIS

Através das informações contidas nesse trabalho, denota-se a relevância de mais estudos nas diferentes áreas na medicina veterinária com o intuito de se obter melhores informações acerca do carcinoma colangiocelular e seu comportamento no organismo. Além disso, constatou-se a importância da identificação dos diferentes subtipos da neoplasia na microscopia, afinal, esses podem determinar diferentes apresentações clínicas e, conseqüentemente, distintos prognósticos. Por fim, a imunohistoquímica para observação da atividade apoptótica das células aparenta ser uma boa forma de avaliação do tumor, contudo, mais estudos são necessários para que seja possível compreender seu valor na rotina.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-AZIZ, T.; FLETCHER, O.J. Hepatobiliary System. In: ABDUL-AZIZ, T.; FLETCHER, O.J.; BARNES, H.J. (Ed.). **Avian Histopathology**. 4. ed. Jacksonville: American Association of Avian Pathologists, 2016. p. 355–422.
- BACHA, W.J.; BACHA, L.M. (ed.). Digestive System. In: **Color Atlas of Veterinary Histology**. 3. ed. Ames: Wiley Blackwell, 2012. p. 139–182.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Amazona aestiva*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2019.
- CHANG, H. P. Hepatic Clonorchiasis and Carcinoma of the Bile Duct in a Dog. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 89, p. 365–367, 1965.
- CHAPMAN, M.H.; WEBSTER, G.J.M.; BANNOO, S.; JOHNSON, G.J.; WITTMAN, J.; PEREIRA, S.P. Cholangiocarcinoma and dominant strictures in patients with primary sclerosing cholangitis: A 25-year single-centre experience. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, n. 9, p. 1051–1058, 2012.
- COLVILLE, T.; BASSERT, J.M. **Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, Inc., 2016.
- CULLEN, J.M. Tumours of the Liver and Gallbladder. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames: Wiley Blackwell, 2017. p. 602–631.
- CULLEN, J.M.; STALKER, M.J. Liver and Biliary System. In: MAXIE, M.G. (Ed.). **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, Inc., 2016. p. 258-353.
- CZABOTAR, P.E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.
- DAVIES, R. R. Avian Liver Disease: Etiology and Pathogenesis. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 3, p. 115–125, 2000.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 4, n. 35, p. 495-516, 2007.
- GRESPLAN, A.; RASO, T. de F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C. R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens**, 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 614–656.
- GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, n. 15, p. 1899-1911, 1999.
- HEDRICK, R.P.; GROFF, J.M.; OKIHIRO, M.S.; MCDOWELL, T.S. Herpesviruses Detected in Papillomatous Skin Growths of Koi Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 4, p. 578–581, 1990.

JARDIM, M.P.B.; CID, G.C.; OLIVEIRA, M.C.; ASSUMÇÃO, R.F.; BASTOS, M.J.; SILVA, S.L.; NOGUEIRA, V.A.; SOUZA, H.J.M. Cholangiocarcinoma in Young Cats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 3–8, 2019.

JOHNE, R.; KONRATH, A.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E.; KALETA, E.F.; GERLACH, H.; MÜLLER, H. Herpesviral, but no papovaviral sequences, are detected in cloacal papillomas of parrots. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1869–1880, 2002.

KENDALL, T.; VERHEIJ, J.; GAUDIO, E.; EVERT, M.; GUIDO, M.; GOEPPERT, B.; CARPINO, G. Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. **Liver International**, v. 39, n. S1, p. 7–18, 2019.

LEITE, K.C.E; SEIXAS, G.H.F.; BERKUNSKY, I.; COLLEVATTI, R.G.; CAPARROZ, R. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 7, n. 3, p. 819–829, 2008.

NAGY, A.; TABARAN, A.; MIHAIU, M.; CĂTOI, C.; BOUARI, C.; OROS, A. Morphological Evaluation of Metastatic Cholangiocarcinoma in a Dog. **Bulletin UASVM Veterinary Medicine**, v. 71, n. 2, p. 511–512, 2014.

NAKANUMA, Y.; KAKUDA, Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 29, p. 277–293, 2015.

NAKANUMA, Y.; SATO, Y.; HARADA, K.; SASAKI, M; XU, J.; IKEDA, H. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. **World Journal of Hepatology**, v. 2, n. 12, p. 419–427, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Classification of Tumours: Digestive System Tumours**. 5. ed. Lyon: Who Classification Of Tumours Editorial Board, 2019.

PATNAIK, A.K.; HURVITZ, A.I.; LIEBERMAN, P.H. Canine Hepatic Neoplasms: A Clinicopathologic Study. **Veterinary Pathology**, v. 17, n. 5, p. 553–564, 1980.

PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.

QUACKENBUSH, S.L.; WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; CASEY, R.N.; ROVNAK, J.; CHAVES, A.; DUTOIT, L.; BAINES, J.D.; PARRISH, C.R.; BOWSER, P.R.; CASEY, J.W. Three Closely Related Herpesviruses Are Associated with Fibropapillomatosis in Marine Turtles. **Virology**, v. 246, p. 392–399, 1998.

RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994.

SCHMIDT, R.E.; REAVILL, D.R.; PHALEN, D.N. (EDS.). Liver. In: **Pathology of Pet and Aviary Birds**. 2. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2015. p. 95–125.

SCHUNCK, F.; SOMENZARI, M.; LUGARINI, C.; SOARES, E.S. **Plano de ação nacional para a conservação dos papagaios da Mata Atlântica**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011. 128 p. (Série Espécies Ameaçadas, 20).

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SIGEL, C. S.; DRILL, E.; ZHOU, Y.; BASTURK, O.; ASKAN, G.; PAK, L.M.; VAKIANI, E.; WANG, T.; BOERNER, T.; DO, R.K.G.; SIMPSON, A.L.; JARNAGIN, W.; KLIMSTRA, D.S. Intrahepatic Cholangiocarcinomas Have Histologically and Immunophenotypically Distinct Small and Large Duct Patterns. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 42, n. 10, p. 1334–1345, 2018.

TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. **Handbook of Avian Medicine**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2009.

VALLE, J.W.; BORBATH, I.; KHAN, S.A.; HUGUET, F.; GRUENBERG, T.; ARNOLD, D. Biliary cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 27, supplement 5, p. 28-37, 2016.

ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M.D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2012.