

Carcinoma hepatocelular metastático em Jaguatirica (*Leopardus pardalis*)¹

Dayane F.H. Miranda², Francisco de A.L. Souza³, Luciano S. Fonseca², Hatawa M. de Almeida⁴, Juliana F.V. Braga², Francisco A.L. Costa² e Silvana M.M. de S. Silva^{2*}

ABSTRACT.- Miranda D.F.H., Souza F.A.L., Fonseca L.S., Almeida H.M., Braga J.F.V., Costa F.A.L. & Silva S.M.M.S. 2015. [**Metastatic hepatocellular carcinoma in ocelot (*Leopardus pardalis*).**] Carcinoma hepatocelular metastático em jaguatirica (*Leopardus pardalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(11):913-918. Setor de Patologia Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Agrícola do Socopo s/n, Teresina, PI 64049-550, Brazil. E-mail: silvanammss@ufpi.edu.br

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a rare neoplasm in domestic and wildlife animals and has been reported only in antelope, deer, prairie dogs and ferrets; but there are no reports in *Leopardus pardalis* (ocelot). This paper describes a case of metastatic hepatocellular carcinoma in a female of an about 18-year-old *Leopardus pardalis* from the Zoological Garden of Teresina, Piauí, after a history of anorexia, apathy and fatal outcomes, forwarded to the Department of Animal Pathology at the Federal University of Piauí for pathological examination. Necropsy revealed two nodules of about 8.0cm in diameter in the liver, of whitish to bright red or yellow to dark red color divided into lobes by connective tissue. In the pancreas were found multiple nodules of about 1.0cm diameter, with smooth surface, firm consistency, and yellowish-red color. The cut surface of the kidneys also presented multiple whitish-gray or yellowish millimeter small nodules in the corticomedullary region, of firm consistence, suggesting metastases. Fragments of the liver lesions examined microscopically revealed hepatocyte proliferation in well differentiated strands, forming trabeculars of three or more cells. The hepatocytes were large and pleomorphic, with eosinophilic cytoplasm. In PAS staining glycogen accumulation was found in neoplastic hepatocytes. The confirmation of the diagnosis was made by immunohistochemistry, using monoclonal antibody hepatocyte specific antigen. The findings allowed us to characterize the neoplasm as a trabecular metastatic hepatocarcinoma in *Leopardus pardalis* bred in captivity.

INDEX TERMS: Neoplasm, felid, liver, hepatocellular carcinoma, ocelot, *Leopardus pardalis*, immunohistochemistry.

RESUMO.- O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia rara nos animais domésticos e em espécies selvagens foi relatado somente em antílopes, veado, cães da pradaria e furões, mas não existem relatos em *Leopardus pardalis* (jaguaririca). Este trabalho descreve um caso de carcinoma he-

patocelular metastático em uma fêmea felina de aproximadamente 18 anos de idade, da espécie *Leopardus pardalis*, proveniente do Parque Zoobotânico de Teresina-PI, com histórico de anorexia, apatia e evolução ao óbito que foi encaminhada ao Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí para exame anatomopatológico. À necropsia foram observadas duas nodulações de aproximadamente 8,0cm de diâmetro no fígado, de coloração variando da brancacenta ao avermelhado claro, amarelada a vermelho escuro, subdivididas em lóbulos por tecido conjuntivo. No pâncreas foram observadas múltiplas nodulações de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro, com superfície lisa, consistência firme, coloração vermelho-amarelada. A superfície de corte dos rins também apresentava várias nodulações milimétricas de distribuição multifocal, na região córtico-medular, con-

¹ Recebido em 14 de abril de 2014.

Aceito para publicação em 20 de fevereiro de 2015.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Agrícola do Socopo, Ininga, Teresina, PI 64049-550, Brasil. *Autor para correspondência: silvanammss@ufpi.edu.br

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

⁴ Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UFPI, Campus Agrícola do Socopo, Ininga, Teresina, PI 64049-550.

sistência firme, coloração branco-acinzentada ou amarelada, sugerindo metástase. Os fragmentos das lesões de fígado foram coletados e no exame microscópico observaram-se proliferação de hepatócitos em cordões bem diferenciados, formando trabéculas com espessura de três ou mais células. Os hepatócitos apresentavam-se volumosos, pleomórficos, com citoplasma eosinofílico. Na coloração com PAS constatarem-se, regularmente, acúmulo de glicogênio nos hepatócitos neoplásicos. A confirmação foi feita pela técnica de imunistoquímica, utilizando-se anticorpo monoclonal (*Hepatocyte Specific Antigen*). Os achados anatomohistopatológicos, e o auxílio da imunistoquímica permitiram concluir pelo diagnóstico de hepatocarcinoma trabecular metastático em *Leopardus pardalis* criado em cativeiro.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Neoplasia, felídeo, fígado, carcinoma hepatocelular, jaguatirica, *Leopardus pardalis*, imunistoquímica.

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia rara nos animais domésticos, mas pode ocorrer em ruminantes, correspondendo a 20% das neoplasias encontradas em ovinos abatidos na Grã-Bretanha (Cullen & Pop 2002, Cullen 2007). Em espécies selvagens tem sido relatado em antílopes (Wilson et al. 2007), veado (Munro & Youngson 1996), cães da pradaria (Garner et al. 2004) e furões (Jones et al. 2006), mas não foram encontrados relatos em *Leopardus pardalis* (jaguatirica). Os sinais clínicos associados ao carcinoma hepatocelular são inespecíficos, incluindo distensão abdominal, hepatomegalia, anorexia, vômitos, letargia, ascite e, às vezes, icterícia, diarreia e perda de peso. Alguns animais afetados podem apresentar convulsões, presumivelmente devido à encefalopatia ou hipoglicemia, visto que metástases para o cérebro são raras (Cullen & Pop 2002).

Em seres humanos a neoplasia é frequente e está associada à cirrose hepática de longa duração, principalmente a cirrose alcoólica (Fattovich et al. 1995, Badvie 2000). Nos animais relata-se a associação com produtos químicos cancerígenos, hepatites virais, radiação ionizante e infestações parasitárias (Edmondson 1958, Smith 1972).

O CHC pode ser maciço, nodular ou difuso. Várias características sugerem malignidade, incluindo a falta de delimitação ou a pedunculacão e a coloração variada da superfície de corte devido à hemorragia, necrose e pigmentação biliar. Invasão de vasos portais, às vezes grosseiramente evidente, é importante para o diagnóstico. Alguns desses tumores em bovinos são escurinhos, rígidos e brancos. Histologicamente os CHC podem ser bastante variáveis, podendo ocorrer diferentes padrões dentro de uma única neoplasia (Stalker & Hayes 2007), sendo classificados com base na sua arquitetura em trabecular, acinar e sólido (Colina et al. 2007).

O *Leopardus pardalis* vive em cativeiro aproximadamente 20 anos, mas dificilmente ultrapassa os dez anos na natureza. Alimenta-se de pequenos mamíferos de até 1kg ou de outros pequenos vertebrados como anfíbios, répteis e aves (Murray & Gardner 1997).

O objetivo desse trabalho foi descrever um caso de carcinoma hepatocelular metastático em *Leopardus pardalis*

criado em cativeiro, como um valioso registro sobre a incidência de neoplasias malignas em fígado de animais silvestres.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma fêmea da espécie *Leopardus pardalis*, de aproximadamente 18 anos de idade, proveniente do Parque Zoológico de Teresina, Piauí, há quatro dias com histórico de anorexia e apatia veio a óbito e foi encaminhada ao Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI) para exame anatomopatológico.

Fragmentos de fígado coletados durante a necropsia foram fixados em formalina tamponada a 10%, processados, incluídos em parafina, cortados a 5µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido periódico Schiff (PAS). A técnica de imunistoquímica foi realizada em cortes desparafinizados, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico; submetidos a bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 0,03%, em metanol e, em seguida, a recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio (pH 6,0) em forno micro-ondas. As secções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-HSA (Hepatocyte Specific Antigen), produzido em camundongo (Mob 426, clone OCH1E5, DBS Corporation, Pleasanton), na diluição de 1:50 em *overnight*, seguido por anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (En-Vision® System Labelled Polymer, peroxidase, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), em câmara úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. A revelação da reação foi realizada com 0,3mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, Saint Louis, USA) e a contracoloração com hematoxilina de Harris (QEEL- Química Especializada Erich Ltda., São Paulo, Brasil). O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário em um dos cortes.

RESULTADOS

À necropsia observou-se que a carcaça apresentava mucosas aparentes de coloração brancacenta, pelos sem brilho, proeminências ósseas evidentes, hipotrofia de musculatura esquelética, denotando um estado corporal deficiente. O exame das vísceras revelou a presença de nodulações no fígado, pâncreas e rim. Ocupando quase todo o lobo lateral e medial direito do fígado observou-se duas nodulações de aproximadamente 8,0 cm de diâmetro, de coloração variando da brancacenta ao vermelho claro e da amarelada ao vermelho escuro, as quais eram subdivididas em lóbulos por tecido conjuntivo fibroso (Fig.1A); os demais lobos apresentavam-se aparentemente dentro dos limites de normalidade. No pâncreas foram observadas múltiplas nodulações de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro (Fig.1B), superfície lisa, consistência firme, coloração vermelho-amarelada. Os rins mostravam superfície externa normal, entretanto, ao corte foram observadas várias nodulações milimétricas na região córtico-medular (Fig.1C), que se apresentava congesta. As nodulações eram de consistência firme e ao corte se aprofundavam no parênquima; apresentavam superfície lisa, brilhante, coloração branco-acinzentada ou amarelada e consistência friável. Na região fúndica do estômago havia erosões e úlceras de aproximadamente 2,0cm. O intestino apresentava mucosa espessa, edemaciada e conteúdo pastoso de coloração marrom escura.

Os achados do exame histopatológico dos fragmentos de fígado revelaram proliferação de hepatócitos em cordões bem diferenciados, formando trabéculas de espessu-

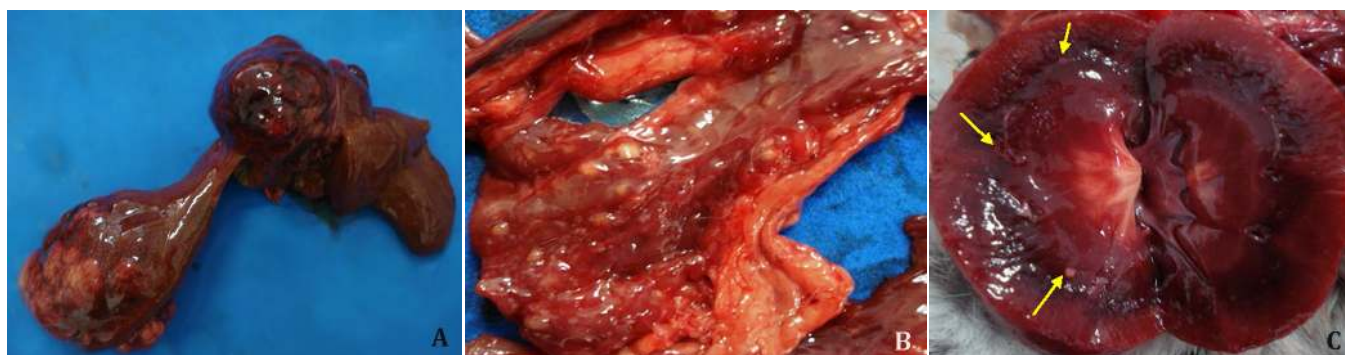


Fig.1(A). Aspecto macroscópico da neoplasia hepática de *Leopardus pardalis*, com presença de duas nodulações de coloração variando da brancacenta ao vermelho claro, amarelada ao vermelho escuro ocupando quase todo o lobo lateral e medial direito. (B) Aspecto macroscópico do pâncreas de *Leopardus pardalis*, onde foram observadas múltiplas nodulações de aproximadamente 1,0cm de diâmetro, superfície lisa e coloração vermelho-amarelada. (C) Aspecto macroscópico do rim de *Leopardus pardalis*, onde ao corte foram observados, várias nodulações milimétricas de distribuição multifocais, localizados na região córtico-medular (setas).

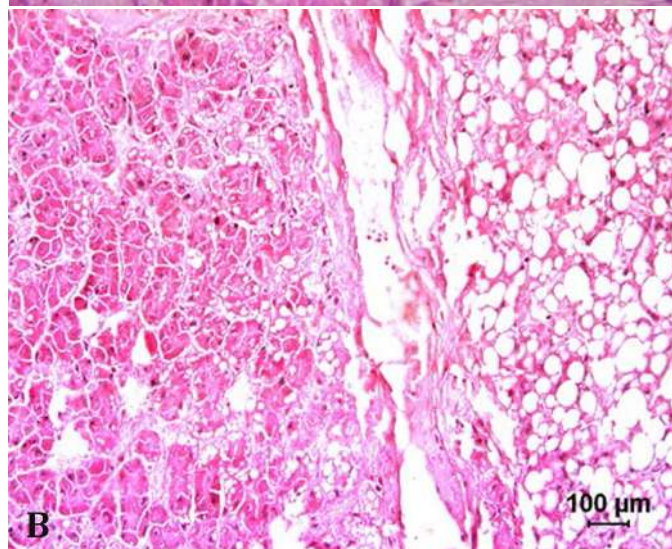
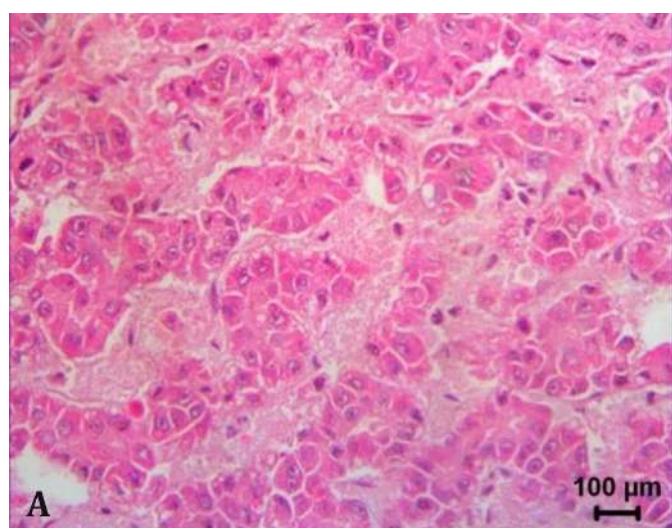


Fig.2(A). Carcinoma hepatocelular em *Leopardus pardalis*, proliferação de hepatócitos em cordões, bem diferenciados, formando trabéculas separadas por estruturas sinusoidais, revestidas por endotélio ou fino padrão de tecido conjuntivo. HE, barra = 100µm. (B). Carcinoma hepatocelular em *Leopardo pardalis*, área de transição de hepatócitos neoplásicos e área com metamorfose gordurosa. HE, barra = 100µm.

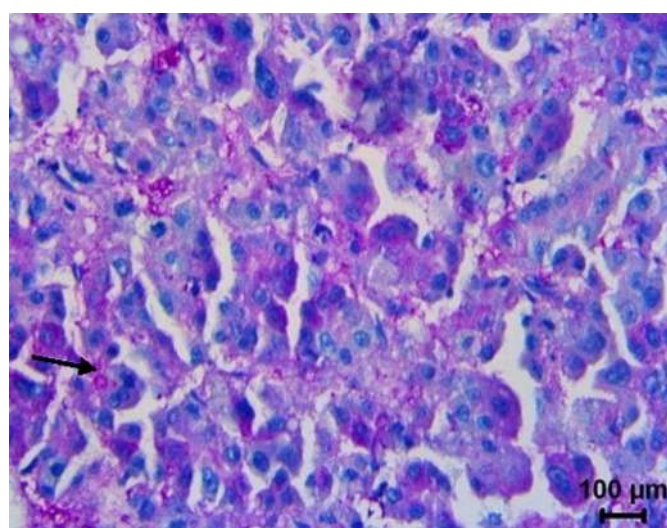


Fig.3. Acúmulo de glicogênio nos hepatócitos neoplásicos de coloração púrpura-magenta (seta), em *Leopardus pardalis*. PAS, barra = 100µm.

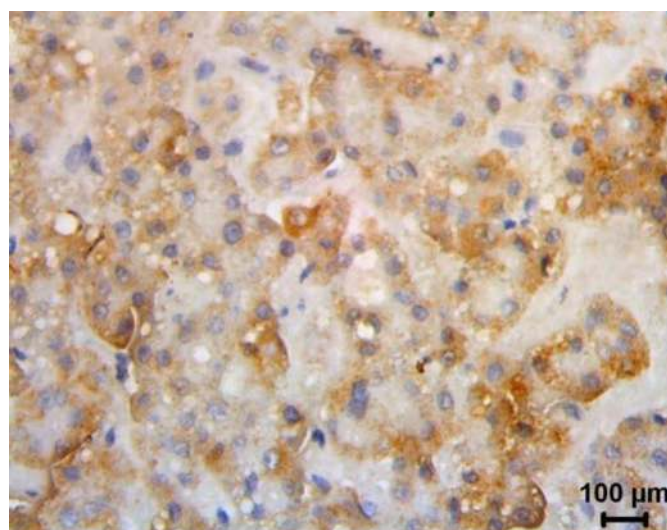


Fig.4. Marcação forte e uniforme para o citoplasma dos hepatócitos neoplásicos de *Leopardus pardalis*, com anticorpo Hepatocyte Specific. Imunoperoxidase corada com hematoxilina de Harris, barra = 100µm.

ra de três ou mais células, separadas por estruturas sinuoidais, revestidas por endotélio ou fino padrão de tecido conjuntivo. Os hepatócitos apresentavam-se volumosos, pleomórficos, com citoplasma eosinofílico, muitas vezes vacuolizados e deslocando o núcleo para periferia, formando estruturas denominadas “células em anel de sinete”. Os núcleos das células apresentavam formas variadas, sendo arredondados, alongados, ovais ou triangulares e com nucléolos evidentes e raras figuras de mitose. Observaram-se ainda espaços císticos e depósitos de pigmento biliar (Fig.2). À coloração de PAS constataram-se, regularmente, áreas com acúmulo de glicogênio nos hepatócitos neoplásicos (Fig.3). A neoplasia foi diagnosticada como hepatocarcinoma trabecular e as células neoplásicas não invadem o parênquima hepático subjacente. O tecido hepático que não foi afetado pela neoplasia, apresentava hepatócitos aumentados, com citoplasma vacuolizado, sugestivo de degeneração gordurosa.

A imunomarcagem por imunoperoxidase, com o anticorpo Hepatocyte Specific Antigen revelou hepatócitos com marcação no citoplasma positiva, de aspecto granular (Fig.4). A especificidade da marcação foi confirmada pela ausência de coloração no tecido sadio adjacente à área neoplásica e no fragmento de tecido onde foi omitido o anticorpo primário.

DISCUSSÃO

Não se conhece, ainda, os fatores que predis põem os animais silvestres ao carcinoma hepatocelular, mas sabe-se que agentes infecciosos ou químicos que provocam alterações (mutações) no DNA dos hepatócitos, podem desencadear a neoplasia (Marion et al. 1986, Boissan et al. 2005, McKenzie et al. 2005, Na et al. 2011). Dentre as prováveis causas de carcinoma hepatocelular em animais estão as aflatoxinas, nitrosaminas, aramite, trematódeos hepáticos (*Clonorchis* spp., *Platynosomum concinnum*) e compostos radioativos como estrôncio e céσιο (Anderson & Sandison 1968, Ettinger & Feldman 2004), mas não temos informação sobre o contato do animal deste estudo com qualquer desses produtos.

Apesar de observamos que a neoplasia ocorreu em um *Leopardus pardalis* com idade avançada (18 anos), característica comum na maioria das neoplasias (Morrison 1998, McAloose & Newton 2009), os estudos mostram uma enorme variação com relação à faixa etária. Há relato em *Meles meles* (Texugo Europeia) com dez anos de idade (Salgueiro et al. 2010), *Kobus megaceros* (Antílope-do-Nilo) com 14 anos (Wilson et al. 2007). Entretanto, acomete tanto animais jovens como búfalo indiano com quatro anos (Selvam et al. 2008), ovinos com menos de um ano de idade e suínos com menos de seis meses, quanto animais adultos e velhos como os bovinos que são acometidos em idade avançada. Os cães são afetados com 10 a 11 anos, embora tenham sido relatados casos com quatro anos e em gatos, a faixa etária varia de dois a 18 anos (Cullen & Pop 2002). Esta grande variabilidade na ocorrência da neoplasia nos animais, provavelmente está relacionada a fatores ambientais predisponentes e as condições orgânicas intrínsecas das espécies suscetíveis. Se levamos em consideração que a

neoplasia acomete gatos, portanto um felídeo, com até dois anos de idade, é provável que esta neoplasia possa ocorrer, também, em *Leopardus pardalis* numa idade precoce.

A frequência de hepatocarcinoma no homem está associada ao estilo de vida adotado, tendo como fator a ser destacado, o consumo de álcool, a cirrose hepática (Yamauchi et al. 1993), esteato-hepatite não alcoólica (associada à obesidade), bem como o vírus da hepatite B e C (Conte et al. 2000). Já nos animais, especialmente silvestres, essa relação parece mais provável com fatores hereditários, agentes cancerígenos de origem alimentar ou ambiental, tais como venenos de plantas, carcinógenos químicos, micotoxinas (aflatoxina), bem como com infecções virais (Snyder et al. 1982, De Jong et al. 2004, Wilson et al. 2007) adquiridas pelos animais ao longo da vida. Contudo, esses fatores, também, parecem não ter um papel preponderante, pois, sabe-se que nos animais silvestres, apesar de não viverem em condições sanitárias adequadas, a ocorrência da neoplasia é muito rara (Placke et al. 1982, Selvam et al. 2008), como também é observado nos animais domésticos, a exemplo do cão (Strombeck & Guilford 1996, Cullen 2007). No caso ora descrito havia lesão sugestiva de metamorfose gordurosa no parênquima não envolvido com a neoplasia. Não podemos afirmar que esta lesão estava associada com a neoplasia, mas existe essa possibilidade, a exemplo do que ocorre com o homem, muitas vezes relacionado com estresse metabólico e indução de inflamação associada a genes, progredindo para uma hepatoesteatose (Radonjic 2009) e em animais tem sido descrito difusa metamorfose gordurosa de hepatócitos (Cullen & Pop 2002).

O carcinoma hepatocelular é uma neoplasia que atinge grande volume, substituindo grande parte do parênquima hepático (Cullen & Pop 2002), como observado no presente estudo. Apesar de maligna, é uma neoplasia encapsulada. Morfológicamente esta malignidade pode ser reconhecida pela variada coloração (MacLachlan & Cullen 1995), conforme constatado no presente caso. O carcinoma hepatocelular possui uma classificação complexa no homem, sendo caracterizado por subtipos macroscópicos, anátomos-clínicos e microscópicos (Anthony & Bannasch 1994, Craig et al. 1980). Em animais a classificação é mais simples, mas o critério microscópico é semelhante, sendo classificado como trabecular, adenóide (acinar no homem), e sólido (Stalker & Hayes 2007).

As características histológicas observadas no presente estudo revelaram claramente que as células neoplásicas assemelhavam-se ao fígado normal, com formação de trabéculas hepáticas em camadas de várias células de espessura e presença de sinusoides, o que permitiu a classificação histológica de hepatocarcinoma trabecular, o tipo mais comum de hepatocarcinoma (Stalker & Hayes, 2007). O diagnóstico diferencial desta neoplasia deve ser feito com adenoma hepatocelular, colangiocarcinoma e hepatocolangiocarcinoma. Na diferenciação com o adenoma é importante considerar o espessamento das trabéculas de hepatócitos, que no carcinoma trabecular ocorre com maior variação, como observado no presente caso. Além disso a malignidade da neoplasia ficou evidente, também, pelas características de

pleomorfismo celular; nucléolos evidentes e núcleos de formas variadas, observadas no exame citológico. Com colangiocarcinoma e hepatocolangiocarcinoma a diferenciação em relação ao caso diagnóstico neste estudo foi bastante clara, visto que essas neoplasias apresentam um componente acinar predominante, possuem extenso estroma de colágeno e produção de mucina pelo epitélio biliar. Estudos tem demonstrado que colangiocarcinoma pode ser diferenciado de carcinoma hepatocelular pela presença de material protéico neste, enquanto que o colangiocarcinoma é mais propenso a ter depósito de mucina dentro dos ácidos (Shinga 2001, Cullen & Pop 2002). Contudo, de um modo geral, nas neoplasias hepáticas os hepatócitos acumulam glicogênio no citoplasma, o que foi possível observar pela coloração com PAS (Shinga 2001), muito embora não tenha sido observada estrutura tubular, própria do carcinoma colangiocelular.

A ocorrência de metástase nesta neoplasia é incomum, mas pode atingir 28% em gatos e 39% em bovinos, sendo mais frequentes em linfonodo, pulmão e peritônio no cão, e há relato de metástase no baço (Patnaik 1981, Cullen & Pop 2002, Jeong et al. 2005). Contudo, no presente estudo observamos que haviam lesões nodulares no pâncreas e no rim na região córtico-medular, de distribuição multifocal, com características semelhantes às presentes no fígado, sugerindo que essas lesões eram metástases.

Considerando que a imunoistoquímica constitui uma técnica específica para a identificação de epítomos conservados em células normais e, mesmo, naquelas que se desviam do padrão cíclico normal, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-HSA, para auxiliar no diagnóstico da neoplasia. O antígeno específico de hepatócito (Hepatocyte Specific Antigen) se localiza na mitocôndria destes e é considerado um marcador de alta sensibilidade para o diagnóstico de carcinoma hepatocelular em humanos e cães, permitindo, assim, diferenciar um carcinoma hepatocelular, de colangiocarcinoma e hepatoblastoma que não expressam esse antígeno (Ramos-Vara & Johnson 2001, Lau et al. 2002). Além disso, o fígado é um órgão em que a metástase ocorre com muita frequência (Straw 1996, Patnaik et al. 1981), porém, como as neoplasias que não tem origem nos hepatócitos não expressam o HSA (Wennerberg et al. 1993, Ramos-Vara & Johnson 2001, Lau et al. 2002) nós descartamos a possibilidade de metástase. Desse modo, a utilização da imunoistoquímica para a detecção desse antígeno foi útil para fazer a diferenciação com outras neoplasias hepáticas e não hepáticas, com maior sensibilidade e especificidade.

Apesar de não ser improvável a ocorrência de neoplasias em animais silvestres, o registro de Carcinoma Hepatocelular em *Leopardus pardalis* constitui um fato singular, pois se trata de uma neoplasia rara descrita pela primeira vez nesta espécie. O diagnóstico de carcinoma hepatocelular em Jaguatirica, acrescenta conhecimentos novos sobre essa neoplasia nas espécies animais e sobre a sua epidemiologia, assim, contribuindo para melhor conhecimento da relação animal/ambiente/patógenos, que podem interferir com a sobrevivência desses animais criados em cativeiro ou livres na natureza.

CONCLUSÃO

Os resultados anatomohistopatológicos, auxiliados pela imunoistoquímica, permitiram concluir pelo diagnóstico de carcinoma hepatocelular trabecular metastático em *Leopardus pardalis* criado em cativeiro. Este estudo constitui o primeiro registro, de carcinoma hepatocelular nessa espécie animal.

REFERÊNCIAS

- Anderson L.J. & Sandison A.T. 1968. Tumor of the liver in cattle, sheep and pig. *Cancer* 21:289-301.
- Anthony P.P. & Bannasch P. 1994. Tumours and tumour-like lesions of the liver and biliary tract, p.635-711. In: MacSween R.N.M. (Ed.), *Pathology of the Liver*. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Badvie S. 2000. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad. Med. J.* 76:4-11.
- Boissan M., Wendum D., Arnaud-Dabernat S., Munier A., Debray M., Lascu I., Danie J.Y. & Lacombe M.L. 2005. Increased Lung Metastasis in Transgenic NM23-Null/SV40 Mice with Hepatocellular Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*.11:836-45.
- Boomkens S.Y., Spee B., Ijzer J., Kisjes R., Egberink H.F., Ingh T.S., Rothuizen J. & Penning L.C. 2004. The establishment and characterization of the first canine hepatocellular carcinoma cell line, which resembles human oncogenic expression patterns. *Comp. Hepatol.* 9:1-10.
- Colina F, Ibarrola C., López-Alonso G. & Pérez-Barrios A. 2007. Protocolo y guía para el diagnóstico histopatológico de carcinoma hepatocelular. *Revta Esp. Patol.* 40:147-160.
- Conte V.P. 2000. Carcinoma Hepatocelular. Parte 1. Considerações e diagnóstico. *Arq. Gastroenterol.* 37:56-68.
- Craig J.R., Peters R.L., Edmonson H.A. & Omata M. 1980. Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescents and young adults with distinct clinicopathologic features. *Cancer* 46:372-9.
- Cullen J.M. & MacLachlan N.J. 2001. Liver biliary system and exocrine pancreas, p.81-124. In: McGavin M.D., Carlton W.W. & Zachary J.F. (Eds), *Thomson's Special Veterinary Pathology*. 3rd ed. Mosby, St Louis.
- Cullen J.M. & Pop J.A. 2002. Tumors of the liver and gall bladder, p.483-508. In: Meuten J.D. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Iowa.
- Cullen J.M. 2007. Liver, biliary system and exocrine pancreas, p.393-462. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- De Jong C.B., Van Wieren S.E., Gill R.M. & Munroe R. 2004. Relationship between diet and liver carcinomas in roe deer in Kielder Forest and Galloway Forest. *Vet. Rec.* 155:197-200.
- Edmondson H.A. 1958. *Atlas of Tumor Pathology: tumors of the liver and intrahepatic bile ducts*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 216p.
- Ettinger S.J. & Feldman E.C. 2004. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato*. Vol.2. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2156p.
- Fattovich G., Giustina G., Schalm S.W., Hadziyannis S., Sanchez J.T., Almasio P., Christensen E., Krogsgaard K., Degos F. & Carneiro M.M. 1995. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in Western European patients with cirrhosis type B: the Eurohep Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis. *Hepatology* 21:77-82.
- Garner M.M., Raymond J.T., Toshkov I. & Tennant B.C. 2004. Hepatocellular carcinoma in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*): tumor morphology and immunohistochemistry for hepadnavirus core and surface antigens. *Vet. Pathol.* 41:353-361.
- Jackson P. & Nowell K. 1996. *Wild Cats: status and conservation action plan*. World Liferwild Fund, Switzerland. 328p.
- Jeong W.I., Do S.H., Sohn M.H., Yun H.S., Know O.D., Kim T.H., Jeong D.H., Williams B.H. & Jeong K.S. 2005. Hepatocellular Carcinoma with Metastasis to the Spleen in a Holstein Cow. *Vet. Pathol.* 42:230-232.

- Jones Y, Wise A., Maes R. & Kiupel M. 2006. Pelioid hepatocellular carcinoma in a domesticated ferret (*Mustela putorius furo*). J. Vet. Diagn. Invest. 18:228-231.
- Lau S.K., Prakash S., Geller S.A. & Alsabeh M.D. 2002. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. Human Pathol. 33:1175-1181.
- Marion P.L., Davelaar Mary J.V., Knight S.S., Salazar F.H., Garcia G., Poppert H. & Robinson W.S. 1986. Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4543-4546.
- McAloose D. & Newton A.L. 2009. Wildlife cancer: a conservation perspective. Nature 9:517-526.
- McKenzie E.J., Jackson M., Sun J., Volotovskyy V. & Gruwel M.L.H. 2005. Monitoring the development of hepatocellular carcinoma in woodchucks using 31P-MRS. Magma 18:201-205.
- Minervi M.I., Demetris A.J., Lee R.G., Carr B.I., Madariaga J. & Nalesnik M.A. 1997. Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. Mod. Pathol. 10:686-692.
- Morrison W.B. 1998. Cancer in dogs and cats: medical and surgical management. 2nd ed. Williams and Wilkins, Philadelphia.785p.
- Munro R. & Youngson R.W. 1996. Hepatocellular tumours in roe deer in Britain. Vet. Rec. 138:542-546.
- Murray J.L. & Gardner G.L. 1997. *Leopardus pardalis*. Mammalian Species 548:1-10.
- Na B., Huang Z., Wang Q., Qi Z., Tian Y., Lu C.-C., Yu J., Hanes M.A., Kakar S., Huang E.J., Ou J.-H.J., Liu L. & Benedict Yen T.S. 2011. Transgenic Expression of Entire Hepatitis B Virus in Mice Induces Hepatocarcinogenesis Independent of Chronic Liver Injury. Plos One 6:1-9.
- Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H. & Johnson G.F. 1981. Canine hepatocellular carcinoma. Vet. Pathol. 18:427-438.
- Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H. & Johnson G.F. 1981. Canine bile duct carcinoma. Vet. Pathol. 18:439-444.
- Placke M.E., Roscoe D.E., Wyand D.S. & Nielsen S.W. 1982. Hepatocellular adenocarcinoma in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Comp. Med. 46:198-200.
- Radonjic M., Haan J.R., Van Erk M.J., Van Dijk K.W., Van denBerg S.A., Groot P.J., Muller M. & Ommen B. 2009. Genome-wide mRNA expression analysis of hepatic adaptation to high-fat diets reveals switch from an inflammatory to steatotic transcriptional program. Plos One 4:1-18.
- Ramos-Vara J.A., Miller M.A. & Johnson G.C. 2001. Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. Vet. Pathol. 38:636-643.
- Salgueiro F.J., Richard A., Gough J., Long A., Weyer U., Cooley W.A., Chambers M.A. & Lesellierx S. 2010. Pelioid hepatocellular Carcinoma in an adult Eurasian Badger (*Meles meles*). J. Comp. Pathol. 142:208-212.
- Selvam G., Swamy M. & Verma Y. 2008. Hepatocellular carcinoma in an Indian buffalo. Buffalo Bulletin 27:170-172.
- Shinga A., Shirota K. & Enomoto M. 2001. Combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma in a dog. J. Vet. Med. Sci.63:483-486.
- Smith H.A., Jones T.C. & Hunt R.L. 1972. Veterinary Pathology. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 197p.
- Snyder R.L., Tyler G. & Summers G.J. 1982. Chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma associated with woodchuck hepatitis virus. Am. J. Pathol. 107:422-425.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system, p.383-388. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer's N. (Eds), Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Straw R.C. 1996. Hepatic tumors, p.248-252. In: Withrow S.J. & MacEwen. (Eds), Small Animal Clinical Oncology. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Strombeck D.R. & Guilford W.G. 1996. Hepatic neoplasms, p.847-859. In: Guilford W.G., Center S.A., Strombeck D.R., Williams D.A. & Meyer D.J. (Eds), Strombeck's Small Animal Gastroenterology. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Thai S.F., Wallen J., De Angelo A.B., George M.H. & Fuscoe J.C. 2001. Detection of early gene expression changes by differential display in the livers of mice exposed to dichloroacetic acid. Carcinogenesis 22:1317-1322.
- Wennerberg A.E., Nalesnik M.A. & Coleman W.B. 1993. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. Am. J. Pathol. 143:1050-1054.
- Wilson F.D., Fitzgerald S.D., Kiupel M., Wlaker R.L., Williams C.B. & Todda D.J. 2007. Occurrence of hepatocellular carcinoma in an adult male Nile lechwe (*Kobus megaceros*). J. Zoo Wildl. Med. 38:329-332.
- Yamauchi M., Nakahara M., Maezawa Y., Satoh S., Nishikawa F., Ohata M., Mizuhara Y., Hirakawa J., Nakajima H. & Fujisawa K. 1993. Prevalence of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis and prior exposure to hepatitis C. Am. J. Gastroenterol. 88:39-43.