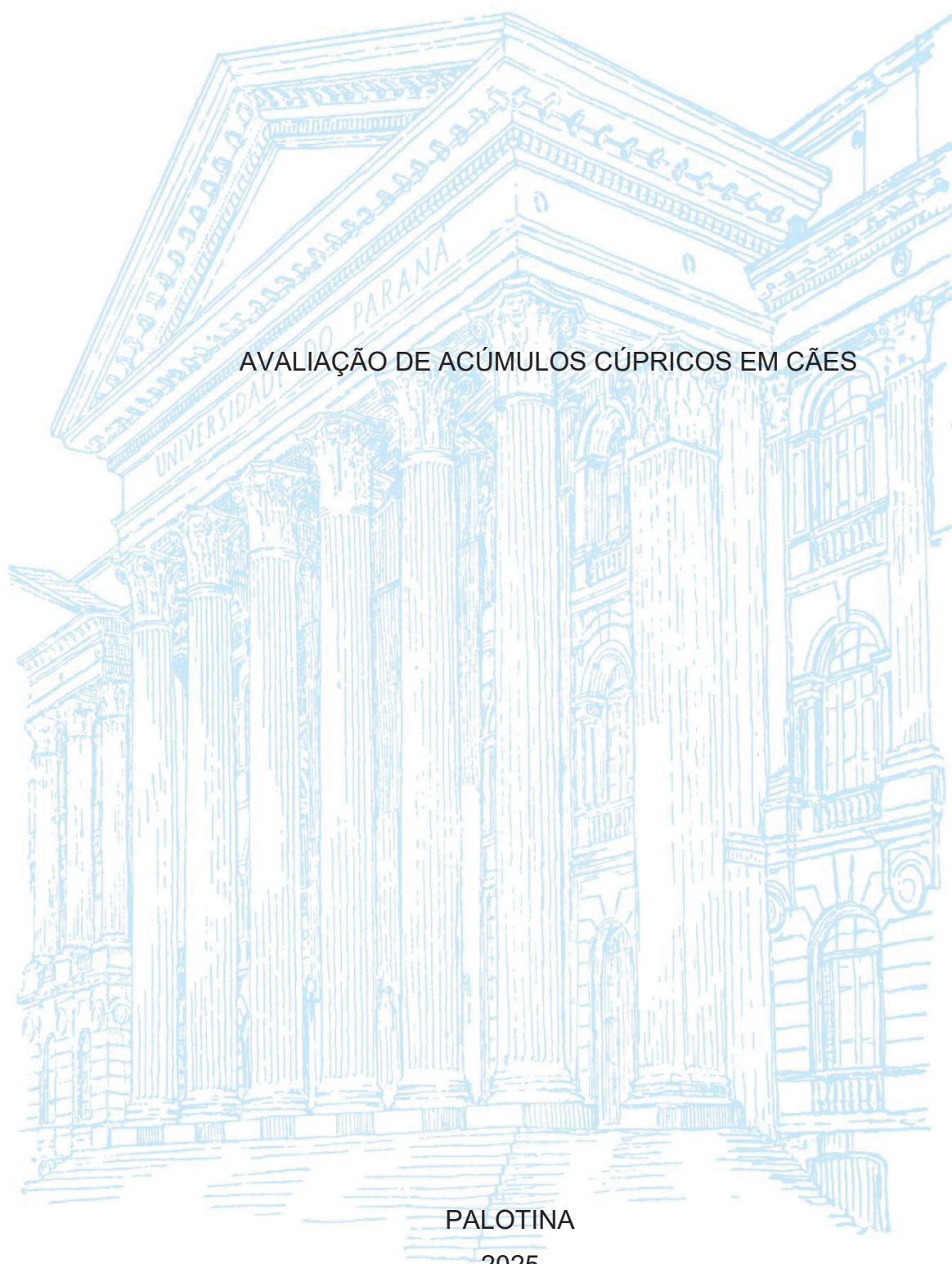


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISAN SMANIOTTO

AVALIAÇÃO DE ACÚMULOS CÚPRICOS EM CÃES



PALOTINA

2025

CRISAN SMANIOTTO

## AVALIAÇÃO DE ACÚMULOS CÚPRICOS EM CÃES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Aline de Marco Viott

PALOTINA

2025

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

S591 Smaniotto, Crisan  
Avaliação de acúmulos cúpricos em cães  
/ Crisan Smaniotto. – Palotina, PR, 2025.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Aline de Marco Viott.

1. Cobre. 2. Hepatopatia. 3. Histopatologia.  
I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade Federal do Paraná.  
III. Título.

CDU 636



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CRISAN SMANIOTTO** intitulada: **AValiação de Acúmulos Cúpricos em Cães**, sob orientação da Profa. Dra. ALINE DE MARCO VIOTT, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 13 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

13/02/2025 18:15:13.0

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

13/02/2025 17:54:19.0

MANOELA MARCHEZAN PIVA

Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica

17/02/2025 11:02:47.0

MARILENE MACHADO SILVA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: [ppgca.ufpr@gmail.com](mailto:ppgca.ufpr@gmail.com)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 422767

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 422767

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desta etapa da minha vida vai muito além dos dois anos aqui vividos, ela concretiza o fim de um ciclo que reflete nas minhas decisões e batalhas de uma jornada que se iniciou em 2014. A vivência acadêmica, seja ela da graduação ou pós graduação, foi um período intenso marcado por muitas reviravoltas que eu jamais esperaria, mas que também me deixam extremamente orgulhoso. Momentos como este trazem memórias fantásticas de todos estes anos, e claro, com muitas inspirações pessoais e profissionais.

Começo agradecendo minha família, que é minha maior fonte de inspiração e que sem ela eu jamais estaria aqui hoje. Deixo um agradecimento especial a todos, especialmente aos meus pais **Fabiane** e **Jair** e minha irmã **Carol**, por sempre me apoiarem em todas as decisões

A todos os meus mentores, em especial as minhas professoras, **Milena**, **Tatiane**, **Fernanda**, **Camila** e **Patrícia**, que de algum modo despertaram algo no meu subconsciente e me incentivaram a lutar pelo profissional que sou, ainda em construção. Preciso enaltecer a primeira pessoa que acreditou em mim e no meu trabalho, abrindo inúmeras portas para que eu pudesse crescer. Prof **Milena**, sem você eu JAMAIS estaria aqui hoje, e eu sou eternamente grato por você ter me abordado naqueles últimos instantes da inscrição da monitoria. Obrigado por demonstrar todo esse amor ao diagnóstico e por me introduzir nessa “vida de laboratório”. Também deixo um agradecimento especial para minha professora **Tatiane** que fez com que eu me apaixonasse pela patologia, você é sem dúvidas a minha primeira e eterna “inspiração patológica”. Aos meus mentores e amigos extra graduação, **Paula** e **Paulo**, eu não tenho palavras para expressar o quão importantes vocês foram, são e serão na minha vida.

A todas as pessoas que em algum momento fizeram parte dessa caminhada, meus amigos, estagiários, colegas de residência e da pós-graduação, vocês são fenomenais e fazem parte da minha história. **Alessandra**, **Amália**, **Arthur**, **Carolina**, **Lilian**, **Lorena**, **Joice**, **Karim**, **Pietra** e **Vinicius**, minha eterna gratidão por toda a ajuda e parceria ao decorrer desses anos, vocês são peças fundamentais na construção desse projeto, sem vocês nada teria funcionado. Eu sou muito grato por saber que essa parceria passou do universo acadêmico para o pessoal, e ter vocês comigo, mesmo de longe, é incrível. **Alessandra**, **Amália** e **Vinicius**, obrigado por me

ouvirem, me acolherem e viverem esse caos de pertinho comigo, vocês não imaginam o quanto são importantes.

Agradeço também a **Carla, Daniele, Joice e Júlia** que compartilharam das lutas diárias e dos inúmeros surtos que surgiram durante esses dois anos da pós-graduação. Meninas da iniciação científica, esse projeto não seria o mesmo sem vocês. **Adrieny, Andressa e Vivian**, obrigado por terem aceitado fazer parte dessa loucura comigo, e agradeço demais por toda a ajuda, comprometimento e companheirismo de vocês. Vocês têm um futuro incrível pela frente, e saibam que eu sempre estarei aqui, em qualquer ocasião. Professora **Manoela**, muita gratidão por ter você fazendo parte do nosso time, obrigado pela sua ajuda, conversas e conselhos nesse período.

Para encerrar esse capítulo com chave de ouro, minha orientadora **Aline de Marco Viott**. Uma pessoa de luz, humana, compreensível, apoiadora, incentivadora, apaixonada pela vida e pelo que faz, que me cativou de um jeito inexplicável. Obrigado por acreditar no meu potencial e me incentivar a buscar sempre mais e além, por toda a paciência que você teve comigo desde o nosso primeiro encontro onde eu me encontrava desesperado, desamparado e com muito medo de embarcar no mundo da Patologia Animal. Obrigado por ter me acolhido e me amado como um filho. Obrigado por ter me ensinado tanto, por ser uma orientadora presente na minha formação e uma mãe na minha vida pessoal. Eu sou eternamente grato por tudo que você fez e ainda faz por mim. Obrigado por viver esse “surto” comigo, claro, de uma forma saudável, e do fundo do meu coração, eu espero que venham muitos mais surtos assim você. Você é uma mulher maravilhosa e uma profissional sensacional, é porto seguro, família, amor e tudo que há de melhor na vida. Do fundo do meu coração, desejo que todo mundo tenha a oportunidade de ter uma Aline na vida. Você é a maior fonte de inspiração pessoal e profissional existente no mundo.

"Conhecimento sem transformação não é sabedoria"

(Paulo Coelho)



## RESUMO

O fígado é um importante órgão envolvido em diversas atividades, sendo responsável pela síntese, armazenamento, biotransformação, metabolismo, secreção e excreção de diversas substâncias, como por exemplo o cobre (Cu). Acúmulos cúpricos podem ser decorrentes do consumo excessivo deste microelemento, defeitos no metabolismo e ineficiência na excreção. Diante do exposto, objetivou-se realizar um estudo histopatológico com auxílio de técnicas específicas, como a coloração de rodanina e espectrofotometria de absorção atômica para identificar possíveis acúmulos cúpricos em cães. Para elaboração do presente trabalho foram coletados fragmentos de tecido hepático de 30 cães submetidos a avaliação necroscópica no Laboratório de Patologia veterinária (LPV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), setor Palotina. As amostras foram coletadas em duplicata, sendo uma parte acondicionada em formol 10% e outra parte congelada, para posterior avaliação histopatológica, graduação por rodanina e quantificação do cobre tecidual por análise espectrofotométrica, respectivamente. Como resultados, constatou-se na análise histológica quadros de acúmulos pigmentares (96,6%), congestão e hiperplasia biliar (93,3%), colestase (76,6%), fibrose periportal (73,3%), degeneração microvacuolar (66,6%), hepatite crônica (56,6%), linfangiectasia (46,6%), pericolangite mononuclear (26,6%), degeneração macrovacuolar e hemorragia (20%), fibrose centrolobular e peri-hepatite mononuclear (13,3%), colapso centro-lobular (6,6%), hepatite piogranulomatosa, hiperplasia nodular e necrose tecidual (3,3%). No escore de rodanina, que utiliza da intensidade da deposição do cobre no citoplasma dos hepatócitos, observou-se o grau 0 em 56,6%, grau 1 em 16,6%, grau 2 em 13,3%, grau 3 em 10% e grau 4 em 3,3% das amostras. A análise espectrofotométrica de todos os animais apresentou concentrações dentro do intervalo de referência para a espécie. Os achados encontrados possibilitaram a identificação de acúmulos cúpricos por meio da análise histopatológica e escore de rodanina, apontando a colestase como uma variável importante e significativa. A correlação destes achados com as concentrações cúpricas teciduais dentro da normalidade reflete na ausência de quadros de intoxicação por cobre, ressaltando assim a necessidade e importância da complementação diagnóstica através de provas complementares e lesões histológicas específicas.

**Palavras-chave:** Cobre, Fígado, Hepatopatia, Histopatologia, Rodanina.



## ABSTRACT

The liver is an important organ involved in several activities, responsible for the synthesis, storage, biotransformation, metabolism, secretion, and excretion of various substances, such as copper (Cu). Copper accumulation may result from excessive consumption of this trace element, metabolic defects, and inefficiency in excretion. Therefore, this study aimed to conduct a histopathological examination using specific techniques, such as rhodanine staining and atomic absorption spectrophotometry, to identify potential copper accumulation in dogs. For the development of this study, liver tissue samples were collected from 30 dogs undergoing necropsy evaluation at the Veterinary Pathology Laboratory (LPV) at the Federal University of Paraná (UFPR), Palotina campus. The samples were collected in duplicate, with one part fixed in 10% formalin and the other frozen for later histopathological analysis, rhodanine scoring, and copper quantification by spectrophotometric analysis, respectively. The results showed histological findings of pigment accumulation (96.6%), congestion and biliary hyperplasia (93.3%), cholestasis (76.6%), periportal fibrosis (73.3%), microvacuolar degeneration (66.6%), chronic hepatitis (56.6%), lymphangiectasia (46.6%), mononuclear pericholangitis (26.6%), macrovesicular degeneration and hemorrhage (20%), centrilobular fibrosis and mononuclear peri-hepatitis (13.3%), centrilobular collapse (6.6%), pyogranulomatous hepatitis, nodular hyperplasia, and tissue necrosis (3.3%). In the rhodanine score, which assesses the intensity of copper deposition in the cytoplasm of hepatocytes, grade 0 was observed in 56.6%, grade 1 in 16.6%, grade 2 in 13.3%, grade 3 in 10%, and grade 4 in 3.3% of the samples. Spectrophotometric analysis of all livers showed copper concentrations within the reference range for the species. The findings enabled the identification of copper accumulation through histopathological analysis and rhodanine scoring, indicating cholestasis as a significant and important variable. The correlation of these findings with copper concentrations within normal tissue levels suggests the absence of copper toxicity, emphasizing the need for and importance of complementary diagnostic.

**Keywords:** Copper, Liver, Hepatopathy, Histopathology, Rodanine.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1- Cortes histológicos de fígado evidenciando fibrose periportal com hiperplasia biliar, colestase e congestão, 8x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(A)**; hepatite mononuclear, 6x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(B)**; pericolangite mononuclear, colestase e linfangiectasia 11x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(C)** e degeneração microvacuolar, 10x, (HE) **(D)**.....42
- FIGURA 2 - Cortes histológicos de fígado evidenciando marcação positiva para cobre com concentração intracitoplasmática variando de 50% a 75% (grau 4), 10x, Rodanina **(A)**; 40x, Rodanina **(B)**.....43

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1 –	Detalhamento racial, etário e sexual com classificação histológica relacionada a hepatite crônica, graduação de rodanina, quantificação cúprica por meio da análise espectrofométrica e dados nutricionais.....	44
Tabela 2 –	Detalhamento dos resultados do modelo linear (GLM) realizado para as variáveis “rodanina” e “padrões lesionais histopatológicos” .....	46

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>13</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 O FÍGADO .....	14
2.1.1 Morfologia hepática .....	14
2.1.2 Afecções hepáticas .....	15
2.1.3 Hepatopatias cúpricas .....	16
2.1.4 Diagnóstico .....	17
<b>3 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>
<b>4 CAPÍTULO 1 - IDENTIFICAÇÃO DE ACÚMULOS CÚPRICOS HEPÁTICOS POR MEIO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, ESCORE DE RODANINA E ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....</b>	<b>24</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	27
<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.2.1 Amostragem .....	29
4.2.2 Avaliação histopatológica .....	29
4.2.3 Hematoxilina-Eosina.....	29
4.2.4 Rodanina .....	30
4.2.5 Espectrofotometria de Absorção Atômica .....	30
4.2.6 Análise estatística .....	31
<b>4.3 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

# 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1.1 INTRODUÇÃO

Com o decorrer dos últimos anos evidenciou-se o aumento da proximidade e convivência entre seres humanos e seus animais de estimação, havendo formação de grandes laços emocionais dentro da maioria das famílias, o que acaba resultando em uma maior longevidade dos *pets*. O aumento da expectativa de vida dos animais domésticos acaba sendo um reflexo das melhorias e bem-estar promovido por uma série de fatores, especialmente relacionados ao manejo nutricional, programas de vacinação eficientes, diagnóstico precoce de diversas doenças e adoção de protocolos clínicos e terapêuticos mais específicos e eficazes para cada caso (NUNES, GERING & LOPES, 2016; ROCHA, 2008)

Em relação às questões nutricionais, com o avanço da tecnologia e demanda do consumidor, uma grande variedade de formulações específicas surgiu. Neste contexto é importante ressaltar a diversidade das mais distintas formulações, como aquelas com elevados teores de ingredientes de origem animal e/ou vegetal, dietas naturais e terapêuticas, contendo especificidades para algumas afecções. Embora sejam pontos extremamente importantes e necessários, sabe-se que essa busca incessante pelo aprimoramento alimentar pode também gerar problemas futuros. Uma questão em específico vem ganhando destaque nos últimos tempos, que é o aumento na incidência de hepatopatia crônicas associadas ao cobre, fato que pode ter coincidido com a mudança do tipo deste microelemento utilizado nas formulações nutricionais dos cães (CENTER, et al, 2021; ROCHA, 2008)

Além desta teoria, é importante enfatizar que outras condições também estão envolvidas no desenvolvimento das hepatopatias cúpricas, como os defeitos no metabolismo e excreção do cobre pelo fígado. Compreender com clareza qual é a razão envolvida por trás do desenvolvimento desta afecção é uma tarefa complicada e requer o desenvolvimento de pesquisas genéticas e nutricionais mais detalhadas (SOARES, et al, 2020; BRUNETTO, et al, 2013; CULLEN & BROWN, 2013; HOFFMANN, 2009; MOTTIN, et al, 2013; THORNBURG, 2000).

No entanto, existem maneiras de identificar os acúmulos cúpricos no tecido hepático, seja por meios diagnósticos qualitativos ou quantitativos. A principal técnica empregada na rotina é a avaliação histopatológica, que consiste na coleta de fragmentos teciduais, nos quais buscam-se padrões lesionais característicos, como por exemplo a presença de cobre no interior dos hepatócitos, que também pode ser identificado com auxílio de colorações específicas, como a rodanina. Além do mais, a

dosagem dos níveis cúpricos do tecido hepático também pode ser realizada por diversas técnicas rotineiramente empregadas na identificação de minerais, como por exemplo a espectrofotometria de absorção atômica (HOFFMANN, 2009; JOHNSTON, et al 2013; SMEDLEY, MULLANEY, RUMBHEIA, 2009; VIEIRA & DRIEMEIER, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a identificação de cobre no tecido hepático de cães por meio do exame histopatológico e da coloração de rodanina e comparar esses resultados com o da espectrofotometria em absorção atômica.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O FÍGADO**

#### **2.1.1 *Morfologia hepática***

O fígado é considerado o maior órgão cavitário do corpo, chegando a apresentar peso médio de 3% a 4% do peso corporal de um cão adulto. Anatomicamente encontra-se localizado na porção cranial da cavidade abdominal, imediatamente atrás do diafragma. Nos carnívoros é dividido em quatro lobos, quatro sublobos e dois processos, sendo que ambos os lobos hepáticos esquerdo e direito são subdivididos em lobo medial e lateral, além do lobo hepático caudado, que é fragmentado em processo caudado e processo papilar. O aporte sanguíneo hepático ocorre por meio da drenagem que a veia porta realiza no trato digestivo, fornecendo cerca de 60% a 70% do fluxo sanguíneo hepático aferente, e a artéria hepática fornece o restante do aporte sanguíneo (CULLEN & BROWN, 2013; DYCE, SACK & WENSING, 2004).

A unidade funcional do fígado é denominada de lóbulo hepático, que microscopicamente corresponde a uma estrutura hexagonal que mede de 1 a 2 mm de largura, formada por cordões de hepatócitos. Ao centro desta estrutura é possível observar a veia central ou vênula hepática, e nos ângulos hexagonais encontram-se os tratos portais, formados por ductos biliares, ramos da veia porta, artéria hepática, nervos e vasos linfáticos (CULLEN & BROWN, 2013).

Além de ser o maior órgão cavitário, o fígado é também considerado o maior órgão glandular, apresentando funções exócrinas e endócrinas. Sua atividade exócrina está relacionada à produção da bile, que é direcionada e armazenada pela vesícula biliar e responsável pela emulsificação dos componentes gordurosos antes da absorção. Já sua função endócrina está associada a liberação de substâncias que auxiliam no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, visto que todos os

produtos resultantes da digestão passam pelo fígado antes entrarem na circulação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; KÖNIG, et al., 2014).

Os hepatócitos, que são as células hepáticas propriamente ditas, são caracterizados morfológicamente pelo seu aspecto poliédrico, e seu tamanho varia de 20 a 30 µm. São compostos por um ou dois núcleos arredondados e grandes contendo de um a dois nucléolos. No interior do seu citoplasma há abundante quantidade de retículo endoplasmático liso e rugoso, que são essenciais para as diversas atividades relacionadas ao fígado. O retículo endoplasmático rugoso forma vários agregados intracitoplasmáticos (corpos basofílicos), que são responsáveis pela síntese de proteínas em ribossomos, como a albumina e o fibrinogênio. Já o retículo endoplasmático liso é responsável por processos de oxidação, metilação e conjugação necessários para a inativação ou detoxificação de algumas substâncias antes de serem eliminadas do organismo, como por exemplo a conjugação da bilirrubina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As características morfofisiológicas dos hepatócitos os tornam células amplamente funcionais, realizando atividades que vão desde a síntese, armazenamento, biotransformação, metabolismo, secreção e excreção de diversas substâncias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; SANCHES, et al., 2013). Dentre estas atividades destacam-se algumas que são extremamente importantes, como o metabolismo da bilirrubina, ácidos biliares, carboidratos, lipídios e xenobióticos, além de síntese de proteínas e atuação na função imunológica. O fígado é responsável pela produção de aproximadamente 15% das proteínas do organismo, sendo algumas delas a albumina, lipoproteínas e fatores de coagulação II, V, VII e XIII. É também o principal sítio do metabolismo da amônia em ureia, para posterior excreção via urina (CULLEN & BROWN, 2013).

### *2.1.2 Afecções hepáticas*

Como o fígado é um órgão envolvido em muitas atividades e é considerado um órgão sistêmico, acaba sendo alvo de diversas afecções, sejam elas de origem primária ou secundária. As doenças hepáticas incluem quaisquer afecções que causem lesão hepática, e dentre as principais hepatopatias que podem ser encontradas, são reconhecidas as anomalias do desenvolvimento e afecções congênitas, distúrbios circulatórios e metabólicos, acúmulos hepáticos, doenças de depósito lisossômico, enfermidades infecciosas e inflamatórias, lesões proliferativas,



hiperplásicas e tumorais (BROWN, WETTERE & CULLEN, 2017; CULLEN & BROWN, 2013).

Independente da causa da doença hepática, o fígado é um órgão que possui alta capacidade de armazenamento e regeneração, fazendo com que o diagnóstico das hepatopatias na avaliação clínica dos pacientes seja ainda mais complexo, visto que muitas vezes as manifestações clínicas apresentadas possam ser leves, inespecífica e algumas vezes, ausentes (ROTHUIZEN & MEYER, 2004). Neste contexto, ressalta-se que muitas vezes é necessária a perda de aproximadamente 70% a 80% da capacidade funcional do fígado antes de iniciarem as primeiras manifestações clínicas e assim se estabelecer um quadro de insuficiência hepática, impedindo muitas vezes o diagnóstico precoce, tornando o prognóstico desfavorável (ALLISON, 2015; LEVEILLE-WEBSTER, 2004).

### *2.1.3 Hepatopatias cúpricas*

Ao se tratar mais especificamente das hepatopatias de origem metabólica e de armazenamento hepático, um exemplo clássico é o cobre (Cu), que é um microelemento fundamental para o metabolismo celular. O fígado é principal órgão envolvido na metabolização do cobre, responsável pela captação, armazenamento, distribuição e excreção. Este microelemento é armazenado pelos lisossomos localizados no citoplasma dos hepatócitos, transportado com o auxílio da ceruloplasmina que é uma proteína produzida pelo fígado e eliminado por excreção biliar. Portanto, as três principais causas do acúmulo de cobre no fígado ocorrem pelo excesso desse mineral via alimentação, alterações que causem defeitos no metabolismo e excreção do cobre. Assim, em qualquer distúrbio que ocorra em uma destas etapas, pode acarretar no acúmulo de cobre nos hepatócitos, estimulando a produção de oxigênio reativo e iniciando reações de peroxidação lipídica destrutiva, que culminam em alterações nas mitocôndrias e na membrana celular dos hepatócitos (CULLEN & BROWN, 2013; HARRIS, 2000; HOFFMANN, 2009).

De modo geral, quando a causa da intoxicação por cobre é de origem alimentar o processo é gradativo, embora não seja tão comum em cães. Esta toxicose ocorre mais frequentemente em ruminantes, mais especificamente em ovinos, quando há a ingestão de água ou alimentos ricos em cobre ou em casos de deficiência de molibdênio, que acaba por estimular a captação do cobre intestinal (BRUNETTO, et al, 2013; CULLEN & BROWN, 2013; SOARES, et al, 2020). As demais causas, assim como as citadas anteriormente, envolvem defeitos no metabolismo do cobre pelo

fígado, que pode ser consequência de afecções pré-existentes ou ineficiência na excreção do cobre. Nesta última, acredita-se que o comprometimento da excreção do cobre pela vesícula biliar esteja associado à fibrose, inflamação e/ou colestase. Em cães, na raça Bedlington Terrier há um distúrbio de carácter genético autossômico recessivo com mutação no gene COMDD1 que prejudica a excreção desta molécula, levando ao acúmulo progressivo do cobre no fígado. Embora esta alteração genética ocorra somente nos Bedlingtons Terriers, já foram reportados casos de acúmulo de cobre hepático em Labradores Retrievers, Dálmatas, Dobermans, West Highland White Terriers e Sky Terriers (CULLEN & BROWN, 2013; HOFFMANN, 2009; MOTTIN, et al, 2013; THORNBURG, 2000).

#### *2.1.4 Diagnóstico*

O diagnóstico clínico das afecções hepáticas envolve uma ampla sintomatologia, com manifestações clínicas muito variáveis. Comumente algumas das manifestações clínicas mais inespecíficas presentes nesta condição incluem vômito, diarreia, alteração no tamanho hepático, poliúria, polidipsia, disúria e palidez das mucosas. Por outro lado, a apresentação de icterícia, efusão abdominal, manifestações neurológicas (encefalopatia hepática) e a síndrome hepatocutânea são achados clínicos importantes da doença (HOWES, 2001). Em estudos retrospectivos realizados por Smedley, Mullaney & Rumbeiha (2009) e Vieira & Driemeier (2015), as manifestações clínicas dos animais variaram de hiporexia, perda de peso, icterícia, encefalopatia hepática, diarreia a êmese.

A avaliação laboratorial hepática deve ser realizada sempre que possível, principalmente quando há suspeita de possíveis hepatopatias. Basicamente, existem três tipos testes bioquímicos para elucidação da origem da alteração. Os testes para detecção de lesão hepática incluem a dosagem da atividade sérica de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Sorbitol Desidrogenase e Glutamato desidrogenase. Todas estas enzimas citadas acima são de extravasamento, encontradas no citoplasma dos hepatócitos, portanto quando há lesão de membrana dos hepatócitos elas são liberadas na circulação sanguínea, e dependendo no grau e extensão da lesão podem exibir resultados acima dos valores de referência. Para cães, a atividade sérica da ALT é a mais indicada do que a da AST, visto sua maior hepatoespecificidade. Outros testes importantes são os de detecção de colestase, como a Fosfatase Alcalina (FA) e a Gama-Glutamiltransferase (GGT). Ambas são enzimas de indução, ou seja, é necessário um estímulo para

liberação, e seu aumento normalmente é associado à hiperplasia e obstrução biliar. E por fim, a avaliação da função hepática, onde são realizadas mensurações das concentrações séricas de substâncias que são produzidas, metabolizadas e/ou excretadas pelo sistema hepatobiliar, como os ácidos biliares, albumina, amônia, bilirrubina, colesterol, fatores de coagulação, glicose e ureia (ALISON, 2015; GOMES, et al, 2008).

Embora o hemograma seja o exame hematológico mais solicitado na rotina, quando falamos em alterações hepáticas ele não nos fornece dados substanciais e precisos quando isolados. As principais alterações que podemos encontrar estão ligadas às morfologias eritrocitárias, onde denomina-se poiquilocitose a manifestação de eritrócitos anormais. Dentre as mais diversificadas anormalidades morfológicas, algumas delas podem ser secundárias a alterações hepáticas, porém não é possível determinar com clareza qual o tipo de lesão que originou a alteração observada. Os acantócitos são a principal manifestação associada a hepatopatias, porém os leptócitos e equinócitos também podem apresentar associação. É extremamente importante ressaltar que para realizar a interpretação de qualquer exame, é necessário correlacionar todos os resultados, sejam eles manifestações clínicas, exames de imagem, hemograma, bioquímica sérica e achados histopatológicos e /ou necroscópicos (THRALL, 2015).

A realização de exames de imagiologia, como a radiografia (RX) e a ultrassonografia (US) também devem ser preconizados nestes pacientes. O exame ultrassonográfico é capaz de identificar anormalidades parenquimatosas, como presença de nódulos, massas, abscessos e cistos, além de avaliar anormalidades vasculares e distúrbios do trato hepatobiliar. Embora algumas vezes não seja possível identificar a causa base da alteração, estes exames fornecem resultados substanciais que proporcionam a adoção de uma conduta diagnóstica adequada, como por exemplo a realização de uma biópsia hepática para avaliação histopatológica, que por meio do padrão lesional encontrado descarta e/ou confirma potenciais afecções. Em alguns pacientes, dependendo do estado clínico, este procedimento invasivo muitas vezes se torna contra indicado (DAY, 2004; HOWES, 2011).

Embora seja possível a dosagem sérica do cobre, assim como realizado por Marques et al (2011) em um estudo com ovinos e caprinos, nos cães aparentemente não é uma prática muito comum e a literatura é escassa. Dentre os exames passíveis de serem realizados, o diagnóstico final de acúmulo de cobre hepático dificilmente é

realizado, exceto em casos onde seja realizada biópsia hepática, avaliação histopatológica e dosagem tecidual do cobre. Neste contexto, a maioria dos relatos encontrados na literatura realizam uma abordagem diagnóstica *pós-mortem*, onde é possível a avaliação macroscópica minimalista, com coleta de material adequado e suficiente para avaliações mais específicas. Os achados de necrópsia geralmente são inespecíficos e variam de acordo com grau de lesão. Basicamente consistem em icterícia do subcutâneo, fígado retraído com aspecto nodular, cirrose micro e macro nodular, friável e de coloração alaranjada/acobreada, ascite e rins acastanhados (HOFFMANN, 2009; JOHNSTON, et al 2013; SMEDLEY, MULLANEY, RUMBHEIA, 2009; VIEIRA & DRIEMEIER, 2015).

A avaliação histopatológica consiste basicamente na identificação de padrões lesionais e presença de pigmentos intracitoplasmáticos. Além da observação de material acobreado no citoplasma dos hepatócitos, nota-se proliferação de ductos biliares e tecido conjuntivo, infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, nódulos de regeneração e necrose centrolobular (JOHNSTON, et al 2013; SMEDLEY, MULLANEY, RUMBHEIA, 2009; VIEIRA & DRIEMEIER, 2015). Em casos onde sejam observados pigmentos de aspecto acobreado, recomenda-se a realização de colorações especiais, que os marcam e evidenciam mais claramente. Preconizam-se como marcadores para o cobre, a coloração de Timms, rodanina, ácido rubeânico e a orceína (HOFFMANN, 2009; MOTTIN, et al, 2013; SMEDLEY, MULLANEY & RUMBEIHA, 2009; VIEIRA & DRIEMEIER, 2015).

Por fim, faz-se importante a associação de todos estes achados com a determinação das concentrações de cobre hepático, utilizando-se da espectrometria de absorção atômica, onde valores inferiores a 400 µg/g são considerados normais para a espécie canina, e concentrações superiores já podem ser consideradas patogênicas, quando associadas aos demais achados clínico-patológicos (JOHNSTER, et al, 2009; JOHNSTON, et al, 2013; PILLAI, et al, 2016).

### 3 REFERÊNCIAS

ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial da função hepática. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. (eds). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora ROCA LTDA (2015). Cap 26, p. 346 – 365.

BROWN, D. L.; WETTERE, J. V.; CULLEN, J. M. Hepatobiliary system and exocrine pancreas. In: ZACHARY, J. F. (ed). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 6 ed. St. Louis, Missouri: ELSEVIER (2017). Cap 8, p. 412 – 432.

BRUNETTO, M. A; TESHIMA, E; NOGUEIRA, S. P. JEREMIAS, J. T.; CARCIOFI, A. C. Manejo nutricional nas doenças hepática. **Acta Scientiae Veterinariae**, 35 (Supl2): s233 - s235, 2007.

CENTER, S. A.; RICHTER, K. P.; TWEDT, D. C. WAKSHLAG, J. J.; WATSON, P. J.; WEBSTER, C. R. L. Is it time to reconsider current guidelines for cooper content in commercial dog foods? **Journal of American Veterinary Medical Association (JAVMA)**, vol 258 (4), 2021.

CULLEN, J. M.; BROWN, D. L. Sistema hepatobiliar e pâncreas exócrino. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (eds). **Bases da Patologia em Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora ELSEVIER LTDA (2013). Cap 8, p. 407 – 453.

DAY, D. G. Indicações e técnicas de biópsia do fígado. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (eds). **Tratado de medicina interna veterinária doenças do cão e do gato**. 5 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2004). Cap 142, v. 2, p. 1365 – 1369.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. (eds). Aparelho digestório. In: **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed, Rio de Janeiro: Editora ELSEVIER LTDA (2004). Cap. 3, p. 133 – 136.

HARRIS, E. D. Cellular copper transport and metabolism. **Annual Review of Nutrition**. 20:291 – 310, 2000.

HOFFMANN, G. Copper-Associated Liver Diseases. **Veterinary Clinics: Small Animal**. 39:489 – 511, 2009.

HOWES, F. **Hepatopatias crônicas em cães**. Monografia de Especialização - Programa de Residência Médico-Veterinária na Área de Concentração de Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2011.

JOHNSTON, A. N.; CENTER, S. A.; MCDONOUGH, S. P.; WAKSHLAG, J. J.; WARNER, K. L. Hepatic copper concentrations in Labrador Retrievers with and without chronic hepatitis: 72 cases (1980–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol 242, no. 3, february 2013.

JOHNSTON, A. N.; CENTER, S. A.; MCDONOUGH, S. P.; WARNER, K. L. Influence of biopsy specimen size, tissue fixation, and assay variation on copper, iron, and zinc concentrations in canine livers. **American Journal of Veterinary Research**, vol 70, no. 12, december 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (eds). Órgãos associados ao sistema digestório. In: **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2004). Cap. 16, p. 317 – 33.

KÖNIG, H. E.; SÓTONYI, P.; RUBERTE, J.; LIEBICH, H. G. Sistema digestório. In: KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos – Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. São Paulo: ARTMED Editora LTDA (2014). Cap. 7, p. 364 – 372.

LEVEILLE-WEBSTER, C. R. Diagnóstico laboratorial de doenças hepatobiliares. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (eds). **Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2004). Cap 141, p. 1348 – 1363.

MARQUES, A. V.; SOARES, P. C.; RIET-CORREA, F.; MOTA, I. O.; SILVA, T. L. A.; NETO, A. V. B.; SOARES, F. A. P.; ALENCAR, S. P. Teores séricos e hepáticos de cobre, ferro, molibdênio e zinco em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31 (5), 2011.

MOTTIN, T. S.; PINTO, L. A. T.; PÖPPL, A. G.; MACEDO, A. S.; DAL-BÓ, I. S. BANDINELLI, M. B.; GERARDI, D. G.; DRIEMEIER, D. BECK, C. A. C. Hepatopatia crônica associada ao acúmulo de cobre em um cão da raça American Pitbull Terrier. **Acta Scientiae Veterinariae**. 41 (Suppl 1): 30, 2013.

NUNES, N.; GERING, A. P.; LOPES, P. C. F. Anestesia do Paciente com Câncer. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. (eds). *Oncologia em cães e gatos*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Roca (2016). Cap. 11, p. 254.

PILLAI, S.; CENTER, S. A.; MCDONOUGH, S. P.; DEMARCO, J.; PINAT, J. HENDERSON, A. K.; COOPER, J.; BOLTON, T.; SHARPE, K.; COLINA, S.; BENEDITO, A. G.; HAVILAND, R. Ductal plate malformation in the liver of boxer dogs: clinical and histological features. **Veterinary Pathology Online**first, january 2016.

ROCHA, M; A. Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol 37, p. 42-48, 2008.

ROTHUIZEN, J.; MEYER, H. P. Anamnese, exame físico e sinais da doença hepática. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2004). Cap 141, p. 1342 – 1347.

SANCHES, O. C.; GIUFFRIDA, R.; CAVALETI, P.; SOUZA, R. V. M.; PEREIRA, V. C. Avaliação do fígado de cães necropsiados no Hospital Veterinário da UNOESTE. **Colloquium Agrariae**, vol. 9, n. Especial, p. 72-78, 2013.

SMEDLEY, R.; MULLANEY, T.; RUMBELIHA, W. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers. **Veterinary Pathology**, 46:484 - 490, 2009.

SOARES, R. C., BILHALVA, M. A.; RONDELLI, M. H.; BASTOS, R. F. FIGHERA, R. GRECCO, F. B. Hepatite crônica associada a intoxicação por cobre em cão - Relato das alterações anatomopatológicas hepáticas. In: **6ª Semana Integrada da UFPEL – Anais do XXIX Congresso de Iniciação Científica**, 2020.

THRALL, M. A. Doenças linfoproliferativas e neoplasias mielóides. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLIOSN, R. W.; CAMPBELL, T. W. (eds). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed, Rio de Janeiro: Editora ROCA LTDA (2015). Cap 5, p. 52 – 57.



TEBALDI, F. L. H.; SILVA, J. F. C.; VASQUEZ, H. M.; THIEBAUT, J. T. L. Composição mineral das pastagens das regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro: 1. Cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio e enxofre. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29 (2), 2000.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A., FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia: normal e patológica**. 2.ed. São Paulo: Manole Ltda, pp.19-132, 2003.

THORNBURG, L. P. A perspective on copper and liver disease in the dog. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, 12:101–110, 2000.

VIEIRA, C. R.; DRIEMEIER, D. Intoxicação crônica por cobre em caninos. In: **Anais do Salão de Iniciação Científica – LUME UFRGS**, 27: 19 – 23, 2015.

#### **4 CAPÍTULO 1 - IDENTIFICAÇÃO DE ACÚMULOS CÚPRICOS HEPÁTICOS POR MEIO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, ESCORE DE RODANINA E ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.**

Capítulo reservado para o artigo “Identificação de acúmulos cúpricos hepáticos por meio de análise histopatológica, escore de rodanina e espectrofotometria de absorção atômica”. Este capítulo segue as normas para publicação da revista Ciência Rural.

**Identification of hepatic cupric accumulations through histopathological analysis, rhodanine score and atomic absorption spectrophotometry**

**Identificação de acúmulos cúpricos hepáticos por meio de análise histopatológica, escore de rodanina e espectrofotometria de absorção atômica**

**Crisan Smaniotto<sup>1\*</sup> Andressa Caroline dos Anjos Leite<sup>1</sup> Vivian Terumi Sawada<sup>1</sup> Adrieny Lenartovicz<sup>1</sup> Vinicius Dahm<sup>1</sup> Amália Ferronato<sup>1</sup> Aline de Marco Viott<sup>1</sup>**

**RESUMO**

O fígado é um importante órgão envolvido em diversas atividades, sendo responsável pela síntese, armazenamento, biotransformação, metabolismo, secreção e excreção de diversas substâncias, como por exemplo o cobre (Cu). Acúmulos cúpricos podem ser decorrentes do consumo excessivo deste microelemento, defeitos no metabolismo e ineficiência na excreção. A identificação desta condição é complexa, e requer uma abordagem diagnóstica com auxílio de técnicas integrativas. Portanto, o objetivo do presente estudo é identificar a presença de acúmulos cúpricos por meio da análise histopatológica do tecido hepático, aplicação da coloração de rodanina e quantificação tecidual por meio da espectrofotometria de absorção atômica. Amostras de 30 cães foram submetidas ao processamento histopatológico rotineiro, onde constataram-se quadros de acúmulos pigmentares (96,6%), congestão e hiperplasia biliar (93,3%), colestase (76,6%), fibrose periportal (73,3%), degeneração microvacuolar (66,6%), hepatite crônica (56,6%), linfangiectasia (46,6%), pericolangite mononuclear (26,6%) degeneração macrovacuolar e hemorragia (20%), fibrose centrolobular e peri-hepatite

<sup>1\*</sup>Universidade Federal do Paraná (UFPR), CEP 89950-000, Palotina, PR, Brasil. E-mail: crisansmaniotto@hotmail.com. Autor para correspondência.

1 mononuclear (13,3%), colapso centro-lobular (6,6%), hepatite piogranulomatosa,  
2 hiperplasia nodular e necrose tecidual (3,3%). No escore de rodanina que se utiliza da  
3 intensidade da deposição do cobre no citoplasma dos hepatócitos, observou-se o grau  
4 0 em 56,6%, grau 1 em 16,6%, grau 2 em 13,3%, grau 3 em 10% e grau 4 em 3,3%.  
5 Em relação a análise espectrofométrica todas as quantificações mantiveram-se dentro  
6 da faixa de normalidade. Os achados encontrados possibilitaram a identificação de  
7 acúmulos cúpricos por meio da análise histopatológica e escore de rodanina,  
8 apontando a colestase como uma variável significativa.

9 **Palavras-chave:** cobre, fígado, hepatopatia, microscopia.

10

## 11 **ABSTRACT**

12 The liver is an important organ involved in various activities, responsible for the  
13 synthesis, storage, biotransformation, metabolism, secretion, and excretion of various  
14 substances, such as copper (Cu). Copper accumulation can result from excessive  
15 intake of this microelement, metabolic defects, and inefficiency in excretion. The  
16 identification of this condition is complex and requires a diagnostic approach with the  
17 aid of integrative techniques. Therefore, the objective of the present study is to identify  
18 the presence of copper accumulation through histopathological analysis of liver tissue,  
19 application of rhodanine staining, and tissue quantification using atomic absorption  
20 spectrophotometry. Samples from 30 dogs were submitted to routine histopathological  
21 processing, where various findings were observed: pigment accumulation (96.6%),  
22 congestion and bile duct hyperplasia (93.3%), cholestasis (76.6%), periportal fibrosis  
23 (73.3%), microvacuolar degeneration (66.6%), chronic hepatitis (56.6%),  
24 lymphangiectasia (46.6%), mononuclear pericholangitis (26.6%), macrovacuolar  
25 degeneration and hemorrhage (20%), centrolobular fibrosis and mononuclear peri-

1 hepatitis (13.3%), centrolobular collapse (6.6%), pyogranulomatous hepatitis, nodular  
2 hyperplasia, and tissue necrosis (3.3%). In the rhodanine score, which uses the  
3 intensity of copper deposition in the cytoplasm of hepatocytes, grade 0 was observed  
4 in 56.6%, grade 1 in 16.6%, grade 2 in 13.3%, grade 3 in 10%, and grade 4 in 3.3%.  
5 Regarding spectrophotometric analysis, all quantifications remained within the normal  
6 range. The findings allowed the identification of copper accumulation through  
7 histopathological analysis and rhodanine scoring, indicating cholestasis as a significant  
8 variable.

9 **Key words:** copper, liver, hepatopathy, microscopy.

10

#### 11 **4.1 INTRODUÇÃO**

12 O fígado é principal órgão envolvido na captação, armazenamento,  
13 metabolização, distribuição e excreção do cobre (Cu), que é um microelemento  
14 fundamental para o metabolismo celular, armazenado pelos lisossomos localizados  
15 no citoplasma dos hepatócitos, transportado com o auxílio da ceruloplasmina que é  
16 uma proteína produzida pelo fígado e eliminado por excreção biliar. Portanto, as três  
17 principais causas do acúmulo de cobre no fígado ocorrem pelo excesso desse mineral  
18 via alimentação ou por alterações que cursam com defeitos no metabolismo ou  
19 excreção do cobre (BROWN et al., 2017; HOFFMANN, 2009; HARRIS, 2000).

20 De um modo geral, quando a causa do acúmulo cúprico é de origem alimentar  
21 o processo é gradativo, embora não seja tão comum em cães. As demais causas,  
22 envolvem defeitos no metabolismo do cobre pelo fígado, que pode ser consequência  
23 de afecções pré-existentes ou ineficiência na excreção do cobre. Em cães, na raça  
24 Bedlington Terrier há um distúrbio de carácter genético autossômico recessivo com  
25 mutação no gene COMDD1 que prejudica a excreção desta molécula, levando ao  
26 acúmulo progressivo de cobre no fígado. Embora esta alteração genética ocorra

1 somente nos Bedlingtons Terriers, já foram reportados casos de acúmulo de cobre  
2 hepático em Labradores Retrievers, Dálmatas, Dobermans, West Highland White  
3 Terriers e Sky Terriers (BROWN et al., 2017; MOTTIN et al., 2013; HOFFMANN, 2009;  
4 THORNBURG, 2000).

5 O diagnóstico das hepatopatias cúpricas é complexo, sendo necessária a  
6 correlação clínica aos exames complementares, especialmente a avaliação  
7 hematológica, bioquímica, ultrassonográfica e radiográfica. Outras técnicas  
8 diagnósticas também são preconizadas, como a dosagem cúprica sérica e/ou tecidual  
9 e avaliação histopatológica do tecido hepático. Preconizam-se como marcadores para  
10 o cobre, a coloração de Timms, rodanina, ácido rubeânico e a orceína (THRALL, 2015;  
11 MOTTIN et al., 2013; HOFFMANN, 2009; SMEDLEY et al., 2009).

12 Faz-se importante a associação de todos estes achados com a determinação  
13 das concentrações de cobre hepático, utilizando-se da espectrometria de absorção  
14 atômica, onde valores inferiores a 400 µg/g são considerados normais para a espécie  
15 canina, e concentrações superiores já podem ser consideradas patogênicas, quando  
16 associadas aos demais achados clínico-patológicos (PILLAI et al., 2016; JOHNSTON  
17 et al., 2013; JOHNSTON et al., 2009).

18 O presente trabalho busca identificar acúmulos cúpricos por meio do emprego  
19 da avaliação histopatológica com associação aos escores de rodanina e análise  
20 espectrofotométrica.

21

## 22 **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

23 O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV)  
24 da Universidade Federal do paraná (UFPR), setor Palotina – Paraná, sendo aprovado  
25 pelo comit  de  tica da referida instituição sob o Protocolo no 07/2019.

26

#### 1 4.2.1 Amostragem

2 Foram utilizados fragmentos teciduais de fígado de 30 cães submetidos ao  
3 exame necroscópico de rotina. Para inclusão das amostras, preconizou-se a coleta  
4 das amostras de cadáveres frescos, para minimizar as alterações autolíticas teciduais,  
5 e animais em que o volume hepático permitiu as avaliações necessárias para análise  
6 espectrofotométrica. Dados clínicos relacionais a raça, sexo, idade, porte (peso) e  
7 causa *mortis* não foram levados em consideração. As amostras utilizadas foram  
8 coletadas em duplicata, sendo uma parte acondicionada e fixada em formaldeído 10%  
9 para análise histopatológica, e outra parte submetida a congelamento (-18°C) para  
10 quantificação de cobre tecidual por meio de Espectrofotometria de Absorção Atômica  
11 (AAS). Ainda, em relação aos casos selecionados, buscou-se a identificação dos  
12 dados nutricionais dos mesmos, por meio da análise dos prontuários.

13

#### 14 4.2.2 Avaliação histopatológica

15 As amostras fixadas em formol foram submetidas ao processamento  
16 histológico rotineiro, conforme descrito por (TOLOSA *et al.*, 2003), seguido da inclusão  
17 em parafina e posteriormente submetidas a cortes histológicos de 2,5 micras ( $\mu\text{m}$ )  
18 utilizando-se micrótomo Leica® modelo Rm2245. Foram confeccionadas lâminas  
19 histológicas em duplicadas, reservadas para a coloração rotineira de Hematoxilina-  
20 Eosina (HE) e Rodanina (TOLOSA *et al.*, 2003). Após a confecção das lâminas  
21 histológicas, as mesmas foram analisadas sob microscopia óptica, onde preconizou-  
22 se para cada tipo de coloração uma avaliação distinta.

23

#### 24 4.2.3 Hematoxilina-Eosina

25 A avaliação histológica das lâminas coradas em HE consistiu basicamente na  
26 identificação, localização e intensidade dos padrões lesionais teciduais, conforme



1 detalhados por Brown et al., 2017; Cullen & Stalker, 2016. Para determinação da  
2 intensidade das lesões utilizaram-se os termos leve (5% a 33% de acometimento),  
3 moderada (34% a 66% de acometimento) e acentuada (acima de 66% de  
4 acometimento) (SINGHI et al., 2012).

5

#### 6 4.2.4 Rodanina

7 Para esta coloração, os depósitos de cobre intracitoplasmáticos foram  
8 graduados de zero a cinco, de acordo com sua intensidade de deposição  
9 hepatocelular, onde 0 = ausência de cobre nas amostras; 1 = alguns grânulos de cobre  
10 em uma célula ocasional; 2 = grânulos em algumas células; 3 = numerosos grânulos  
11 de cobre em menos de 50% das células; 4 = numerosos grânulos de cobre entre 50%  
12 e 75% de células; e 5 = numerosos grânulos de cobre em quantidades superiores  
13 a 75% das células (CENTER et al., 2013).

14

#### 15 4.2.5 Espectrofotometria de Absorção Atômica

16 Nesta etapa as amostras mantidas sob congelamento foram submetidas a dois  
17 processos distintos, de desidratação e digestão. A primeira etapa descrita, de  
18 desidratação, foi realizada conforme descrito por Marques et al. (2011) e Tebaldi et al.  
19 (2000), onde os fragmentos hepáticos (matéria úmida) foram realocados dentro de  
20 vidros relógio e submetidos à secagem em estufa a 60° C, durante um período de 72  
21 horas, com posterior trituração e acondicionamento em frasco estéril. O material já  
22 desidratado e transformado em matéria seca foi enviado para laboratório de apoio,  
23 onde ocorreu o processo de digestão da amostra e posterior avaliação quantitativa  
24 por meio de Espectrofotometria de Absorção Atômica. Para a realização dos ensaios,  
25 que foram feitos em duplicada, utilizaram-se 25g de matéria seca. Para interpretação  
26 dos resultados, consideraram-se valores normais para a espécie quando inferiores a

1 400 µg/g, aumento leve quando o intervalo é de 401 a 1.000 µg/g, aumento moderado  
2 quando varia de 1.001 a 2.000 µg/g e aumento severo quando superior a 2.001 µg/g  
3 (PILLAI et al., 2016; JOHNSTON et al., 2013; CENTER et al., 2013; JOHNSTON et  
4 al., 2009).

5

#### 6 4.2.6 *Análise estatística*

7 Para investigar a relação entre lesões histopatológicas e escore de rodanina com  
8 os níveis cúpricos identificados pela análise espectrofométrica utilizou-se do Modelo  
9 Linear Generalizado (GLM) para avaliar como variáveis independentes a rodanina e  
10 os padrões histopatológicos. Resultados significativos foram considerados quando p  
11 < 0.001.

12

### 13 4.3 RESULTADOS

14 Dos 30 animais incluídos no estudo, observou-se que 15 cães eram machos  
15 (50%) e 15 eram fêmeas (50%). A faixa etária variou de um a 17 anos, sendo 8,43 a  
16 idade média. Em relação às raças, houve grande variedade, incluindo 16 cães sem  
17 raça definida (SRD) (53,3%), três cães da raça Pastor Alemão (10%), três Poodles  
18 (10%), um Beagle (3,3%), um Boxer (3,3%), um Chow Chow (3,3%), um Doberman  
19 Pinscher (3,3%), um Labrador Retriever (3,3%), um Lhasa Apso (3,3%), um Pastor  
20 Belga (3,3%) e um Schnauzer (3,3%).

21 Quanto a avaliação histopatológica, constatou-se quadros de acúmulos  
22 pigmentares em 29/30 (96,6%), congestão em 28/30 (93,3%), hiperplasia biliar em  
23 28/30 (93,3%), colestase em 23/30 (76,6%), fibrose periportal em 22/30 (73,3%),  
24 degeneração microvacuolar em 20/30 (66,6%), hepatite crônica em 17/30 cães  
25 (56,6%), linfangiectasia em 14/30 (46,6%), pericolangite mononuclear 8/30 (26,6%)  
26 degeneração macrovacuolar em 6/30 (20%), hemorragia em 6/30 (20%), fibrose

1 centrolobular em 4/30 (13,3%), peri-hepatite mononuclear em 4/30 (13,3%), colapso  
2 centro-lobular 2/30 (6,6%), hepatite piogranulomatosa 1/30 (3,3%), hiperplasia  
3 nodular 1/30 (3,3%) e necrose tecidual 1/30 (3,3%) (Figura 1).

4       Em relação a graduação da rodanina, 17/30 receberam a graduação 0 (56,6%),  
5 5/30 grau 1 (16,6%), 4/30 grau 2 (13,3%), 3/30 grau 3 (10%) e 1/30 grau 4 (3,3%)  
6 (Figura 2). O grau 5 não foi identificado em nenhuma amostra. A correlação dos  
7 padrões lesionais com a graduação de rodanina revelou que no grau 1 detectou-se a  
8 presença de acúmulos pigmentares e hiperplasia biliar em 5/5 (100%), hepatite  
9 crônica em 4/5 (80%), degeneração microvacuolar em 3/5 (60%), colestase e fibrose  
10 periportal em 2/5 (40%), congestão e degeneração macrovacuolar em 1/5 (20%). No  
11 grau 2 identificou-se acúmulos pigmentares, congestão, fibrose periportal e hepatite  
12 crônica em 4/4 (100%), colestase, degeneração microvacuolar, hiperplasia biliar e  
13 pericolangite em 3/4 (75%), degeneração macrovacuolar em 2/4 (50%), linfangiectasia  
14 e peri-hepatite em 1/4 (25%). No grau 3 houve acúmulos pigmentares e colestase em  
15 3/3 (100%), congestão, fibrose periportal, hepatite crônica, hiperplasia biliar e  
16 linfangiectasia em 2/3 (66,6%), degeneração microvacuolar e peri-hepatite em 1/3  
17 (33,3%). Por fim, no grau 4 constatou-se acúmulo pigmentar, colestase, congestão,  
18 fibrose periportal, hemorragia, hiperplasia biliar e peri-hepatite em 1/1 (100%).

19       Já na avaliação espectrofotométrica houve variação de 1,0 à 151,0 µg/g,  
20 portanto, todas as 30 amostras (100%) apresentaram níveis abaixo de 400 µg/g,  
21 sendo considerados normais para a espécie.

22       Os dados nutricionais obtidos por meio da análise dos prontuários dos animais,  
23 observou-se que em 16/30 não haviam informações clínicas (53,33%), 7/30 recebiam  
24 algum tipo de ração comercial (23,33%), 5/30 recebiam alimentação caseira e/ou  
25 natural associada a ração comercial (16,66%) e 2/30 recebiam somente alimentação

1 caseira e/ou natural (6,66%). Todos os dados descritos anteriormente encontram-se  
2 detalhados na Tabela 1.

3 Em relação a análise estatística obtida através da comparação das variáveis  
4 “lesões histopatológicas” e “coloração de rodanina” constatou-se que a colestase foi  
5 a única variável preditora significativa do estudo. Os resultados encontram-se  
6 detalhados na Tabela 2.

7

#### 8 **4.4 DISCUSSÃO**

9 O fígado é um órgão envolvido em diversas atividades orgânicas, que podem  
10 ser comprometidas por uma série de condições patológicas, como os distúrbios  
11 circulatórios e metabólicos, acúmulos hepáticos, doenças de depósito lisossômico,  
12 enfermidades infecciosas e inflamatórias, lesões proliferativas, hiperplásicas e  
13 tumorais (BROWN et al., 2017). Em cães, as hepatites crônicas acabam ganhando  
14 destaque, visto que são desencadeadas por inúmeras causas persistentes e  
15 contínuas, incluindo agentes infecciosos, tóxicos e quadros de retenção de alguns  
16 materiais, como o cobre. Em consequência, a identificação da causa do acúmulo  
17 cúprico é essencial para estabelecimento de medidas clínicas e/ou cirúrgicas  
18 (JOHNSTON et al., 2013).

19 Histologicamente, a detecção da hepatite crônica segue alguns padrões  
20 lesionais específicos, porém, muitas vezes não são suficientes para identificação da  
21 origem do quadro. Citam-se como importantes alterações teciduais a presença de  
22 acúmulos pigmentares no citoplasma dos hepatócitos, proliferação de ductos biliares  
23 e tecido conjuntivo, infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, plasmócitos e  
24 macrófagos, nódulos de regeneração e necrose centrolobular (BROWN et al., 2017;  
25 CULLEN & STALKER, 2016). Em quadros de hepatopatia cúprica, os achados  
26 histopatológicos são fortemente semelhantes aos descritos anteriormente, portanto, o

1 emprego de outras técnicas para complementação diagnóstica se faz necessário. A  
2 realização da coloração de rodanina, permite a evidenciação dos grânulos cúpricos,  
3 facilitando sua detecção (CENTER et al., 2013). Correlacionado os achados obtidos  
4 da coloração em Hematoxilina-Eosina e Rodanina constatou-se que das 13 amostras  
5 positivas em qualquer um dos níveis de graduação da rodanina foram identificados  
6 acúmulos pigmentares em 13/13 (100%), hiperplasia biliar em 12/13 (92,3%),  
7 colestase e hepatite crônica em 10/13 (76,9%), fibrose periportal em 9/13 (69,2%),  
8 congestão em 8/13 (61,5%), degeneração microvacuolar em 7/13 (53,8%),  
9 degeneração macrovacuolar, pericolangite, linfangiectasia e peri-hepatite em 3/13  
10 (23%) e hemorragia em 1/13 (7,6).

11       Diante destes achados, é possível estabelecer uma concordância positiva entre  
12 o padrão lesional hepático e acúmulo de cobre, indicando quadros de hepatite crônica  
13 em 76,9% dos casos, porém, não é possível confirmar que esta seja a causa. Em seu  
14 trabalho, GUPTA & AL-DISSI (2022) citam que a graduação 2 no escore de rodanina  
15 é um indicador útil no diagnóstico de hepatites crônicas, entretanto, este achado não  
16 confirma que o acúmulo cúprico seja o mecanismo responsável pelo desenvolvimento  
17 do quadro, reforçando a necessidade da investigação de fatores genéticos e  
18 nutricionais. No presente estudo, realizou-se uma tentativa de averiguação de  
19 histórico alimentar dos animais, entretanto, os resultados foram limitados, visto que  
20 não haviam informações suficientes para determinar o padrão alimentar. Alguns dos  
21 animais recebiam dietas a base de ração (muitas vezes não especificada), comida  
22 caseira e alimentação mista, bem como haviam também animais de rua, tornando  
23 essa abordagem limitada e inespecífica.

24       Embora estes achados tenham demonstrado certa limitação, é necessário  
25 enfatizar a importância da nutrição como fator predisponente ao desenvolvimento das

1 hepatopatias cúpricas. Especula-se que as concentrações de cobre em alguns  
2 alimentos comerciais para cães são maiores do que as exigências biológicas para a  
3 espécie (CENTER et al., 2021), porém, somente 23,33% dos animais do presente  
4 estudo possuíam informações sobre alimentação comercial restrita, dificultando  
5 determinar com clareza a possibilidade de haver correlação. Sabe-se que quando há  
6 consumo contínuo, crônico e restrito pode haver a extrapolação do limiar cúprico,  
7 favorecendo deposição deste microelemento no tecido hepático e desencadeando  
8 uma série de manifestações clínicas (CENTER et al., 2021).

9       Por outro lado, diversos estudos apontam que cães da raça Labrador Retriever,  
10 Doberman Pinscher e Bedlington Terriers são predispostos, visto que dados  
11 preliminares de genotipagem identificaram polimorfismos de nucleotídeos  
12 potencialmente associados às hepatopatias cúpricas (CENTER et al., 2021). Em  
13 nossa pesquisa somente 2/30 dos animais pertenciam a estas raças, sendo um  
14 Labrador Retriever e um Doberman Pinscher, e, curiosamente, este último foi o único  
15 caso em que houve identificação do escore 4 na rodanina, bem como havia colestase,  
16 fibrose periportal e ausência de indícios de hepatite crônica. Diante destes achados,  
17 a teoria especulada é de que a colestase e a fibrose sejam as causas do acúmulo  
18 cúprico intracelular pela não excreção do mineral, porém sem elevar as concentrações  
19 de cobre tecidual. Já o cão da raça Labrador Retriever apresentou grau de rodanina  
20 0 e ausência de hepatite crônica. Estatisticamente, resultados significativos foram  
21 considerados quando  $p < 0.001$ , e, dentre os padrões lesionais observados constatou-  
22 se que somente a colestase foi uma variável significativa ( $p = 0,034$ ), o que reforça a  
23 teoria de que alterações pós hepáticas tenham efeitos importantes nos acúmulos  
24 cúpricos, visto que os animais estudados não possuíam diagnóstico prévio de  
25 hepatopatias.

1        Outro ponto importante quando comparado este trabalho aos demais estudos  
2 encontrados na literatura é justamente a seleção dos pacientes. Na grande maioria  
3 das pesquisas, os autores descrevem animais de raça, especialmente os Labradores  
4 Retrievers, visto que possuem certa predisposição (JOHNSTON et al., 2013;  
5 SMEDLEY et al., 2009). Em nossa rotina, os animais sem raça definida acabam se  
6 destacando em números, correspondendo a 53,3% da casuística, o que de certa  
7 maneira dificulta compreender a possibilidade de envolvimento genético nestes  
8 quadros, bem como compromete a padronização do estudo.

9        Embora a técnica espectrofométrica preconizada neste estudo tenha fornecido  
10 resultados relevantes, sua aplicação acaba não sendo viável na rotina diagnóstica  
11 desta afecção, única e exclusivamente em virtude da quantidade de amostra  
12 requerida. Durante o processo de transformação do tecido hepático em matéria seca,  
13 há uma perda expressiva de peso, que varia de 80% à 90%, tornando o processo  
14 inviável. Diversos estudos trazem como solução a adoção de outras técnicas  
15 quantitativas semelhantes que podem ser utilizadas, por meio da coleta de material  
16 biológico por biópsia hepática, que é uma prática que proporciona resultados  
17 satisfatórios (BRASELTON et al., 1997; HOGAN et al, 1970). Sabe-se também que  
18 pode haver variação nas concentrações de cobre em diferentes áreas do tecido  
19 hepático, o que pode ser um fator limitante quando utilizadas amostras de baixa  
20 representatividade, entretanto, HOGAN et al. (1970) citam que em seu trabalho houve  
21 boa concordância entre os níveis cúpricos de amostras repetidas de porções  
22 específicas com amostras de todo o tecido.

23

#### 24 **4.5 CONCLUSÃO**

25        Por fim, é importante ressaltar que os resultados foram satisfatórios, visto que  
26 nenhum dos pacientes possuía suspeita clínica de hepatite crônica associada ao

1 cobre. A correlação entre as técnicas utilizadas foi suficiente na identificação de  
2 acúmulos cúpricos no tecido hepático, havendo alta correlação com quadros de  
3 colestase, entretanto, estes achados não foram suficientes para o desenvolvimento  
4 de um quadro de intoxicação e desenvolvimento de cirrose. É importante ressaltar que  
5 a metodologia espectrofométrica utilizado neste estudo obteve bons resultados,  
6 entretanto, devido ao protocolo para obtenção das amostras não é uma técnica  
7 adequada para diagnóstico em vida. Enfatiza-se também a necessidade deste  
8 trabalho para melhor compreensão desta condição, visto que os dados de literatura  
9 são poucos e frequentemente realizados com animais de raças específicas, sem levar  
10 em conta que em nossa realidade brasileira a grande maioria dos animais não  
11 possuíam raça definida.

12

## 13 **ACKNOWLEDGEMENTS**

14 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES).

15

## 16 **DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST**

17 The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role  
18 in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the  
19 writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

20

## 21 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

22 All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All  
23 authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

24



## 1 4.6 REFERÊNCIAS

2 BRASELTON, WE et al. Bipsy mineral analysis by inductively coupled plasma-  
3 atomic emission spectroscopy with ultrasonic nebulization. **Journal of Veterinary**  
4 **Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 395-400, 1997. Available from: <  
5 <https://doi.org/10.1177/104063879700900409>>. Accessed: nov 12, 2024. doi:  
6 10.1177/104063879700900409.

7 BROWN, DL et al. **Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas**. In:  
8 ZACHARY JF. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6th ed. Saint Louis, Missouri:  
9 Elsevier, 2017. Ch.8, p. 412-433.

10 CENTER, SA et al. Is it time to reconsider current guidelines for Copper  
11 content in comercial dog foods? **Journal of the American Veterinary Medical**  
12 **Association**, v. 288, n. 4, p. 357-364, 2021. Available from:  
13 <<https://doi.org/10.2460/javma.258.4.357>>. Accessed: nov 12, 2024. doi:  
14 [10.2460/javma.258.4.357](https://doi.org/10.2460/javma.258.4.357).

15 CENTER, SA et al. Digital image analysis of rhodanine-stained liver biopsy  
16 specimens for calculation of hepatic Copper concentrations in dogs. **American**  
17 **Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 4, p. 1474-1480, 2013. Available from: <  
18 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24274883/>>. Accessed: nov 12, 2024. doi:  
19 [10.2460/ajvr.74.12.1474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24274883/)

20 CULLEN, JM.; STALKER, MJ. Liver and billiary sistem. In: JUBB, KVF et al.  
21 **Pathology of Domestic Animals**. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016. Ch.8, p.  
22 258-278.

23 HARRIS, ED. Cellular copper transport and metabolism. **Annual Review of**  
24 **Nutrition**, n. 20, p. 291–310, 2000. Available from: <[10.1146/annurev.nutr.20.1.291](https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.291)>.  
25 Accessed: nov 12, 2024. doi: [10.1146/annurev.nutr.20.1.291](https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.291).

1           GUPTA, A; AL-DISSI, A. Correlation of hepatic Copper levels, rhodanine scores  
2 and histological diagnosis in archiver canine liver samples. **Canadian Journal of**  
3 **Veterinary Research**, n. 86, v. 4, p. 300-305, 2022. Available from: <  
4 [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9552569/#b11-cjvr\\_04\\_300](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9552569/#b11-cjvr_04_300)>. Accessed:  
5 nov 12, 2024.

6           HOFFMANN, G. Copper-Associated Liver Diseases. **Veterinary Clinics: Small**  
7 **Animal**, n. 39, p. 489–511, 2009. Available from:  
8 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.02.001>. Accessed: nov 13, 2024. doi:  
9 [10.1016/j.cvsm.2009.02.001](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.02.001).

10          HOGAN, KG et al. The distribution of Copper in the liver of pigs and sheep and  
11 its affect on the value of Chemical analyses made on biopsy samples. **New Zealand**  
12 **Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 132-141, 1970. Available from:  
13 <<https://doi.org/10.1080/00288233.1971.10421309>>. Ac cessed: nov 13, 2024. doi:  
14 [10.1080/00288233.1971.10421309](https://doi.org/10.1080/00288233.1971.10421309).

15          JOHNSTON, A et al. Hepatic copper concentrations in Labrador Retrievers with  
16 and without chronic hepatitis: 72 cases (1980–2010). **Journal of the American**  
17 **Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 3, p. 372-380, 2013. Available from: <  
18 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23327181/>>. Accessed: nov 13, 2024. doi:  
19 [10.2460/javma.242.3.372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23327181/).

20          JOHNSTON, A et al. Influence of biopsy specimen size, tissue fixation, and  
21 assay variation on copper, iron, and zinc concentrations in canine livers. **American**  
22 **Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 12, p. 1502-1511, 2009. Available from: <  
23 <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/70/12/ajvr.70.12.1502.xml>>.  
24 Accessed: nov 13, 2024. doi: [10.2460/ajvr.70.12.1502](https://doi.org/10.2460/ajvr.70.12.1502).

1 MARQUES, AV et al. Teores séricos e hepáticos de cobre, ferro, molibdênio e  
2 zinco em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária**  
3 **Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 398-406, 2011. Available from: <  
4 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000500006>>. Accessed: nov 13, 2024. doi:  
5 [10.1590/S0100-736X2011000500006](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000500006) .

6 MOTTIN, TS et al. Hepatopatia crônica associada ao acúmulo de cobre em um  
7 cão da raça American Pitbull Terrier. **Acta Scientiae Veterinariae**, n 41, 2013.  
8 Available from: [https://www.ufrgs.br/actavet/41-suple-1/CR\\_30.pdf](https://www.ufrgs.br/actavet/41-suple-1/CR_30.pdf). Accessed: nov 13,  
9 2024.

10 PILLAI, S. et al. Ductal plate malformation in the liver of boxers dogs: clinical  
11 and histological features. **Veterinary Pathology**, v. 53 n. 3 p. 602-613, 2016. Available  
12 from: < <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985815610567>>.  
13 Accessed: nov 13, 2024. doi: [10.1177/0300985815610567](https://doi.org/10.1177/0300985815610567).

14 SINGHI, AD et al. Reticulin loss in benign fatty liver: an important diagnostic  
15 pitfall When considering a diagnosis of hepatocellular carcinoma. **American Journal**  
16 **of Surgical Pathology**, v. 36, n. 5, p. 710-715, 2012. Available from: <  
17 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22498821/>>. Accessed: nov 13, 2024. doi:  
18 [10.1097/PAS.0b013e3182495c73](https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182495c73).

19 SMEDLEY, R et al. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers.  
20 **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 3, p. 484-490, 2009. Available from: <  
21 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19176511/>>. Accessed: nov 13, 2024. doi:  
22 [10.1354/vp.08-VP-0197-S-FL](https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0197-S-FL).

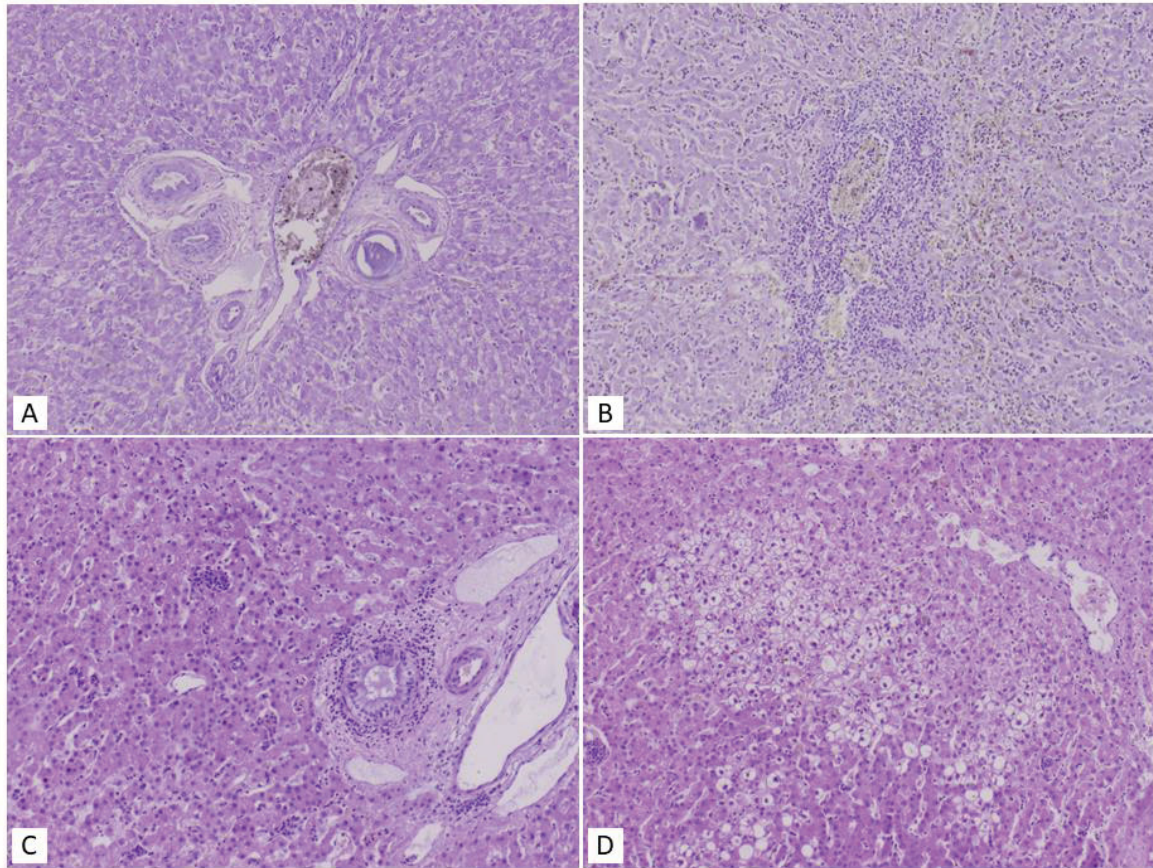
23 TEBALDI, FLH et al. Composição mineral das pastagens das regiões norte e  
24 noroeste do Estado do Rio de Janeiro: 1. Cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio e  
25 enxofre. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 603-615, 2000. Available

1 from: < <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000200038> >. Accessed: nov 13,  
2 2024. doi: [10.1590/S1516-35982000000200038](https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000200038).

3 THORNBURG, LP. A perspective on copper and liver disease in the dog.  
4 **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 101–110, 2000. Available  
5 from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10730937/>. Accessed: nov 13, 2024. doi:  
6 [10.1177/104063870001200201](https://doi.org/10.1177/104063870001200201).

7 THRALL, MA. Doenças linfoproliferativas e neoplasias mielóides. In: THRALL,  
8 MA et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2nd ed, Rio de Janeiro:  
9 Editora ROCA LTDA, 2015. Ch.5, p.52–57.

10 TOLOSA, EMC et al. **Manual de técnicas para histologia: normal e**  
11 **patológica**. 2nd ed. São Paulo: Manole LTDA, 2013. p.19-132.



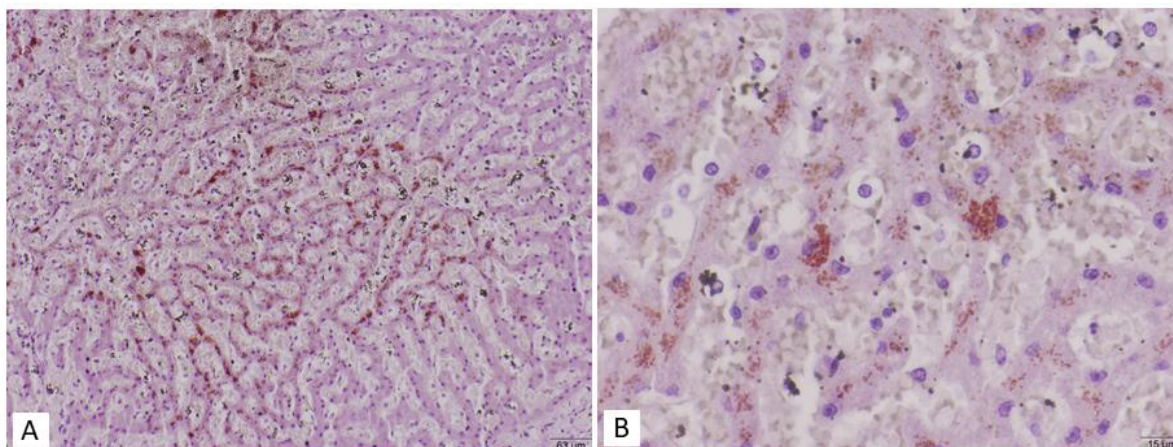
1

2 **Figura 1** – Cortes histológicos de fígado evidenciando fibrose periportal leve com  
 3 hiperplasia biliar, colestase e congestão, 8x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(A)**; hepatite  
 4 mononuclear, 6x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(B)**; pericolangite mononuclear, colestase  
 5 e linfangiectasia 11x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(C)** e degeneração microvacuolar,  
 6 10x, Hematoxilina-Eosina (HE) **(D)**.



1

2



3 **Figura 2** – Cortes histológicos de fígado evidenciando marcação positiva para cobre,  
4 caracterizado por grânulos vermelhos intracitoplasmáticos, com concentração  
5 variando de 50% a 75% (grau 4), 10x, Rodanina **(A)**; 40x, Rodanina **(B)**.

Raça	Idade	Sexo	Hepatite crônica	Escore rodanina	Espectrofotometria	Dados nutricionais
SRD	4 anos	M	Ausente	0	128,0 ug/g	Ração comercial
SRD	7 anos	M	Presente	2	72,0 ug/g	Ração comercial
SRD	1 ano	M	Presente	3	151,0 ug/g	Não informada
SRD	16 anos	F	Presente	0	10,0 ug/g	Não informada
Beagle	6 anos	M	Presente	2	30,0 ug/g	Alimentação caseira
Lhasa Apso	7 anos	M	Ausente	0	30,0 ug/g	Não informada
SRD	2 anos	M	Ausente	1	51,0 ug/g	Ração comercial
SRD	2 anos	F	Presente	1	2,0 ug/g	Ração comercial
SRD	3 anos	M	Presente	2	75,0 ug/g	Ração comercial/caseira
Poodle	10 anos	F	Presente	0	1,0 ug/g	Não informada
Pastor Alemão	2 anos	F	Ausente	0	2,0 ug/g	Não informada
Poodle	12 anos	F	Ausente	0	9,0 ug/g	Ração comercial/caseira
SRD	9 anos	F	Presente	0	8,0 ug/g	Não informada
Schnauzer	9 anos	F	Ausente	0	18,0 ug/g	Ração comercial/caseira
SRD	6 anos	F	Ausente	0	2,0 ug/g	Alimentação caseira
Pastor Alemão	12 anos	F	Ausente	0	4,0 ug/g	Ração comercial
SRD	12 anos	M	Ausente	3	1,0 ug/g	Ração comercial
Chow Chow	15 anos	M	Presente	0	23,0 ug/g	Não informada
SRD	10 anos	F	Presente	0	6,0 ug/g	Ração comercial
SRD	8 anos	F	Presente	0	2,0 ug/g	Não informada
Pastor Alemão	5 anos	F	Presente	1	7,0 ug/g	Ração comercial/caseira
Poodle	14 anos	M	Presente	1	5,0 ug/g	Não informada
SRD	3 anos	M	Ausente	0	3,0 ug/g	Não informada
Doberman	12 anos	M	Ausente	4	4,0 ug/g	Ração comercial/caseira
Boxer	11 anos	F	Presente	3	6,0 ug/g	Não informada
Pastor Belga	9 anos	M	Presente	2	10,0 ug/g	Não informada
SRD	17 anos	M	Presente	0	23,0 ug/g	Não informada
SRD	6 anos	M	Presente	1	110,0 ug/g	Não informada

Labrador	13 anos	M	Ausente	0	98,0 ug/g	Não informada
SRD	12 anos	F	Ausente	0	7,0 ug/g	Não informada

- 1 **Tabela 1** – Detalhamento racial, etário e sexual com classificação histológica
- 2 relacionada a hepatite crônica, graduação de rodanina, quantificação cúprica por meio
- 3 da análise espectrofométrica e dados nutricionais.



<b>Variável</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Estatística t</b>	<b>Valor de p</b>
Intercepto	2,685	0,617	4,353	0,000
Colestase	1,276	0,564	2,261	0,034
Fibrose centrolobular	-0,759	0,801	-0,948	0,353
Fibrose periportal	-0,909	0,554	-1,640	0,115
Hepatite crônica	0,043	0,502	0,086	0,932
Hepatite piogranulomatosa	1,109	1,520	0,729	0,473
Rodanina	0,263	0,210	1,250	0,224

- 1 **Tabela 2** – Detalhamento dos resultados do modelo linear (GLM) realizado para as
- 2 variáveis “rodanina” e “padrões lesionais histopatológicos”.

1 ORCID

- 2 Crisan Smaniotto - (<https://orcid.org/0000-0002-5842-9008>)
- 3 Andressa Caroline dos Anjos Leite - (<https://orcid.org/0009-0004-4008-4242>)
- 4 Vivian Terumi Sawada - (<https://orcid.org/0009-0006-4591-0085>)
- 5 Adrieny Lenartovicz – (<https://orcid.org/0009-0006-8974-6619>)
- 6 Vinicius Dahm - (<https://orcid.org/0000-0003-2873-1086>)
- 7 Amália Ferronato – (<https://orcid.org/0000-0003-1406-3734>)
- 8 Aline de Marco Viott – (<https://orcid.org/0000-0003-1097-2359>)