



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Estudo comparativo de métodos para o diagnóstico precoce
do Adenocarcinoma Nasal Enzoótico em cabras**

Ana Isabel de Oliveira Neves

Orientador(es) | Helder Cortes
Pedro Caetano
Delia Lacasta

Évora 2024



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Estudo comparativo de métodos para o diagnóstico precoce
do Adenocarcinoma Nasal Enzoótico em cabras**

Ana Isabel de Oliveira Neves

Orientador(es) | Helder Cortes
Pedro Caetano
Delia Lacasta

Évora 2024



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ricardo Jorge Romão (Universidade de Évora)

Vogais | Helder Cortes (Universidade de Évora) (Orientador)
Hélder Miranda Pires Quintas (Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária de Bragança) (Arguente)

Agradecimentos

Ao professor doutor Helder Cortes por ter aceite a orientação desta dissertação e toda a ajuda prestada;

Ao professor doutor Pedro Caetano, que aceitou orientar-me e foi incansável no apoio e incentivo para a conclusão do curso, bem como a oportunidade que tive de aprender com ele tanto nas aulas como em práticas externas;

Ao professor doutor Fernando Capela e Silva pela simpatia, pela disponibilidade e ajuda na redação da presente dissertação;

Aos professores com os quais tive oportunidade de aprender ao longo destes anos e a compreensão que sempre tiveram comigo por ser trabalhadora-estudante;

A todos os professores do SCRUM, nomeadamente a professora doutora Delia Lacasta, professor doutor Marcelo de Las Heras e professora Aurora Ortín pela ajuda na recolha dos dados para o presente estudo, ensinamentos e oportunidades que me foram concedidas nos quatro meses em que estive em Zaragoza, são sem dúvida a melhor equipa de docentes que alguma vez conheci;

A todos os médicos veterinários com quem tive oportunidade de realizar estágio que me incentivaram e ajudaram neste percurso com passagem de conhecimento;

Ao meus “cool kids” por terem tornado esta etapa cheia de momentos bons, e histórias para contar, muitas festas e aventuras que jamais vou esquecer;

Em especial à Margarida, carinhosamente chamada de enfisema pulmonar, que para além de ser como uma irmã mais nova foi o apoio de todas as horas e todos os momentos desde o primeiro dia, muitos dias de estudo se devem a ela;

Aos meus amigos que muito apoio me deram e pelas conversas de incentivo que me deram muita força para realizar este sonho;

Aos meus pais, pelo amor incondicional, que são e sempre serão os meus pilares, por aceitarem e ainda incentivam todas as minhas aventuras, e que apenas com o seu apoio foi possível acrescentar mais um curso à minha formação;

Às minhas estrelinhas do céu a quem dedico esta dissertação e a quem tanto rezei e pedi ajuda para concluir este curso que agora sim, já podem dizer desde o céu: “A minha neta é médica dos animais”.

Querida avó, este trabalho é por ti!

Resumo

Na medicina veterinária, os métodos de diagnóstico têm apresentado avanços substanciais, utilizando técnicas cada vez mais elaboradas e seguras que permitem uma abordagem mais completa e eficiente. Entre os métodos mais inovadores, inclui-se a termografia, que permite a mensuração da temperatura superfície de um corpo.

Este estudo apresentou como objetivo, avaliar a eficácia da utilização deste método para o diagnóstico precoce de ANE, uma neoplasia altamente contagiosa com um β -retrovírus denominado "*Enzootic nasal tumor vírus*", associado à sua etiologia e que, devido a morbidade e mortalidade que causa nos efetivos, gera elevados prejuízos económicos aos produtores.

Através das análises estatísticas, concluiu-se que este método, económico, fácil de aplicar e sem muita logística associada, apresenta, uma boa sensibilidade e especificidade, porém são necessários mais estudos para padronizar a sua interpretação. Por este motivo, atualmente, aconselha-se a utilização combinada de métodos para o diagnóstico precoce desta neoplasia.

Palavras-chave: Adenocarcinoma nasal enzoótico, pequenos ruminantes, retrovírus, métodos de diagnóstico, afeções respiratórias.

Abstract

Comparative study of methods for early diagnosis of Enzootic Nasal Adenocarcinoma in goats

In veterinary medicine, diagnostic methods have shown substantial advances, using increasingly more elaborate and safer techniques that allow for a more complete and efficient diagnostic. Among the most innovative methods is thermography, which allows the measurement of the temperature surface of a body.

The present study aimed to evaluate the effectiveness of using this method for the early diagnosis of ANE, a highly contagious neoplasm with a β -retrovirus called Enzootic nasal tumor virus, associated with its etiology and which, due to the morbidity and mortality that cause on livestock, generates high economic losses for producers.

Through statistical analyses, it is concluded that this method, which is economical, easy to apply and without much associated logistics, has good sensitivity and specificity, but further studies are needed to standardize its interpretation. For this reason, the combined use of methods for the early diagnosis of this neoplasm is currently recommended.

Keywords: Enzootic nasal adenocarcinoma, small ruminants, retrovirus, diagnostic methods, respiratory diseases.

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Índice de figuras.....	VI
Índice de tabelas e gráficos.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Preâmbulo.....	X

I.Revisão bibliográfica

1. Anatomia da cavidade nasal.....	1
1.1 Anatomia macroscópica.....	1
1.2 Anatomia microscópica.....	3
2. Retrovírus.....	6
2.1 Replicação viral.....	8
3. Adenocarcinoma nasal enzoótico.....	9
3.1 Etiologia.....	10
3.2 Epidemiologia.....	12
3.3 Sinais clínicos.....	13
3.4 Lesões.....	15
3.4.1 Lesões macroscópicas.....	15
3.4.2 Lesões microscópicas.....	18
3.5 Resposta imunológica ao vírus.....	20
3.6 Diagnóstico.....	21
3.6.1 Diagnóstico clínico.....	22
3.6.2 Diagnóstico por imagem.....	23
3.6.2.1 Ecografia.....	23
3.6.2.2 Radiografia.....	24
3.6.2.3 Tomografia computadorizada.....	24
3.6.2.4 Endoscopia.....	26
3.6.2.5 Termografia.....	26
3.6.3 Diagnóstico etiológico.....	28
3.6.4 Diagnóstico anatomopatológico- Histopatologia e Imunohistoquímica.....	29

3.6.5 Diagnósticos diferenciais.....	29
3.6.5.1 Oestrose.....	30
3.6.5.2 Rinite crónica proliferativa.....	32
3.6.5.3 Rinite obstrutiva.....	34
3.6.5.4 Adenocarcinoma pulmonar ovino.....	35
3.6.5.5 Conidiobolomicose.....	36
3.6.5.6 Pitiose.....	37
3.7 Tratamento e prevenção.....	40
II Estudo experimental	
1. Introdução.....	41
2. Objetivos.....	42
3. Material e métodos.....	42
3.1 Descrição do caso clínico.....	42
3.2 Contexto e caracterização da exploração.....	43
3.3 Amostra e obtenção de dados- Parte I.....	43
3.3.1 Sinais clínicos.....	44
3.3.2 Imagens termográficas.....	44
3.3.3 Recolha de amostra de corrimento nasal.....	45
3.3.4 Recolha de amostra de tecido nasal.....	45
3.3.5 Preparação das lâminas para estudo histopatológico.....	46
3.4 Amostra e obtenção de dados- Parte II.....	46
4. Análise estatística e descritiva.....	46
5. Resultados.....	47
6. Discussão.....	58
7. Conclusão.....	61
Bibliografia.....	63
Anexos.....	68

Índice de figuras

Figura 1- Anatomia da cavidade nasal-Secção sagital de cabeça de cabra (Fotografia original).	2
Figura 2- Anatomia da cavidade nasal- Secção transversal de cabeça de ovelha a nível dos últimos pré-molares (Fotografia original).	2
Figura 3- Epitélio respiratório-Hematoxilina e eosina (H&E, x120) (Liebich, 2019).....	4
Figura 4- Representação dos diferentes tipos celulares que constituem o epitélio respiratório (Pérez et al.,2004).	4
Figura 5- Epitélio respiratório- tecido subepitelial – (H&E, x120) (adaptado de Liebich, 2019). .	5
Figura 6- Epitélio olfativo – (H&E, x120) (Liebich, 2019).....	6
Figura 7- Genoma geral de um retrovírus contendo os quatro genes (gag, pro, pol, env) e as regiões R, U3, U5 (Zúñiga, 2010).	7
Figura 8- Ciclo de replicação de um retrovírus (Smith, 2024).....	9
Figura 9- Western-blot relacionando ANE a outros retrovírus apresentando 25.000Mr proteína (De las Heras et al., 1995).	11
Figura 10- Secreção nasal serosa. A- Secreção nasal serosa em fase inicial. B-Secreção nasal sero-mucosa em estados avançados da doença (Fotografia original).	14
Figura 11 - Alopecia em redor das narinas e lábio superior, devido à intensa e contínua secreção nasal (Fotografia original).	14
Figura 12- Exoftalmia e secreção nasal hemorrágica em estado muito avançado de doença (Fotografia original).	15
Figura 13- Presença de tumor ocluindo de forma total a cavidade nasal esquerda de caprino de 4 anos de idade (Fotografia original).	16
Figura 14- Massa tumoral com alteração de coloração devido à necrose de tecidos- cavidade nasal de cabra (Fotografia original).	16
Figura 15- Deformação óssea em crânio de cabra devido ao crescimento da massa tumoral (Fotografia original).	17
Figura 16- Células cuboides em tecido tumoral de infeção natural em cabra (H&E, 250x) (Fotografia gentilmente cedida pelo Professor Doutor Marcelo De las Heras, Universidade de Zaragoza).	18
Figura 17- Secção histológica de tecido tumoral de infeção natural em cabra- padrão papilar (H&E, 250x) (Fotografia gentilmente cedida pelo Professor Doutor Marcelo De las Heras, Universidade de Zaragoza).	18
Figura 18- Partículas virais (setas) e grânulos secretores no citoplasma de células tumorais (Özmen et al., 2010).....	19
Figura 19- Radiografia de cabeça de cabra. A- Projecção dorso-ventral B- Projecção lateral onde é difícil observar a massa de tecido mole na cavidade nasal direita (Imagem gentilmente cedida pelo SCRUM).	24

Figura 20- A-TC (corte sagital) onde visualizamos uma massa na região etmoidal da cavidade nasal compatível com ANE. B- TC onde se visualiza a destruição do osso nasal e deformação facial em ovino com ANE (Fotografia gentilmente cedida pelo SCRUM).	25
Figura 21- A- Imagem termográfica de animal saudável. B-Imagem termográfica de animal com ANE (Fotografia original).	27
Figura 22- Ovino com Oestrose apresentando corrimento nasal seroso sanguinolento (Fotografia original).	30
Figura 23- Presença de larvas de <i>Oestrus ovis</i> em corte sagital de cabeça de ovino (Fotografia original).	31
Figura 24- Proliferação de tecido inflamatório em narina de ovino (Fotografia original).	32
Figura 25- Narinas edemaciadas e corneto ventral observados em corte sagital de cabeça de ovino (Fotografia original).	33
Figura 26- A- Espessamento da prega alar do segmento rostral da narina. B- Edemaciação do corneto nasal dorsal e da prega alar (Fotografia gentilmente cedida pelo SCRUM).	34
Figura 27- Lesões características de APO. A-Pulmão de ovino com aumento de tamanho, coloração alterada e presença de espuma na traqueia. B- Presença de espuma em pulmão de ovino (Fotografia original).	36
Figura 28- Ovelha com conidiobolomicose. A- Secreção nasal e exoftalmia unilateral. B- Exoftalmia unilateral com conjuntivite severa e ulceração. C/D- Corte sagital de cabeça com massa granulomatosa, amarelada, e firme na região nasal (C) e faríngea (D) (Adaptado de Carmo et al.,2021).	37
Figura 29- Lesões de Pitiose em ovelha. A- Úlcera extensa no palato. B-Deformação facial em ovino com Pitiose. C- Rinite necrótica (Adaptado de Carmo et al., 2021).	38
Figura 30- Posicionamento do operador perante o animal para realização de termografia (Fotografia original).	44
Figura 31- Recolha de amostra de secreção nasal para pesquisa viral (Fotografia original).	45
Figura 32- Valores de concordância - Índice Kappa (MMcHugh, 2012).	47
Figura 33- Termografia da cabra 5152 realizada no dia 10-01-2024 (Fotografia original).	54
Figura 34- Termografia da cabra 5152 realizada no dia 21-02-2024 (Fotografia original).	54
Figura 35- Lesão observada em necropsia compatível com ANE na cabra 5152 (SCRUM).	55
Figura 36- Observação histopatológica de ANE na cabra 5152 onde são observadas células formando acinos característicos desta neoplasia (SCRUM).	55
Figura 37- Termografia da cabra 5153 realizada no dia 10-01-2024 compatível com um animal saudável (Fotografia original).	55
Figura 38- Termografia da cabra 5153 realizada no dia 07-02-2024 (Fotografia original).	57
Figura 39- TC realizada à cabra 5153 para pesquisa de lesões de ANE (Fotografia original)...	57
Figura 40- Ausência de lesões macroscópicas compatíveis com ANE na cavidade nasal da cabra 5153 (SCRUM).	58

Índice de Tabelas e Gráficos

Tabela 1 -Etiologia, localização da lesão e sinais clínicos característicos dos diagnósticos diferenciais de ANE.....	39
Tabela 2 -Técnicas de diagnóstico a aplicar nos diagnósticos diferenciais de ANE(Adaptada de Quintas et al.,2012).....	39
Tabela 3 - Frequência das variáveis em estudo.....	48
Tabela 4 - Cruzamento do método A com o método C.....	49
Tabela 5 - Medida de concordância entre o método A e o método C.....	50
Tabela 6 - Cruzamento do método B e do método C	50
Tabela 7 - Medida de concordância entre o método B e o método C.....	51
Tabela 8 - Quadro resumo dos exames físicos com foco no trato respiratório do animal 5152.....	53
Tabela 9 - Quadro resumo dos exames físicos com foco no trato respiratório do animal 5153.....	56
Gráfico 1 - Distribuição normal da idade dos animais em estudo.....	48

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ANE	Adenocarcinoma nasal enzoótico
AKT	Proteína quinase B
APO	Adenocarcinoma pulmonar ovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENTV	<i>Enzootic nasal tumor virus</i>
H&E	Hematoxilina & Eosina
HYAL	Hialuronglucasaminase 2
JSRV	Vírus Jaagsiekte
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MAPK	Mitogene ativado quinase
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação da cadeia da polimerase
RCP	Rinite crónica proliferativa
RT-PCR	Reação de cadeia da polimerase reversa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
SED	Salmonella enterica subspécie <i>diarizonae</i> serovar 61:(k): 1, 5, (7)
TC	Tomografia computadorizada
TM	Região transmembranar

Preâmbulo

A presente dissertação foi redigida com base nos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante o estágio curricular, no Serviço Clínico de Ruminantes (SCRUM) da Faculdade de Veterinária da Universidade de Zaragoza, Espanha, com a duração total de quatro meses iniciando-se a 4 de dezembro de 2023 e com término a 29 de março de 2024.

A orientação esteve a cargo da Professora Doutora Delia Lacasta e realizou-se em regime hospitalar de ruminantes, com foco nos pequenos ruminantes. No decurso do estágio foram abordadas as principais áreas da clínica médica de espécies pecuárias, nomeadamente medicina interna dos sistemas respiratório, digestivo, cardiovascular, músculo-esquelético, reprodutor e tegumentar, bem como identificação animal e profilaxia vacinal e antiparasitária. A maioria dos casos acompanhados culminavam no sacrifício do animal para realização de necropsia tendo a oportunidade de realizar este procedimento diversas vezes, bem como a identificação e avaliação de lesões anatomopatológicas que os animais apresentavam.

Foi ainda possível, realizar o acompanhamento de consultas e ações de profilaxia em regime ambulatorio em explorações de ovinos e caprinos na região de Aragón.

Com o decorrer do estágio, contactei com um caso clínico de suspeita de Adenocarcinoma Nasal Enzoótico em cabras o qual, suscitou interesse em aprofundar o tema, e que deu origem a esta dissertação, realizando um estudo com o objetivo de encontrar um método que possa auxiliar no diagnóstico precoce desta doença e analisar os dados recolhidos ao longo dos quatro meses do estágio.

Para o efeito, o presente trabalho foi organizado da seguinte forma: Parte I- conta com uma revisão bibliográfica sobre o tema “Adenocarcinoma Nasal Enzoótico em pequenos ruminantes” bem como alguns dos seus diagnósticos diferenciais; Parte II- estudo comparativo de dois métodos para o diagnóstico precoce desta neoplasia.

I. Revisão bibliográfica

1. Anatomia da cavidade nasal

A cavidade nasal é uma estrutura complexa que desempenha um papel crucial nos sistemas respiratório, olfativo e termorregulador de muitos animais (Xi et al., 2023). Compreender a sua anatomofisiologia é necessário pois permite, muitas vezes, avaliar o estado de saúde geral e bem-estar do animal.

Várias técnicas têm sido utilizadas para investigar e estudar a estrutura nasal de diversas espécies, incluindo dissecções fixas de tecidos, moldagem de vias aéreas, bem como a realização de imagens médicas, como a ressonância magnética ou tomografia computadorizada (TC) (Xi et al., 2023).

1.1 Anatomia macroscópica

A forma e aspeto da cabeça apresentam muitas diferenças entre espécies, sexo, raça e até mesmo idade, refletindo adaptações a diferentes ambientes e estilos de vida, porém esta diferença morfológica, que apesar de determinar caracteres morfológicos diferenciadores fundamentais, não é significativa a nível de estruturas internas e por esse motivo sem grande interesse clínico (Xi et al., 2023).

O plano nasal dos pequenos ruminantes assemelha-se ao do cão, embora com uma extensão mais limitada do que poderia supor-se por observação exterior, especialmente na cabra (Quinteiro, 2022) uma vez que parte desta área é ocupada por cornetos e seios nasais (Dyce et al., 2002).

A cavidade nasal constitui o primeiro segmento do trato respiratório sendo responsável pela adequada passagem do ar para o sistema respiratório e é sustentada pelo osso nasal e cartilagens nasais dorsal, ventral e acessória (Ganganai et al., 2004).

Esta cavidade subdivide-se em duas, por um septo nasal, delimitado ventralmente pelo palato duro e dorsalmente pelo osso nasal, e que não entra em contacto, caudalmente, com o solo da cavidade de tal forma que existe um canal médio único nasal em direção à nasofaringe (Quinteiro, 2022). É constituído por uma parte óssea, com o osso etmoide e vómer na região caudal e ventral respetivamente e a restante área, cartilaginosa (El Sissi et al., 2017). Cada uma das divisões delimitadas pelo septo nasal, possui três cornetos, dorsal, médio e ventral (Figura 1). Por sua vez, este último é subdividido em dorsal e ventral, de modo a aumentar a superfície da área respiratória, criando turbulência à passagem do ar para filtrar e, aquecer ou arrefecer o ar (Dyce et al., 2002).

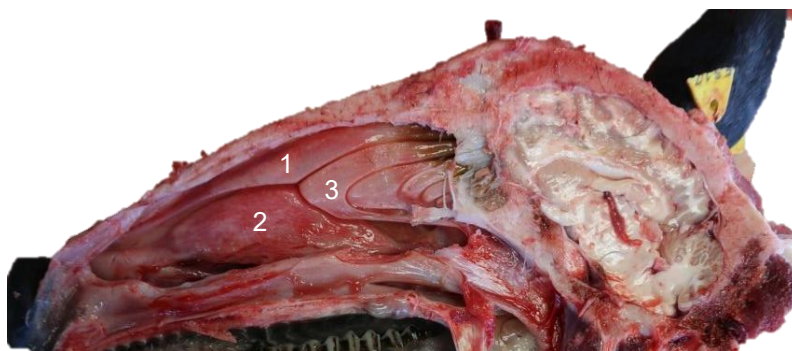


Figura 1- Anatomia da cavidade nasal-Secção sagital de cabeça de cabra (Fotografia original).

1- Corneto nasal dorsal; 2-Corneto nasal ventral; 3- Corneto nasal médio

Entre os cornetos localizam-se os meatos nasais dorsal, médio e ventral (Figura 2), que confluem para constituir um meato nasal comum localizado entre os cornetos e o septo nasal (Ganganaik et al., 2004).

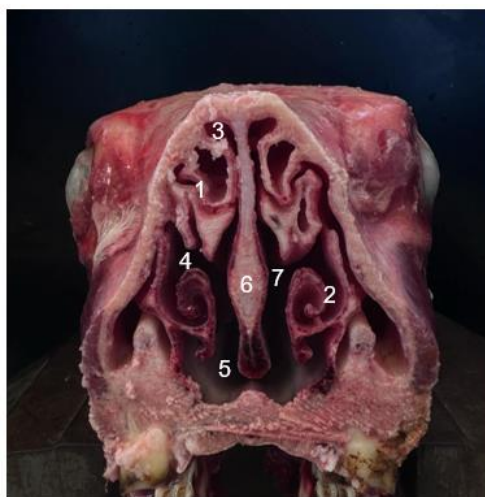


Figura 2-Anatomia da cavidade nasal- Secção transversal de cabeça de ovelha a nível dos últimos pré-molares (Fotografia original).

1-Corneto nasal dorsal; 2-Corneto nasal ventral; 3-Meato nasal dorsal; 4-Meato nasal médio; 5- Meato nasal ventral; 6-Septo nasal; 7- Meato nasal comum

O meato nasal dorsal, o mais extenso, caracteriza-se por uma estreita passagem entre o teto da cavidade nasal e o corneto nasal dorsal, estendendo-se até à crista etmoidal, e a sua principal função relaciona-se com o olfato devido à mucosa olfativa que o reveste (Dyce et al., 2002). O meato médio é a passagem entre o corneto dorsal e ventral apresentando comunicação com alguns seios. Já o meato nasal ventral, o mais amplo, estende-se rostralmente e é a principal via respiratória (Dyce et al., 2002). É esta a via de eleição em caso de entubação nasoesofágica

devendo sempre o tubo passar pelo espaço nasal mais amplo que corresponde ao espaço entre o meato nasal ventral e comum (Quinteiro, 2022).

A região mais profunda da cavidade é subdividida, por sua vez, por numerosos cornetos etmoidais, sendo o maior deles projetado rostralmente e formando o corneto nasal médio (Quinteiro, 2022). As paredes interiores da cavidade nasal estão revestidas por uma membrana mucosa de espessura considerável e abundantemente vascularizada que cobre o órgão vomeronasal, órgão olfativo acessório. Este situa-se no solo da cavidade nasal, que comunica com o meato ventral e com a cavidade oral através do ducto incisivo, com um importante papel na percepção de feromonas (Francia et al., 2014). Esta mucosa apresenta várias funções de proteção como humedecimento, aquecimento e filtragem de impurezas provenientes do ar inspirado (Dyce et al., 2002).

Os seios paranasais constituem os compartimentos frontais e laterais pares da cavidade craniana, que se desenvolvem por evaginação no osso esponjoso entre as placas externas e internas dos ossos cranianos e faciais (Alsafy et al., 2022).

Os pequenos ruminantes possuem quatro seios: maxilar, frontal, lacrimal e palatino. O seio maxilar encontra-se lateralmente à cavidade nasal penetrando a maxila, tornando-se menor de rostral para caudal, e a sua abertura é parcialmente coberta pelo processo uncinado em forma de gancho. Comunica com o seio palatino que se encontra ligeiramente anterior ao seio maxilar ao nível do terceiro pré-molar. O seio frontal encontra-se ao nível da órbita e divide-se em compartimento lateral e medial (El Sissi et al., 2017). Por último, o seio lacrimal ocupa uma pequena cavidade no osso lacrimal rostromedial à órbita. É separado rostralmente do seio maxilar pelo canal nasolacrimal e comunica com o seio maxilar através da abertura maxilolacrimal logo anterior à cavidade orbital ao nível do terceiro pré-molar (Alsafy et al., 2022).

Em qualquer um deles pode ocorrer o desenvolvimento de infeções daí o seu interesse clínico (Dyce et al., 2002). A afeção mais frequente nesta região ocorre por invasão, no seio frontal, de larvas de mosca do género *Oestrus* (Dyce et al., 2002).

1.2 Anatomia microscópica

A cavidade nasal comunica a região nasofaríngea com o exterior e está dividida, tanto pela sua estrutura como pela sua função, em três zonas: vestíbulo nasal, região respiratória e região olfatória. Apesar da sua estrutura histológica semelhante, é a mucosa que cobre cada região que determina as diferenças entre elas (Pérez et al., 2004).

A porção rostral da cavidade nasal, vestíbulo nasal, é revestida por um epitélio escamoso estratificado pigmentado. Inicialmente queratinizado, na zona cutânea, tornando-se não

queratinizado em profundidade no vestibulo e na sua região mais caudal, altera-se para epitélio pseudo-estratificado cilíndrico não ciliado (Kahwa & Purton, 1995).

Caudalmente, o epitélio vestibular diminui de forma gradual a sua altura e transita para a região respiratória, que ocupa a maior área da cavidade nasal, revestindo a sua mucosa, os cornetos nasais, meatos e a face rostral e medial do septo nasal. Esta mucosa é constituída por epitélio pseudo-estratificado colunar ciliado (Figura 3) constituído por diferentes tipos de células: epiteliais ciliadas, não ciliadas, basais, caliciformes, serosas e com bordadura em escova (Kia'i & Bajaj, 2019), representadas na Figura 4.

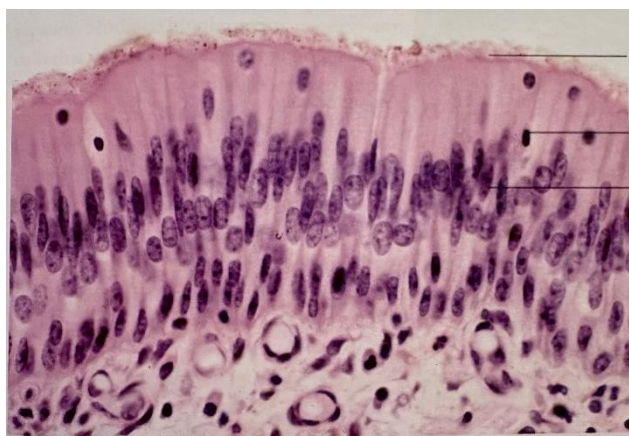
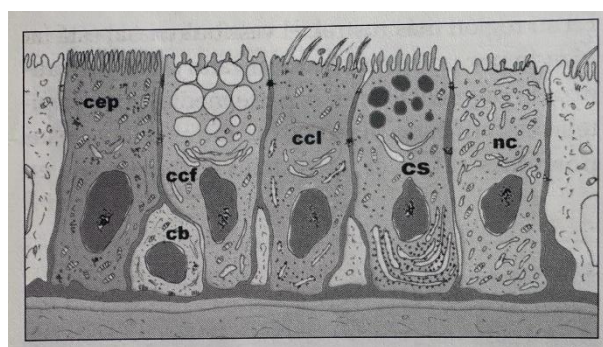


Figura 3- Epitélio respiratório-Hematoxilina e eosina (H&E, x120) (Liebich, 2019).



- cep- células com bordadura em escova
- ccf- caliciformes
- cb- células basais
- ccl- células ciliadas
- cs- células serosas
- nc- células não ciliadas

Figura 4- Representação dos diferentes tipos celulares que constituem o epitélio respiratório (Pérez et al., 2004).

As células epiteliais ciliadas são cilíndricas, com microvilosidades na porção apical, o núcleo está presente na região basal e possuem um complexo de Golgi muito desenvolvido (Pérez et al., 2004).

Na camada inferior às células descritas anteriormente, encontram-se as células basais que constituem cerca de 30% do total de células do epitélio. São pequenas, cuboides, com núcleos grandes e encontram-se alinhadas debaixo das células ciliadas dando ao epitélio um aspeto

pseudo-estratificado. São células que atuam como reservatório, podendo diferenciar-se nos diferentes tipos de células do epitélio, de forma a repor as funções protetoras da barreira epitelial (Pérez et al., 2004).

As células serosas, que representam apenas, cerca de 3%, são cilíndricas com microvilosidades e com complexo de Golgi muito desenvolvido, enquanto as células caliciformes, responsáveis pela produção de muco que recobre a superfície das vias respiratórias, encontram-se em quantidades semelhantes às células basais (Pérez et al., 2004).

As células não ciliadas têm abundantes microvilosidades e a sua função relaciona-se com a metabolização das substâncias tóxicas que entram no ar inspirado. Estão coordenadas para o transporte de partículas para a faringe provenientes do exterior, ou originadas no próprio corpo. Para facilitar este transporte elas são cobertas pelo muco, produzido pelas células caliciformes, o qual humedece o ar.

Por fim, as células com bordadura em escova, que representam apenas 3% das células deste epitélio, contêm largas e grossas microvilosidades na sua porção apical e um citoplasma com numerosas mitocôndrias. Apesar da sua função não estar ainda bem definida, estão descritas como sendo células sensitivas, já que estão associadas a axónios interepiteliais que provêm do nervo trigêmeo (Pérez et al., 2004).

O tecido conjuntivo subepitelial livre contém glândulas tubulo-acinares serosas, mucosas ou mistas (Figura 5). Estas podem estar presentes individualmente ou em grupos separadas por tecido linfoide (Liebich, 2019).

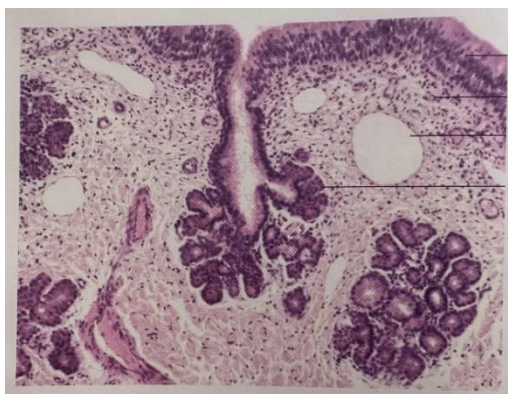


Figura 5- Epitélio respiratório- tecido subepitelial – (H&E, x120) (adaptado de Liebich, 2019).

A mucosa respiratória é bastante vascularizada por uma rede capilar subepitelial. Os capilares drenam para um plexo de veias expandidas e semelhantes a seios nasais. A contração temporária de almofadas musculares que se encontram orientadas longitudinalmente nas paredes das veias (veias de capacitância) retarda o fluxo de sangue no plexo venoso, resultando

no edema da mucosa. Este mecanismo reflexo subepitelial, juntamente com a mucosa, aquece e humedece o ar que entra na cavidade nasal (Liebich, 2019).

A região olfatória da cavidade nasal, que é coberta pela mucosa olfativa (Xi et al., 2023) (Figura 6) encontra-se imediatamente a seguir a região respiratória descrita acima. Esta apresenta uma coloração amarelada, sendo possível por vezes, distingui-la inclusive, macroscopicamente da mucosa respiratória (Dellmann, 1980). É responsável pelo olfato devido às células neurosensoriais bipolares, presentes na sua constituição que detetam os odores. A mucosa desta região é constituída por epitélio pseudo-estratificado colunar, pigmentado e adicionalmente às células olfativas neurosensoriais, possuem também células de suporte e células basais. Contém também, glândulas serosas, sendo as mais comuns as glândulas de Bowman na própria submucosa e fascículos axónios (Barrios et al., 2014).

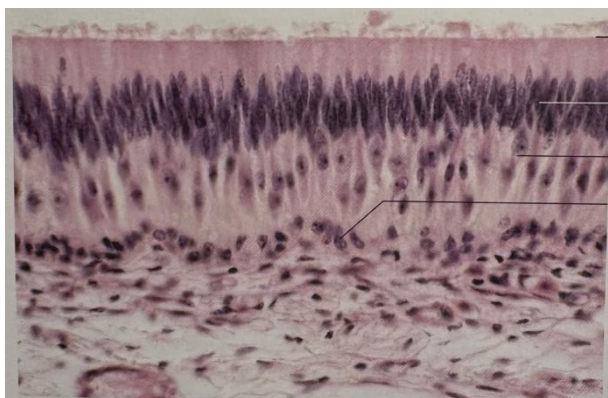


Figura 6-Epitélio olfativo – (H&E, x120) (Liebich, 2019)

A mucosa olfativa cobre parte do corneto nasal dorsal, cornetos etmoidais, septo nasal e órgão vomeronasal (Dellmann, 1980). A lâmina própria contém abundantes vasos sanguíneos e fibras nervosas, bem como glândulas olfativas tubulo-acinares ramificadas. Esta camada está conectada ao músculo ou à cartilagem subjacente (Dellmann, 1980). Uma destas glândulas é a glândula nasal lateral que produz exsudado seroso que serve também para humedecer as aberturas nasais. Estas glândulas produzem também enzimas, nomeadamente proteases, importantes para quebrar substâncias odoríferas e ligá-las às células neurosensoriais (Liebich, 2019).

2. Retrovírus

Os retrovírus são agentes infecciosos ubiqüitários, encontrados amplamente disseminados na natureza e com capacidade de infetar a maioria de espécies vertebradas e algumas invertebradas. A sua relevância é destacada, devido às doenças que podem induzir nos animais

como imunodeficiências, neoplasias, pneumonias ou doenças inflamatórias crônicas (Palmarini & Fan, 2003).

A família *Retroviridae* abrange um diverso número de vírus que se caracterizam pela capacidade de modelar a produção de ácido desoxirribonucleico (DNA), também denominado de provírus, a partir de ácido ribonucleico (RNA) presente no genoma destes vírus, através da atividade de uma enzima, a DNA transcriptase, e introduzirem-se nas diversas células do hospedeiro (Hunter, 2008) aos quais denominamos de retrovírus exógenos. Deste modo, quando a célula se divide, este DNA é replicado e traduzido em proteínas necessárias para envolver o vírus.

Dentro desta família, estão incluídas várias subfamílias, as quais pertencem os vírus causadores de adenocarcinoma pulmonar ovino (vírus Jaagsiekte), maedi-visna (lentivírus) e adenocarcinoma enzoótico nasal "*Enzootic nasal tumor vírus*" (ENTV) que são muito semelhantes entre si em termos de estrutura, organização genômica e ciclo de replicação.

Adicionalmente, existe também um grupo de retrovírus que formam parte do genoma celular humano e de outras espécies, aos quais denominamos retrovírus endógenos e são herdados como qualquer outro gene (Palmarini & Fan, 2003).

A sua estrutura interna é complexa, contendo um núcleo icosaédrico onde se encontra o seu genoma, constituído por duas cadeias simples de RNA com polaridade positiva e os monómeros que são mantidos na extremidade 5' por pontes de hidrogénio.

Possuem também, partículas virais em forma esférica, com envelope, medindo aproximadamente 80-110nm de diâmetro com projeções de glicoproteínas na sua superfície de 8nm para atuar com o recetor celular ou transmembranar (Dinter & Morein, 1990).

Todos os genomas retrovirais contêm quatro genes principais que codificam as proteínas virais e seguem sempre a mesma ordem: 5' gag-pro-pol-env 3' (Figura 7) porém alguns retrovírus mais "complexos" (lentivírus e spumavirus) contêm genes acessórios que se sobrepõem aos principais e regulam, bem como coordenam a replicação viral (Hunter, 2008).

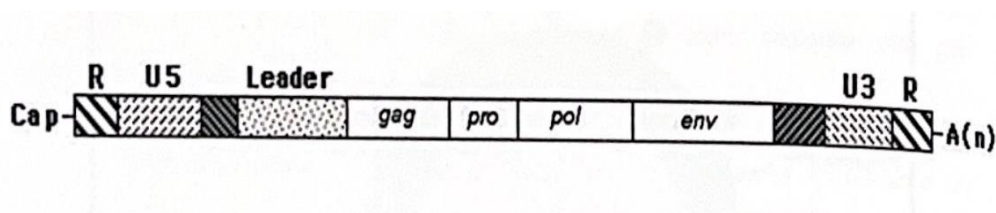


Figura 7-Genoma geral de um retrovírus contendo os quatro genes (gag, pro, pol, env) e as regiões R, U3, U5 (Zúñiga, 2010).

O gene gag codifica três proteínas importantes: a proteína da matriz, a proteína maior da cápside e da nucleocápside. O gene pro codifica uma protéase, responsável pela clivagem da poliproteína precursora, enquanto o gene pol codifica a enzima transcriptase reversa e uma integrase, implicadas na replicação do RNA viral e a sua integração no genoma do hospedeiro respetivamente. Por fim, o gene env codifica a informação para a glicoproteína de superfície e transmembranar que determina as interações específicas entre a partícula viral e os recetores de membrana celular durante a penetração viral (Leroux & Mornex, 2008).

Este vírus contém ainda regiões com sequências não codificantes designadas de “*Long Terminal Repeat*” (LTR), em ambos os extremos constituídos por regiões designadas “R” e uma região única denominada U5 na extremidade 5’ e U3 na extremidade 3’, sendo essenciais para regulação e expressão génica do vírus.

2.1 Replicação viral

O ciclo de vida dos retrovírus, que se encontra representado na Figura 8, é dividido em duas fases distintas: a fase inicial, que corresponde à infeção desde a ligação celular até à integração do RNA viral no genoma celular do hospedeiro e a fase tardia que se inicia, com a expressão dos genes virais até a libertação e maturação dos provírus que infetarão as células circundantes (Nisole & Saib, 2004).

A adsorção das partículas virais à superfície das células alvo é um processo que ainda não está esclarecido, pensa-se que pode ocorrer através de interações específicas, ainda não estudadas e que determinarão o início do ciclo de replicação (Nisole & Saib, 2004).

Após este processo de ligação, as partículas retrovirais utilizam proteínas da superfície das células como recetores específicos para entrar na célula-alvo através das interações com as glicoproteínas do envelope viral. A entrada retroviral é um mecanismo complexo de múltiplas etapas pois são muitas as barreiras e componentes celulares de proteção (Nisole & Saib, 2004).

A fusão das membranas viral e celular permite ao núcleo viral entrar no citoplasma da célula do hospedeiro, que após alcançar o núcleo da célula-alvo e ocorrer a libertação do revestimento, inicia-se a transcrição reversa de RNA viral em DNA, de cadeia dupla, que será integrado no DNA cromossómico da célula hospedeira em locais não específicos, para que o vírus se possa replicar, passando a denominar-se provírus. Esta integração é o passo fundamental para a replicação viral (Dinter & Morein, 1990).

A RNA polimerase II transcreve o provírus integrado em ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e este é posteriormente traduzido em proteínas. Esta transcrição é mutagénica porque ao introduzir-se na célula o LTR viral vai atuar dominando o controlo da expressão do oncogene. Esta integração é irreversível, tornando a divisão celular uma fonte de infeção viral.

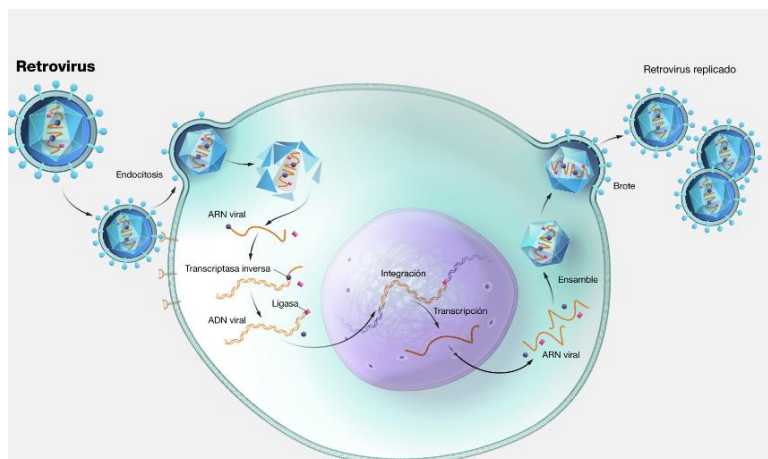


Figura 8- Ciclo de replicação de um retrovírus (Smith, 2024).

3. Adenocarcinoma nasal enzoótico

O adenocarcinoma nasal enzoótico (ANE) é uma neoplasia de etiologia viral, contagiosa, das glândulas da mucosa dos cornetos nasais, que afeta pequenos ruminantes e com registros de ocorrência em todos os continentes, exceto Oceânia (Quintas et al., 2022). A doença causa sintomatologia respiratória e é responsável por grandes perdas econômicas em explorações de pequenos ruminantes.

Sinónimos de ANE são tumor nasal enzoótico, adenopapilomatose infecciosa, adenopapiloma infeccioso e adenocarcinoma nasal infeccioso (De las Heras et al., 1998).

Esta neoplasia tem um β -retrovírus oncogénico, da família *Retroviridae*, associado à sua etiologia, denominado ENTV-1 em ovinos e ENTV-2 em caprinos.

Estes retrovírus são bastante similares ao retrovírus ovino Jaagsiekte (JSRV), o agente etiológico do adenocarcinoma pulmonar ovino (APO), também causador de uma neoplasia contagiosa do aparelho respiratório de ovinos, porém podem ser diferenciados por características únicas na sequência do seu genoma (De las Heras et al., 1993).

O ANE foi descrito pela primeira vez na Alemanha em 1939 (Nierbele, 1940). Anos mais tarde, em 1953, foi confirmada a associação da etiologia da doença, através da recolha e observação de tumores em ovinos de diferentes explorações no mesmo país (De las Heras et al., 1993).

Afeta preferencialmente pequenos ruminantes, jovens adultos, entre os dois e quatro anos sendo que na literatura o animal mais novo descrito tinha nove meses e o mais velho nove anos. Não há registros de qualquer predisposição genética, racial ou sexual (Švara et al., 2006).

Este tumor pode ser introduzido em novos rebanhos através de compra de animais infetados e a prevalência nos efetivos afetados é variável podendo atingir cerca de 15% (De las Heras et al., 2003).

3.1 Etiologia

O ANE tem associada uma etiologia nos dias de hoje, resultante de uma evolução nas hipóteses atribuídas até se encontrar aquela que é atualmente aceite, a ligação entre esta doença ao seu agente causal, um β -retrovírus denominado "*Enzootic nasal tumor virus*".

Inicialmente realizaram-se estudos sobre a possibilidade de aflatoxinas estarem na origem deste tumor, pois quando estão presentes no alimento, podem ser causa de carcinomas nasais. Após estudo de vários rebanhos afetados com ANE concluiu-se que não haveria ligação, pois nunca foram encontradas contaminações destas toxinas no alimento dos animais estudados (De las Heras et al., 1991). Também o parasita *Oestrus ovis* foi considerado como uma possível etiologia já que estavam presentes em alguns animais, observados em necropsia, porém comprovou-se não haver qualquer relação (De las Heras et al., 1991).

A primeira referência com hipótese da presença de um retrovírus associado a etiologia de ANE foi descrita por Yomechi et al., (1978), no Japão após identificar RNA dependente de atividade de DNA polimerase (transcriptase reversa) em tumores nasais enzoóticos em ovinos. Nesta referência descreviam também a presença de herpesvírus e orf vírus como possíveis causadores da doença (Švara et al., 2006).

Anos mais tarde, De las Heras et al., (1988) descreveram a observação de partículas virais de retrovírus na massa tumoral através de microscopia eletrónica em ovinos e caprinos. Estas descrições sugeriram a necessidade de avaliar a presença deste vírus em associação com este tipo de tumor através de diferentes métodos, tentando clarificar a possível etiologia, sendo que, em 1995 foi descrito por De las Heras et al., (1995) a presença de atividade de transcriptase reversa, em tumores e fluidos nasais de ovinos, associada a uma partícula de baixa densidade, típica de retrovírus.

Esta mesma partícula foi observada em tumores e fluidos nasais de ovinos e caprinos contendo a proteína 25000 Mr com reação cruzada com a proteína p27 do *Mason- Pfizer monkey virus* (MPMV) e p25 de JSRV através da técnica de *Western-blot* (Figura 9) (De las Heras et al., 1995). Esta partícula não foi descrita reagindo a anticorpos contra lentivírus de maedi-visna indicando assim que o vírus JSRV ou um outro retrovírus semelhante estariam associados a ANE.

Através de estudos experimentais realizados pelos mesmos autores, foi possível concluir que o vírus presente nas massas tumorais e secreções nasais era a fonte transmissora da doença e estava associado à etiologia da mesma, pois foi detetado em animais jovens que a desenvolviam. Neste mesmo estudo não foram registradas lesões compatíveis com APO nem características típicas de infecções por JSRV, provando que, apesar das suas semelhanças o ENTV era distinto de JSRV.

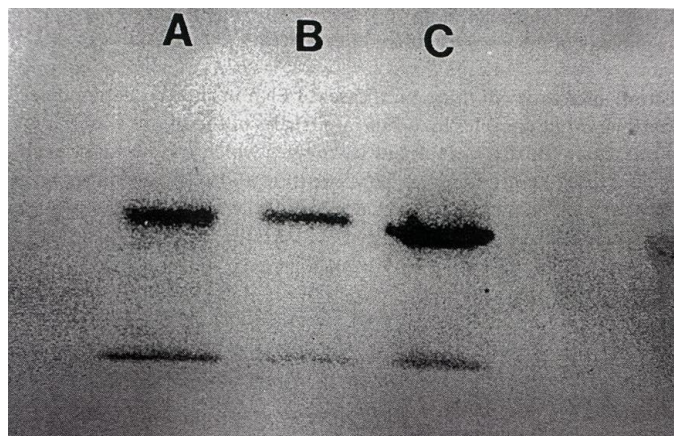


Figura 9- *Western-blot* relacionando ANE a outros retrovírus apresentando 25.000Mr proteína (De las Heras et al., 1995).

A- Fluido nasal inoculado em animal jovem sem manifestação de ANE anterior. B-Fluido nasal de um animal jovem com ANE. C- Fluido nasal de animal afetado naturalmente com ANE.

Após a comparação da sequência genômica de ENTV, JSRV e retrovírus endógenos concluiu-se que estes três retrovírus são muito semelhantes. Tal como JSRV, o ENTV apresenta uma variação mínima na LTR, região não-codificante, e compartilham os mesmos mecanismos patogênicos (De las Heras et al., 1995).

Esta variação, que determina a diferença, baseia-se na falta de presença de uma região denominada “Scal”, característica do gene gag do vírus Jaagsiekte, que não é encontrada no gene gag de ENTV bem como nas regiões *ofrX*, U3 LTR, duas pequenas regiões no gene gag e na região transmembranar (TM) do gene *env* (De las Heras et al., 2003).

Inicialmente assumiu-se também que este vírus seria o mesmo a causar lesões em ovinos e caprinos, porém a análise sequencial da região TM do gene *env* em animais afetados naturalmente por ANE demonstrou que haveria diferenças, provando que eram vírus distintos e sugerindo a especificidade de espécie e passando a denominar-se ENTV-1 ao vírus associado a afeções em ovinos e ENTV-2 para caprinos (De las Heras et al, 2003).

ENTV-2 e JSRV têm 73% de identidade dentro do domínio citoplasmático de *env* TM 48 aminoácidos (aa). No entanto, ENTV-1 tem apenas 49% de identidade de aminoácidos com

ENTV-2 ou JSRV nesta região causada por uma deleção de duas proteínas bases no gene env de ENTV-1.

Outra diferença entre estes dois vírus reside no tropismo dos tecidos que infetam. Ambos afetam o epitélio secretor das células dos turbinados do etmoide, porém em 2003 por Ortín et al.,(2003) após realização de um estudo da distribuição tecidual, utilizando um PCR específico, que amplifica a região U3 da LTR, verificou-se que o ENTV-2 estabelece uma infecção linfoide disseminada, sendo encontrado também em outros locais como a medula óssea, em vários linfonodos, baço, pulmões e células mononucleares sanguíneas. Colocando-se, deste modo, a hipótese de ser possível realizar um teste diagnóstico pré-clínico através da pesquisa do vírus nas células sanguíneas no caso do ENTV-2. Já o ENTV-1, ficou demonstrado que a sua infecção ficava confinada apenas à massa tumoral não sendo encontrado em outros órgãos ou tecidos.

De facto, o tropismo celular em relação a quais células podem ser infetadas pode ser exatamente o mesmo para esses vírus, mas o tropismo em relação às células-alvo para replicação permissiva é distinto. São estas diferenças, apesar de ligeiras, que dificultam o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico para reconhecimento e identificação destes vírus.

Estes vírus interagem com células de mamíferos através do recetor hialuronglicosaminase-2 (HYAL-2) para a ligação e entrada do vírus, podendo infetar diferentes tipos celulares. HYAL-2 é uma proteína de superfície de membrana, ubiquitária, que pertence às hialuronidases (Alberto et al., 2022). No entanto, como descrito previamente, a replicação ativa de ENTV-1/2 é principalmente restrita ao epitélio da cavidade nasal, onde os LTR se encontram ativos (De las Heras et al., 2019).

Os produtos génicos destes vírus ativam uma série de proteínas envolvidas em cascatas de sinalização que controlam o crescimento celular, como as vias AKT (Proteína quinase B) ou MAPK (Mitogene ativado quinase) induzindo a ativação permanente destas vias e perturbando o controlo e sobrevivência das células, provocando um crescimento celular desregulado (De las Heras et al., 2003).

3.2 Epidemiologia

O primeiro caso de adenocarcinoma nasal enzoótico em pequenos ruminantes foi descrito na Alemanha em 1939 (Nieberle,1940), e até o momento, a doença tem sido encontrada em todos os países com produção de pequenos ruminantes, exceto na Austrália e Nova Zelândia (De las Heras et al., 2003).

A doença transmite-se horizontalmente, possivelmente por via aerógena em afeções naturais e em afeções de transmissão experimental, através da inoculação intranasal e intrassinusoidal do homogeneizado de tecido neoplásico de ovinos e secreção nasal concentrada de caprinos naturalmente infetados (Švara et al., 2006). Não existem estudos suficientes, porém não se exclui a possível transmissão transuterina e oral (Leroux & Mornex, 2008).

O ANE pode ser introduzido num rebanho através da aquisição de animais infetados e o risco da sua introdução é superior se os animais adquiridos tiverem origem em regiões onde há circulação ativa deste vírus.

Os dados epidemiológicos indicam que a prevalência da doença varia geralmente entre 0,5 – 2 %, embora possa chegar a 15% (De las Heras, et al., 1998).

Com base na prevalência semelhante de ANE em diferentes raças de ovinos, vários autores concluíram que o sexo e a raça não têm influência na ocorrência da doença. A predisposição genética para a ANE também foi rejeitada por diversos autores, apesar de Duncan et al., 1967, relatarem a ocorrência de casos em descendentes de ovinos naturalmente infetados.

Apesar de ainda não existirem estudos que o comprovem, crê-se que a exposição a substâncias causadoras de irritação nasal, como o excesso de pó, má ventilação e má higiene da exploração, bem como algum agente infeccioso, possam ser fatores predisponentes ao desenvolvimento do tumor.

É de ressaltar que, qualquer doença ao entrar numa exploração terá repercussões económicas, sendo as que se localizam no aparelho respiratório, como é o caso de ANE, as de maior importância devido à grande relevância da fisiologia da respiração no organismo, pois é através de processos respiratórios que é possível realizar a oxigenação tecidual necessária ao funcionamento do organismo. Deste modo o ANE, quando presente numa exploração leva a perdas não só diretas, pelas lesões incapacitantes que causa no animal, e morte dos mesmos, como indiretas, pela perda de produtividade do animal, aumento do seu ganho médio diário, necessidade de ações de manejo suplementares, para observar e separar os animais bem como o refugio necessário que se fará a todos aqueles que se encontrem afetados (Sharp & De las Heras, 2000).

3.3 Sinais clínicos

A doença manifesta-se inicialmente por uma intensa e contínua secreção nasal seromucosa (Figura 10), ocasionalmente purulenta. Inicialmente o corrimento costuma ser unilateral, mas pode evoluir para bilateral, sendo nesta fase facilmente confundida com outras afeções nasais como oestrose, pólipos nasais ou infeções bacterianas (De las Heras et al., 2019).



Figura 10- Secreção nasal serosa. A- Secreção nasal serosa em fase inicial. B-Secreção nasal sero-mucosa em estados avançados da doença (Fotografia original).

Com a progressão da doença, a secreção torna-se mais abundante, sendo comum observar-se despigmentação e alopecia em redor das narinas até aos lábios superiores, comumente designado “nariz lavado” (Figura 11) (Ferrer et al., 2002). Este sinal particular permite, muitas vezes, realizar um diagnóstico diferencial.

A quantidade de fluido nasal e a duração do mesmo varia entre animais, sendo em casos mais avançados possível de recolher até 300 ml por dia (De las Heras et al., 2003).

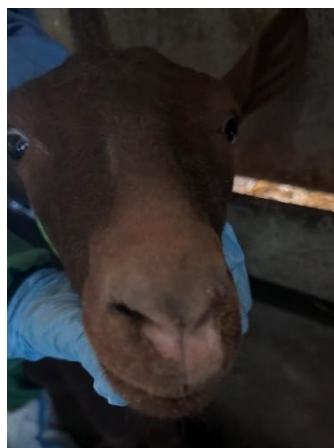


Figura 11 - Alopecia em redor das narinas e lábio superior, devido à intensa e contínua secreção nasal (Fotografia original).

Com o seguimento da doença e devido ao crescimento tumoral, que obstrui as vias nasais, a secreção nasal passa a ser acompanhada de dispneia inspiratória com roncos, causados pela estenose das vias aéreas, tosse, espirros, e por vezes, caso o crescimento do tumor afete estruturas retrobulbares é possível observar exoftalmia (Figura 12), geralmente unilateral. Em fases mais tardias da doença a respiração passa a realizar-se pela boca, observando-se a dilatação das bochechas, deformações ósseas cranianas que podem inclusive fistular (De las Heras et al., 1991).

Em casos de desenvolvimento bilateral do tumor, a sintomatologia desenvolve-se mais rapidamente e é visivelmente mais severa.



Figura 12- Exoftalmia e secreção nasal hemorrágica em estado muito avançado de doença (Fotografia original).

Apesar de inicialmente os animais, se encontrarem ativos, apiréticos e com apetite, estes perdem gradualmente peso, culminando em estados anoréticos morrendo dentro de um curto período de tempo, após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (Švara et al., 2006). Aproximadamente entre três semanas a nove meses nas ovelhas e duas semanas a cinco meses em cabras, eventualmente por infecções bacterianas secundárias que originam pneumonias ou septicémias (De las Heras et al., 2003).

3.4 Lesões

3.4.1 Lesões macroscópicas

A região etmoidal e adjacente a este osso, na cavidade nasal, corresponde a localização de aparecimento do ANE, possível de observar após corte sagital do crânio, manifestando-se por lesões como massas unilaterais ou bilaterais, pálidas e friáveis, (Figura 13) que alteram gradualmente a arquitetura anatômica desta área à medida que o tumor se desenvolve (De las Heras et al., 2019).

O tumor apresenta um crescimento em todas as direções, formando pólipos, que podem obstruir totalmente a cavidade nasal, faringe, seios paranasais ou a cavidade craniana, causando compressão de estruturas circundantes, atrofia ou deformações ósseas (Švara et al., 2006).

Estes pólipos caracterizam-se pela sua textura e consistência, coloração, superfície, tamanho, forma e por último, infiltração.



Figura 13-Presença de tumor ocluindo de forma total a cavidade nasal esquerda de caprino de 4 anos de idade (Fotografia original).

Inicialmente, a massa tumoral apresenta-se com consistência mole e coberta de muco, porém com o avançar da doença, aumenta a sua consistência até a mesma ficar endurecida e a produção de muco torna-se copiosa. A coloração numa fase inicial pode ser semelhante à do tecido circundante, rosa-pálido ou avermelhado devido à vascularização. Conforme o tumor cresce, a coloração pode alterar-se para tons mais escuros, como vermelho escuro, ou preto devido à hemorragia (Figura 14) e necrose associadas ao crescimento tumoral.

É ainda possível observar áreas purulentas devido à proliferação bacteriana secundária que se pode instalar decorrente da dificuldade de circulação de ar nesta região (De las Heras et al., 2003).



Figura 14-Massa tumoral com alteração de coloração devido à necrose de tecidos- cavidade nasal de cabra (Fotografia original).

Quanto à superfície das massas tumorais, esta pode ser lisa ou irregular, dependendo da invasão local dos tecidos circundantes e da presença de ulcerações.

O tamanho e a forma variam muito dos estádios iniciais, onde as lesões são pequenas, discretas e muitas vezes impercetíveis, para os estádios mais avançados, onde podem ocupar grande parte da cavidade nasal. A forma das massas é muito variável, desde arredondadas, irregulares ou lobuladas, dependendo da distribuição do crescimento tumoral dentro da cavidade nasal.

Por último, a infiltração é altamente variável, uma vez que este tumor tem um crescimento em todas as direções, podendo assim afetar estruturas como o osso nasal ou seios nasais, resultando em deformidades ósseas (Figura 15) e comprometimento da arquitetura normal das cavidades nasais.



Figura 15-Deformação óssea em crânio de cabra devido ao crescimento da massa tumoral (Fotografia original).

Não estão descritas grandes diferenças macroscópicas entre as lesões de cabras e ovelhas apenas se regista que em cabras é mais frequente encontrar maior número de pólipos inflamatórios.

Estas lesões tumorais permitem distinguir ANE de outras afeções nasais como rinite crónica proliferativa (RCP), devido à sua localização específica nos cornetos etmoidais.

3.4.2 Lesões microscópicas

A microscopia eletrônica e os estudos histoquímicos revelam que as células neoplásicas correspondem a células serosas, mucosas ou de glândulas mistas, podendo estas ser provenientes das glândulas mucosas olfativas ou respiratórias (Švara et al.,2006).

As células apresentam formas cuboides ou prismáticas (Figura 16) proliferando em padrões acinares, tubulares, papilares ou mesmo quísticos (Figura 17). Por norma não perdem a sua orientação, porém em algumas áreas, as membranas basais desaparecem e a orientação da secreção é alterada (De las Heras et al., 2003).

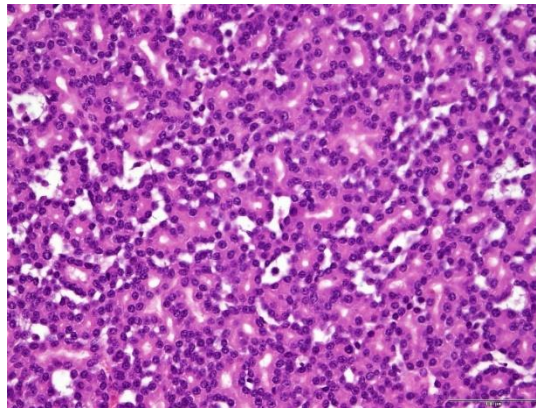


Figura 16-Células cuboides em tecido tumoral de infecção natural em cabra (H&E, 250x) (Fotografia gentilmente cedida pelo Professor Doutor Marcelo De las Heras, Universidade de Zaragoza).

As regiões mais internas demonstram um padrão mais tubular ou acinar, enquanto as mais externas um padrão claramente papilar.

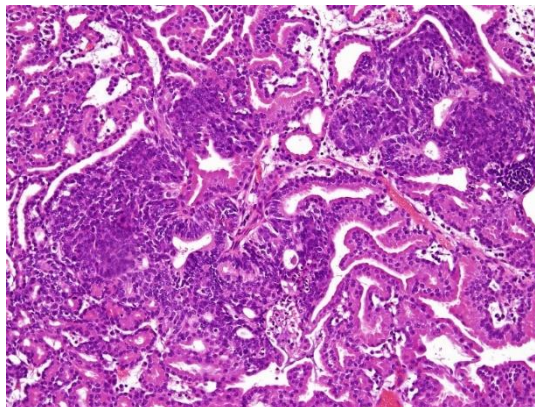


Figura 17-Secção histológica de tecido tumoral de infecção natural em cabra- padrão papilar (H&E, 250x) (Fotografia gentilmente cedida pelo Professor Doutor Marcelo De las Heras, Universidade de Zaragoza).

Estas células apresentam núcleos geralmente redondos ou ovóides, com cromatina aglomerada e localizados centralmente ou na região basal, porém há registros de algumas áreas com alterações na relação núcleo/citoplasma, anisocariose e núcleos gigantes, já os citoplasmas reagem à coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), visto ser um bom método para identificar carboidratos encontrados nas muco-substâncias produzidas pelas células caliciformes, sem metacromasia (De las Heras et al., 2003).

Utilizando procedimentos imunohistoquímicos é possível observar proteína lisozima nestas estruturas. No interior do citoplasma observam-se grânulos secretores, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, algumas proteínas e aparelho de Golgi bem desenvolvido. Estes grânulos, redondos, encontram-se tendencialmente na região apical, variando de tamanho entre 0,1 a 1nm, densos e delimitados por membrana (De las Heras et al., 2003).

Extracelularmente, próximo da superfície apical, em vacúolos citoplasmáticos é possível observar partículas virais (Figura 18). Estas partículas variam no seu diâmetro entre 80 a 100nm e têm características excêntricas ou centrais (Švara et al., 2006).

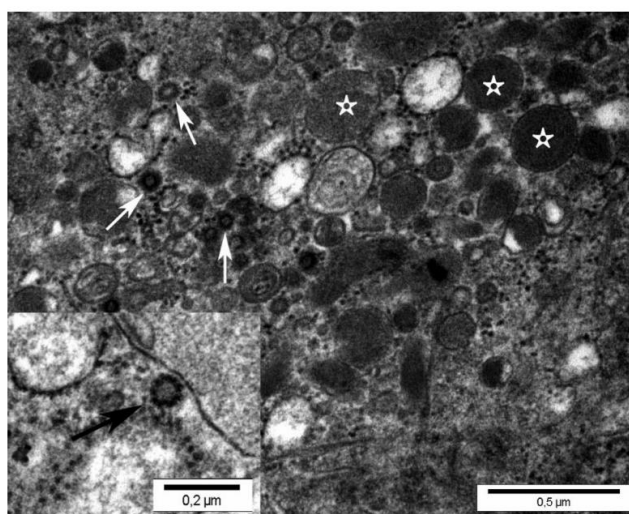


Figura 18-Partículas virais (setas) e grânulos secretores no citoplasma de células tumorais (Özmen et al., 2010).

O estroma é frequentemente escasso, edematoso e densamente infiltrado principalmente por plasmócitos, mas também por linfócitos e macrófagos (Yomechi et al., 1978). O epitélio que cobre a neoplasia glandular pode parecer normal ou hiperplásico.

A neoplasia na maioria das regiões está bem definida, porém em algumas zonas pode ser observada a infiltração de tecido conjuntivo ou ósseo. Não demonstra sinais de malignidade, o

seu índice mitótico é baixo, sendo que nunca foram registadas metástases em linfonodos regionais ou em outros órgãos (Scott, 2015).

Estas características levaram a diferentes denominações entre autores ao longo dos anos entre as quais, papilomas, adenopapiloma, adenoma e por fim como adenocarcinoma de baixa malignidade. Esta classificação baseou-se no crescimento infiltrativo das células neoplásicas dos tecidos circundantes e na ausência de metastização, sugerindo um potencial maligno limitado (De las Heras et al., 1998).

Em resumo, as células neoplásicas, em geral, correspondem a células de glândulas serosas, mucosas ou mistas e parecem ter origem nas glândulas de Bowman da área olfativa (Yomechi et al., 1978) ou nas glândulas mucosas respiratórias e olfativas (De las Heras et al., 1991).

3.5 Resposta imunológica ao vírus

A evolução da resposta imunológica, detetada serologicamente, em afeções naturais e experimentais em ovinos e caprinos é muito controversa (Ortín et al., 2003).

Em 1995 realizaram-se estudos com a técnica de *Western-blotting*, para detetar anticorpos contra os antígenos virais de ANE em fluidos nasais, tendo estes demonstrado que esta técnica não obtinha resultados positivos e fiáveis (De las Heras et al., 1995).

No mesmo ano, estudou-se, também, a resposta imunológica de pequenos ruminantes utilizando a mesma técnica, porém com anticorpos contra o vírus *Mason-Pfizer* em tecidos tumorais de ANE. Verificou-se que havia atividade destes mesmos anticorpos, embora quando se pesquisava anticorpos no sangue de animais afetados contra proteína viral de ANE, o resultado era negativo podendo afirmar assim que não havia desenvolvimento de resposta imune específica contra o vírus de ANE (Rosati et al., 1995).

Esta aparente falta de resposta imune foi descrita podendo ser devida à tolerância induzida pela expressão de retrovírus endógenos nestes animais, pois há registos de deteção de 15 a 20 cópias destes vírus tanto em ovinos como em caprinos, fazendo com que o sistema imune não reconheça os retrovírus exógenos. Outra teoria será que este vírus afete de alguma forma o sistema imune, impossibilitando-o de agir contra estas partículas virais (De las Heras et al., 2003).

Estudos mais recentes identificaram reatividade de anticorpos contra ENTV-1 através de ELISA, *Western-blot* e teste de neutralização em amostras de soros de ovinos afetados naturalmente e que se encontravam em rebanhos com histórico de ANE e não foram detetados num outro grupo sem registos de ANE. Estas amostras foram testadas quanto à reatividade contra proteínas recombinantes da cápside de ENTV-1 e da subunidade de superfície (Env) produzidas usando o

sistema de expressão bacteriana *polyhistidine* tag (His-tag) e removendo His-tag antes de usá-lo como antígeno (Walsh et al., 2014).

Os resultados mostraram que anticorpos reativos contra as proteínas recombinantes da cápside e da subunidade Env podem ser detetados no soro de ovinos com ou sem evidência tumoral (Walsh et al., 2014).

Estes resultados sugerem que essas interações foram realmente específicas e que os ovinos são capazes de desenvolver anticorpos contra o ENTV-1. Porém, o teste de ELISA e de neutralização mostraram baixa especificidade e sensibilidade, não sendo confiáveis para serem usados para diagnosticar a infecção pelo ENTV-1 (Walsh et al., 2014), ainda que provem que há desenvolvimento de anticorpos e que os ovinos não são imunes à infecção exógena de ENTV-1 como se pensava anteriormente (De las Heras et al., 2019). Desta forma, é necessário realizar mais estudos para identificar se estas técnicas são ou não realmente sensíveis, específicas e confiáveis para que sejam utilizadas no diagnóstico *ante-mortem* desta doença.

Em caprinos, não foram encontrados estudos mais recentes relativos ao desenvolvimento e produção de anticorpos.

3.6 Diagnóstico

Para um diagnóstico completo, este deve ser confirmado pelo diagnóstico clínico, imagiológico, etiológico e anatomopatológico.

São muitos os métodos de diagnóstico complementares possíveis de serem realizados para diagnosticar esta doença, ainda que nem todos sejam úteis nas diferentes fases, mas a sintomatologia clínica observada durante o exame físico é suficientemente específica para suspeitar de ANE (Lacasta, s.d).

No animal vivo, o diagnóstico pode ser confirmado pela demonstração de uma neoplasia na parte caudal da cavidade nasal utilizando os diferentes métodos de diagnóstico por imagem como a termografia, radiografia ou TC que nos permitem visualizar estruturas compatíveis com a massa tumoral. Entre estes métodos a TC é o que apresenta melhores resultados (Puertas, 2021), porém não é um método económico nem de fácil acesso para animais de produção em particular para os pequenos ruminantes.

Atualmente não existem testes laboratoriais que confirmem o diagnóstico clínico, pois não são detetados, de forma segura e consistente, anticorpos contra ENTV, devido à falta de resposta imunológica nos animais afetados (Švara et al., 2006).

A forma mais fácil e confiável de realizar o diagnóstico é conseguida, após o abate do animal, ou da sua morte por causas naturais, com um corte sagital da cabeça, e realizando um exame anatomopatológico; observando-se uma massa branco-acinzentada de consistência variável, que oclui caudalmente uma ou ambas as fossas nasais, confirmando posteriormente através de exame histológico e identificação do agente com técnicas moleculares (De las Heras et al., 1991).

Para a realização do diagnóstico etiológico existem ainda alguns métodos laboratoriais, nomeadamente o PCR ou *Western-blot*, que podem detetar a presença do vírus em amostras de exsudado nasal ou parênquima neoplásico de animais afetados (Švara et al., 2006), ainda que até ao momento não existam estudos que revelem bons resultados.

Não são conhecidos meios de cultura *in vitro* deste vírus, pelo que o isolamento do mesmo para cultura não é aplicável, no presente.

3.6.1 Diagnóstico clínico

Quando estamos perante uma afeção com origem no trato respiratório os sinais clínicos mais comumente observados são secreções nasais, tosse, ruídos respiratórios, dispneia e em alguns casos, febre (Ramos & Ferrer, 2007).

Para uma exploração clínica completa devemos iniciar por realizar uma anamnese completa e avaliação das instalações a nível de infraestruturas, ambiente, encabeçamento e manejo. A temperatura, humidade e ventilação são três dos fatores mais importantes a registar quando estamos perante um animal com sintomatologia respiratória (Ramos & Ferrer, 2007).

De seguida, a avaliação do animal, com foco no trato respiratório, deve ser efetuada num ambiente tranquilo sem qualquer manejo que permita mensurar a frequência e tipo respiratório, que deve encontrar-se entre as 10 a 30 respirações por minuto. Quando nos deparamos com um animal com a frequência respiratória fora deste intervalo devemos igualmente realizar um exame físico completo, pois esta alteração não é um indicador direto de um problema do trato respiratório (Smith & Sherman, 2023).

A medição da temperatura e inspeção da cabeça, onde se possa avaliar o estado dos olhos, possíveis deformações ou assimetrias faciais, modificações da pele, aumento dos linfonodos regionais, secreções nasais, alterações de cor das narinas e fluxo de ar devem ser o passo seguinte, uma alteração no fluxo de ar poderá sugerir a presença de um corpo estranho ou neoplasia na cavidade nasal (Smith & Sherman, 2023).

É crucial cheirar o ar expirado, pelas narinas e pela boca, uma vez que este cheiro pode sugerir a presença de infecção, causada por exemplo por um abscesso da raiz dentária, ou tumor em algum seio nasal, ou ao longo das vias aéreas (Smith & Sherman, 2023).

Também é necessário observar os animais durante a alimentação, no comedouro e bebedouro, pois nestes momentos, em determinadas doenças é possível observar uma descarga de muco, sangue ou larvas do parasita *Oestrus ovis* (Ramos & Ferrer, 2007).

Em animais afetados por ANE, no momento da exploração clínica, será expectável observar, nas narinas, a presença de uma secreção nasal sero-mucosa contínua e abundante, uni ou bilateral, alteração da coloração das narinas devido à presença contínua de secreção, fluxo de ar alterado, indicativo de uma obstrução parcial ou total da fossa nasal, e auscultação de estertores na inspiração e expiração causados pela passagem do ar por massas de muco.

Nesta observação será possível também registar animais com respiração alterada, realizando-a, através da boca, dilatação das bochechas devido a dificuldade que tem em expirar o ar e em casos mais avançados da doença podem ser observadas deformações faciais e exoftalmia.

3.6.2 Diagnóstico por imagem

As técnicas de diagnóstico por imagem são técnicas não invasivas, que permitem obter imagens médicas para o diagnóstico de determinadas doenças. Permitem também compreender e estudar a normal anatomia e fisiologia de forma a permitir identificar anomalias nas diferentes espécies (Castells et al., 2019). Apesar de serem importantes ferramentas diagnósticas, nem sempre têm sido utilizadas de forma suficiente e eficiente (Ling-xu et al., 2022) e não são frequentes de utilizar na clínica de pequenos ruminantes, à exceção da ecografia, porém para fins reprodutivos (Aznar, 2017). A utilização da câmara termográfica ainda não é comum, porém é o método de diagnóstico de imagem mais útil no diagnóstico de afeções do trato respiratório em pequenos ruminantes, pois guia-nos para a localização da lesão favorecendo o diagnóstico final (Quintas et al., 2022).

3.6.2.1 Ecografia

A imagem ecográfica não é um bom método de diagnóstico para esta doença pois apenas em casos onde o tumor já atingiu uma dimensão considerável, causando destruição óssea, passando a região do osso etmoide a estar coberta de tecido mole que criará uma imagem ecogénica possível de ser observada por este método (Castells et al., 2019).

3.6.2.2 Radiografia

A imagem radiográfica é baseada na absorção de raios-X à medida que eles atravessam o corpo do animal. Dependendo da quantidade de radiação absorvida num tecido em particular, uma quantidade diferente de raios-X passará através do corpo e interagirá com o dispositivo de detecção para finalmente fornecer uma imagem de projeção bidimensional dos tecidos (Castells et al., 2019).

Estas imagens radiográficas devem ser realizadas em projeções de plano dorsoventral, pois devido à complexidade das estruturas e à sobreposição de tecidos da cavidade nasal, as massas em casos de presença unilateral não são facilmente visíveis num plano lateral.

O mesmo acontece quando a massa apresenta pequenas dimensões, podendo mesmo não ser visível e levar a um diagnóstico incorreto. Outra limitação da radiografia é a impossibilidade de julgar se há lesões que ocupem o espaço na nasofaringe, devido à oclusão dos dentes molares no plano lateral (Ling-xu et al., 2022).

Em estados mais avançados a massa tumoral, que se encontra no interior da cavidade nasal, empurra o osso nasal, podendo este fistular, perdendo a textura radiopaca (Figura 19) característica do tecido ósseo, o que é visível através da radiografia (Ferrer, 2018).

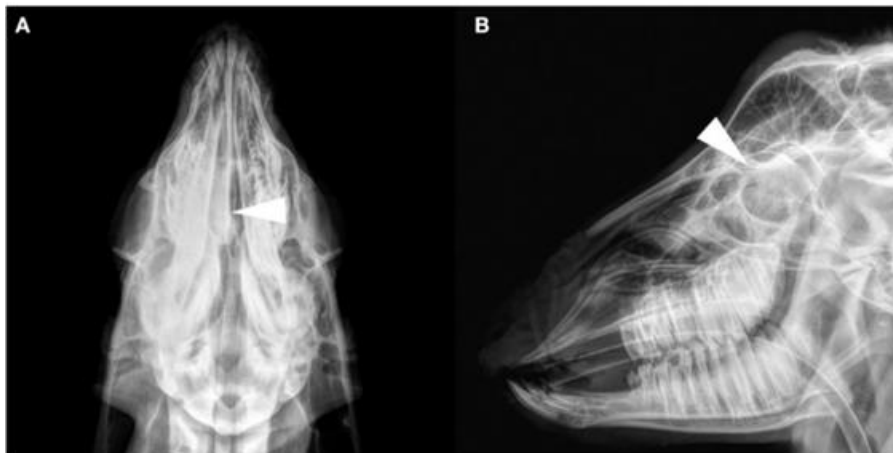


Figura 19-Radiografia de cabeça de cabra. A- Projeção dorso-ventral B- Projeção lateral onde é difícil observar a massa de tecido mole na cavidade nasal direita (Imagem gentilmente cedida pelo SCRUM).

3.6.2.3 Tomografia computadorizada

A TC é considerada uma técnica eficiente para o diagnóstico de lesões da cavidade nasal e das suas extensões para estruturas vizinhas (Awaad et al., 2019).

O exame tomográfico baseia-se na absorção variável de raios X pelos diferentes tecidos, realizando cortes sequenciais e captando imagens em volta da região pretendida, obtendo uma

excelente precisão anatômica proporcionada pela possibilidade de trabalhar as imagens numa perspectiva multiplanar (Castells et al., 2019).

Adicionalmente, o uso de *software* de tratamento digital de imagem permite identificar e isolar estruturas específicas, neste caso, da massa tumoral, como a sua vascularização, determinar o seu volume, segmentar estruturas ou áreas anatômicas específicas, entre outros (Henriques, 2022).

No caso desta neoplasia as imagens revelam, na sua maioria das vezes, a presença de uma massa de tecidos moles, lobulada, com limites claros, porém bordos e densidade irregulares, na região caudal nasal. Em casos mais avançados é possível observar a destruição do osso etmoidal, alteração do osso nasal ou até a face com deformações (Figura 20) (Ferrer et al., 2020).

Nos casos em que a lesão é bilateral, observamos também desvio do septo nasal e, caso a massa já tenha atingido elevadas dimensões esta pode chegar a obstruir a nasofaringe e/ou bloqueio das coanas (Ling-xu et al., 2022).

Apesar de ser o melhor método para visualizar as diferentes estruturas anatômicas, não é de fácil acesso a animais de produção, tem um custo elevado associado, para além de requerer sedação e anestesia do animal para a realização do exame.

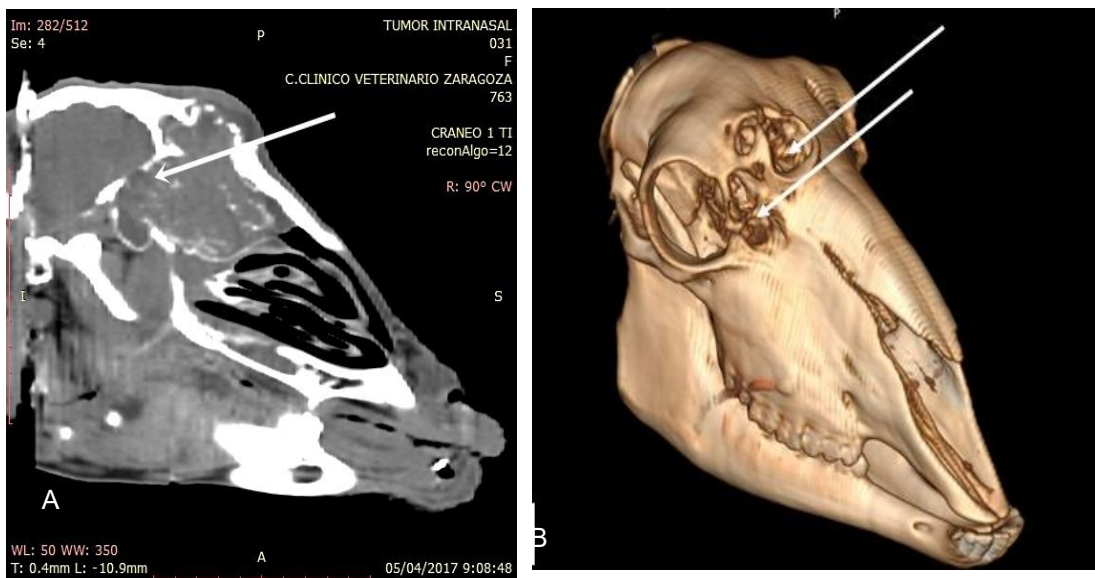


Figura 20-A-TC (corte sagital) onde visualizamos uma massa na região etmoidal da cavidade nasal compatível com ANE. **B- TC** onde se visualiza a destruição do osso nasal e deformação facial em ovino com ANE (Fotografia gentilmente cedida pelo SCRUM).

3.6.2.4 Endoscopia

A endoscopia é uma técnica excelente que permite obter imagens e alcançar diversas estruturas internas a nível da cavidade nasal e aparelho respiratório, inclusive a bifurcação da traqueia. Porém é uma técnica muito pouco utilizada nos pequenos ruminantes e no diagnóstico de ANE, por razões económicas e de maneio, sendo necessário, tal como na TC, a anestesia ou sedação do animal (Ramos & Ferrer, 2007).

Através deste método seria possível observar a oclusão da parte caudal das cavidades nasais unilateralmente ou bilateralmente por uma massa cinzenta e com superfície granular coberta de muco. É possível também realizar biópsia para análise histopatológica que confirmará o diagnóstico presuntivo (Scott, 2015).

3.6.2.5 Termografia

A termografia é uma técnica de diagnóstico, não invasiva, baseada na lei de Stefan-Boltzmann, que estabelece que todos os corpos emitem energia eletromagnética proporcional à sua temperatura por condução, convecção e radiação (Polat et al., 2018). Desta forma, a câmara termográfica permite a medição da energia eletromagnética no comprimento de onda da radiação infravermelha (3 a 12 μm) (Schaefer, et al., 2004), absorvendo essa mesma radiação, registando a temperatura da superfície de um animal e criando uma imagem térmica, termograma (Colak et al., 2008).

Estes aparelhos possuem uma grande sensibilidade e alta resolução o que permite detetar pequenas oscilações térmicas (Figueiredo et al., 2012).

O exame termográfico é empregue desde 1970 tanto em humanos quanto em animais, sendo que no contexto médico-veterinário, inicialmente, só era utilizado na deteção de lesões inflamatórias em equinos de corrida (Cetinkaya & Denirukutu, 2012) porém com os avanços no aprimoramento do aparelho e na redução de custos do mesmo o seu uso encontra-se em expansão provando-se que a utilização deste método é de elevado valor no diagnóstico de afeções, que muitas vezes desencadeiam processos inflamatórios, alterando o fluxo sanguíneo da região e, por consequência a temperatura da zona afetada. Neste sentido, este método é muito útil para avaliação de patologias do trato respiratório superior em pequenos ruminantes, pois realiza imagens baseadas numa escala de cores que abrange temperaturas mais frias, representadas a verde e azul, ou temperaturas mais quentes, representadas a amarelo, laranja, vermelho e branco, tornando-se útil para identificar padrões térmicos anormais nos animais podendo identificar a elevação da temperatura antes do aparecimento dos primeiros sinais

clínicos, atuando como um sinal de alerta para a observação do animal (Redaelli et al., 2013).

No termograma da cabeça de um animal saudável (Figura 21A), encontram-se as cores azul e verde na região das narinas, pois o ar, passando corretamente por esta região, refrigera a área.

No entanto nos casos de animais positivos, a ANE (Figura 21B), a termografia mostra regiões vermelhas no segmento caudal da fossa nasal, combinando com áreas igualmente quentes na região do osso etmoidal onde se localiza o tumor (Castells et al., 2019). Também a região das narinas pode surgir com coloração mais quente, pois a obstrução provocada pelo tumor faz com que o ar não consiga passar corretamente e refrigere a área.

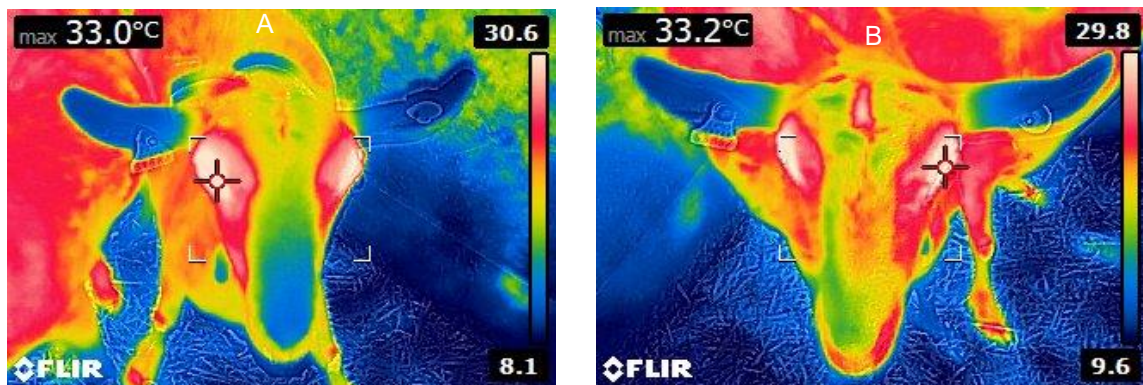


Figura 21-A- Imagem termográfica de animal saudável. **B-** Imagem termográfica de animal com ANE (Fotografia original).

É o método de imagem de menor custo, fácil utilização e interpretação e sem necessidade contenção ou captura do animal, evitando a sua manipulação e alterações pelo stress. Apesar das inúmeras vantagens, apresenta, porém, algumas desvantagens pois apesar dos mamíferos conseguirem manter a sua temperatura constante, esta é influenciada por diversos fatores como a temperatura ambiente, espessura, densidade e qualidade do pelo que atua como isolante térmico, humedecimento da superfície corporal, entre outros. Por este motivo, ao utilizar este método como meio diagnóstico e para que a avaliação seja precisa e confiável é necessário considerar todos os fatores influenciadores (McCafferty, 2007).

3.6.3 Diagnóstico etiológico

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica laboratorial utilizada para amplificar sequências de DNA. Existem diferentes métodos, porém o mais comum usa sequências curtas de DNA, denominadas de “*primers*”, para selecionar a parte do genoma de interesse a ser amplificada. A temperatura da amostra é aumentada e reduzida repetidamente para ajudar a enzima de replicação de DNA a duplicar a sequência que está a ser copiada. Com esta técnica, altamente sensível, é possível obter milhões de cópias da sequência em estudo em apenas algumas horas (Smith, 2024).

Estudos realizados por Ortín et al. em 2003, utilizando a técnica de PCR de DNA, para amplificar a sequência U3 do DNA proviral e detectar o pró-vírus neste material genético, comprovaram que o vírus raramente é encontrado fora das células da massa tumoral em ovinos, sendo apenas encontrado na sua forma livre no exsudado nasal. Em caprinos a situação difere, sendo possível encontrar em células de outros tecidos (Ortín et al., 2003).

Para a realização desta técnica devem ser recolhidas amostras da secreção com uma zaragatoa, de preferência flexível, introduzindo-a o mais profundamente possível após limpeza com soro fisiológico das narinas do animal (Ramos & Ferrer, 2007).

Por este motivo, é uma técnica difícil de executar, não só pela exigência técnica, pois é necessário alcançar as células tumorais que, numa fase inicial, se encontram na região caudal da cavidade nasal e muitas vezes não se alcançam com a zaragatoa, levando a resultados errôneos, tornando a técnica pouco fiável, bem como em rebanhos grandes o manuseio é muito exigente (De las Heras et al., 2019).

Para o diagnóstico definitivo de ANE, de forma mais fiável, deve a técnica de PCR ser acompanhada de métodos imunohistoquímicos para confirmação da doença.

Por outro lado, quando utilizada a técnica de RT-PCR, que utiliza o RNA como molde, a eficácia é melhorada. Foram realizados estudos, a partir de exsudados nasais, utilizando RT-PCR para regiões U5 e gag do vírus ENTV-1 em ovinos e comparados com a coloração pela técnica de imunohistoquímica. Identificou-se sempre que o animal tem sinais clínicos ou mesmo em fases muito iniciais, através de dois grupos de estudo, um deles com resultados de 100% de concordância, porém continua a não ser uma boa técnica em detectar animais infetados em fase inicial, sem desenvolvimento tumoral (Walsh et al., 2014).

Apesar dos bons resultados e da técnica ser relativamente barata, os autores referem que não é, mais uma vez, um bom método de diagnóstico em grandes rebanhos por questões logísticas.

Recentemente em 2022 um estudo realizado por Ling-xu et al., voltou a comprovar a eficácia da técnica de RT-PCR no diagnóstico de ANE, sendo possível pesquisar e identificar o vírus livre nas secreções nasais.

3.6.4 Diagnóstico anatomopatológico- Histopatologia e Imunohistoquímica

Através do exame histopatológico é possível realizar uma análise microscópica de um tecido para a observação e detecção de possíveis alterações ou lesões, confirmando muitas vezes o diagnóstico. Para a realização deste exame é imprescindível que sejam recolhidas amostras, preservado ao máximo a morfologia e composição química do tecido em questão, sendo posteriormente fixadas para que não se danifique o fragmento (Kahwa & Purton, 1995).

É um processo demorado, uma vez que a amostra precisa de passar por um processador de tecidos com o objetivo de desidratar o fragmento, adicionando-se parafina para criar o molde, que mais tarde será cortado e colocado numa lâmina, devidamente corada para observação. Por norma, o corante utilizado é a hematoxilina-eosina, permitindo uma melhor visualização de estruturas.

Para confirmar o diagnóstico de ANE este exame deve ser realizado após a necropsia. Em casos de diagnóstico positivo, é possível observar as lesões microscópicas anteriormente descritas, nomeadamente a proliferação de células glandulares, características desta neoplasia (Švara et al., 2006).

Também está descrita a técnica de imunohistoquímica para identificação e confirmação desta neoplasia, utilizando anticorpos contra JRSV que são capazes de estabelecer ligação com os constituintes tecidulares utilizados como amostra, que funcionam como antigénios (Ortín et al., 2003).

Esta ligação permite situar e identificar a presença de variadas substâncias nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada aos complexos antigénio-anticorpo entretanto formados.

3.6.5 Diagnósticos diferenciais

Os principais diagnósticos diferenciais de ANE, resultam de afeções crónicas que afetam igualmente o trato respiratório superior de pequenos ruminantes e estão descritos neste capítulo e resumidos na **tabela 1**, bem como os seus métodos de diagnóstico na **tabela 2**, porém não devem ser descartados os diagnósticos diferenciais mais simples como rinites causadas por corpos estranhos ou pó, abscessos, ou até mesmo lesões traumáticas.

3.6.5.1 Oestrose

A oestrose é considerada uma doença parasitária de rebanho, que afeta pequenos ruminantes, causada pela fase larvar do díptero *Oestrus ovis*, parasita obrigatório e causador de mifases nas fossas e seios paranasais dos ovinos e caprinos (Quintas, 2012).

É considerada a rinite mais importante e prevalente na espécie ovina em países de zonas mediterrânicas e climas temperados, como Portugal e Espanha, não sendo tão frequente nos caprinos (Quintas, 2012).

A infeção ocorre quando a fêmea deste díptero deposita as larvas ao redor e no interior das narinas. Estas larvas de pequenas dimensões (cerca de 2mm), branco-claras, migram para o interior da cavidade nasal permanecendo nos seios paranasais. O período larval varia dependendo das condições ambientais, e quando estas se encontram maduras, deixam as vias nasais, caem no solo, onde se enterram, transformando-se em pupas que darão origem a uma nova mosca (Smith & Sherman, 2023).

A sua presença e os seus metabolitos provocam uma rinite crónica inflamatória e irritativa manifestando-se através de sinais clínicos como: dispneia inspiratória, corrimento nasal, inicialmente seroso e evoluindo para mucoso ou sanguinolento (Figura 22), e em casos mais graves purulento. Pode ocorrer também a oclusão do trato respiratório superior e edema das narinas. Está descrita também sintomatologia neurológica quando as larvas percorrem migrações erráticas, e eventualmente podem ocorrer, outro tipo de complicações secundárias que poderão advir desta infeção como abscessos pulmonares e pneumonias intersticiais (Gracia et al., 2019).

Estes sinais clínicos podem ser acompanhados de espirros esporádicos, principalmente durante a manhã, numa tentativa de expulsar as larvas maduras (L3) do interior das fossas nasais (Aznar, 2017).



Figura 22-Ovino com Oestrose apresentando corrimento nasal seroso sanguinolento (Fotografia original).

Algumas larvas morrem no interior dos seios, causando reações inflamatórias, dispneia ou alergia, que se traduzem em desconforto, interrupção na alimentação e ausência de pastoreio, provocando grandes perdas económicas, resultantes da diminuição da condição corporal.

Esta parasitose ocorre de forma diferenciada consoante o tipo de exploração e temperatura ambiente do local. É mais frequente em sistemas extensivos ou semiextensivos, onde os animais pastoreiam e têm um maior contacto com este díptero (Lucientes et al., 2009) e em países com temperaturas mais amenas onde ocorrem picos das formas larvares nos hospedeiros, nas estações de primavera e outono (Gracia et al., 2019). Em sistemas intensivos, a frequência é menor e os picos ocorrem em períodos de aumento da temperatura ambiental (Quintas et al., 2022).

Em necropsia, os estágios larvares mais frequentemente observados são L1 e L3 em simultâneo (Figura 23), não sendo comum encontrar os três estágios larvares no mesmo animal (Quintas et al., 2022).

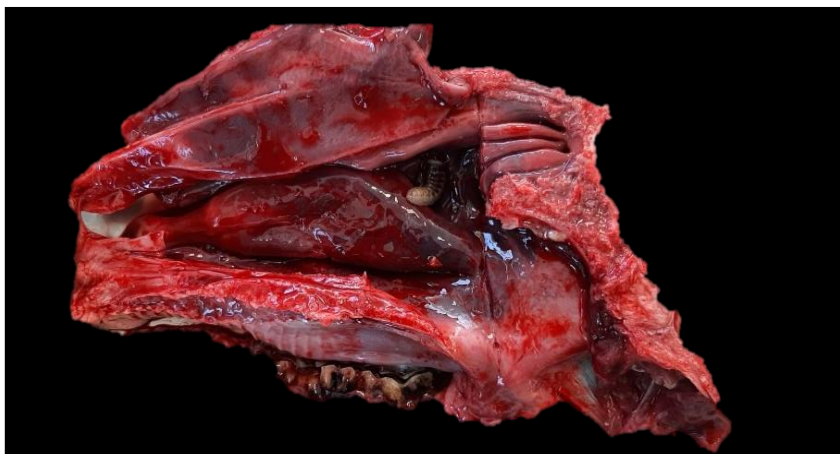


Figura 23-Presença de larvas de *Oestrus ovis* em corte sagital de cabeça de ovino (Fotografia original).

O diagnóstico baseia-se na observação das moscas próximas dos animais nas horas mais quentes do dia, no comportamento do rebanho, na visualização de uma descarga nasal crónica, geralmente afetando 80% do rebanho, e na presença das larvas nas fossas nasais de animais abatidos para consumo (Rodrigues, 2003).

O tratamento preconizado inclui a administração subcutânea de antiparasitários com atividade sistémica, como lactonas macrocíclicas, ou closantel, o que permite confirmar o diagnóstico clínico presuntivo.

Como estratégia de controlo desta doença e devido à sua sazonalidade, deverão ser realizados dois momentos anuais de desparasitação externa em fevereiro/março e em novembro, em países pertencentes ao hemisfério norte, de forma a quebrar o ciclo do parasita, bem como um maneio adequado que permita reduzir o contacto do díptero com o animal (Garcia et al., 2019).

3.6.5.2 Rinite crónica proliferativa

A RCP é uma doença individual, infecciosa e esporádica, de progressão lenta que afeta os cornetos ventrais das fossas nasais de ovinos. Apesar da sua etiologia não se encontrar totalmente esclarecida, esta doença está associada a uma bactéria, *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* serovar 61:k:1,5,7 (SED), e apresenta mau prognóstico se os animais afetados não iniciarem o tratamento em fases iniciais (Lacasta, et al., 2012).

A SED é uma bactéria de Gram negativa, intracelular facultativa e anaeróbia, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, identificada pela primeira vez nos Estados Unidos da América em 1952, a partir de carcaças de borregos (Ryff & Browne, 1952). Existem aproximadamente 300 serovariedades desta bactéria, mas é o serovar 61:k:1,5,7 que representa 45.7% do total de doenças com etiologia em *Salmonella* (Davies et al., 2001).

Apesar de ser comensal do trato respiratório superior de ovinos, pode, contudo, tornar-se um agente primário de doença quando se torna intracelular das células epiteliais nasais, gerando uma resposta inflamatória exacerbada no corneto nasal ventral, com desenvolvimento de pólipos e espessamento da mucosa (Lacasta et al., 2012). Esta inflamação pode ser uni ou bilateral, afetando normalmente os linfonodos regionais e pode inclusive obstruir a cavidade nasal, provocando uma severa dispneia inspiratória.

Os sinais clínicos são muito específicos e podem persistir durante várias semanas incluindo: animais sem febre, roncos característicos audíveis sem estetoscópio, secreção nasal sero-mucosa uni ou bilateral, respiração com a boca aberta e perda de condição corporal. Com a progressão da doença, esta torna-se facilmente reconhecida porque a proliferação de tecido inflamatório (Figura 24) poderá aumentar até se verificar a sua protrusão através das narinas (Lacasta et al., 2012).



Figura 24-Proliferação de tecido inflamatório em narina de ovino (Fotografia original).

Além disso, é importante ressaltar que os animais afetados com RCP ficam predispostos a infecções pulmonares secundárias porque o inadequado fluxo de ar providencia um ambiente mais propício ao crescimento desta bactéria (Lopez-Tamayo et al., 2020; Rubira et al., 2021).

No exame *post-mortem* os turbinados ventrais encontram-se edemaciados (Figura 25), com a superfície rugosa (Lacasta et al., 2012) e com tecido proliferativo habitualmente acompanhado de pólipos brancos ou amarelos cobertos de muco (Rubira et al., 2019). Os animais afetados apresentam frequentemente deformações nasais e desvios do septo nasal (Stokar-Regenscheit et al., 2017).



Figura 25-Narinas edemaciadas e corneto ventral observados em corte sagital de cabeça de ovino (Fotografia original).

Até à data não existem relatos da transmissão zoonótica com origem no contacto com ovinos (Rubira et al., 2021), porém esta bactéria tem potencial zoonótico (Horvath et al., 2016). Apesar de raras, estão descritas doenças em humanos com etiologia nesta bactéria, geralmente em indivíduos com outra doença associada ou em pessoas que mantenham o contacto com répteis, visto que é uma bactéria muito comum nestes animais (Schröter et al., 2004).

Quanto ao tratamento, são escassas as referências de tratamentos para esta doença em ovinos. Em 2019 foi descrito, baseado num projeto de investigação no serviço clínico de ruminantes da universidade de Zaragoza, em Espanha, durante três anos (2016-2018) os resultados de diferentes moléculas de acordo com a sua sensibilidade à bactéria, baseados no teste de difusão (Rubira et al., 2019).

Como experimentação inicial utilizaram espiramicina por via sistémica, sem resultados positivos pois os animais permaneciam com sinais clínicos. Foram realizadas outras tentativas de tratamentos com diferentes moléculas, por via intranasal, e mais uma vez sem resultados significativos. Por último foi realizado um tratamento de longa duração (15 dias) com

marbofloxacina (fluroquinolona) que microbiologicamente não teve sucesso, porém eram registadas melhorias na sintomatologia. Esta molécula tem um grande potencial contra bactérias de Gram negativas, com atividade intracelular, e foi descrita com bons resultados em tratamentos de longa duração em humanos com *Salmonella typhi*, o que poderá ser a solução (Rubira et al., 2019).

3.6.5.3 Rinite obstrutiva

A rinite obstrutiva caracteriza-se por ser um processo crónico, lento, que afeta um grande número de animais do rebanho e pode levar a um bloqueio total das narinas. A lesão encontra-se sempre na asa do corneto ventral (Figura 26), na entrada da narina. É causada por uma esporidesmina presente nos esporos do fungo *Pithomyces chartarum*, presente em pastagens de áreas húmidas e quentes. Afeta ovinos e caprinos, porém estes últimos mostram-se mais resistentes (Lacasta, s.d.).

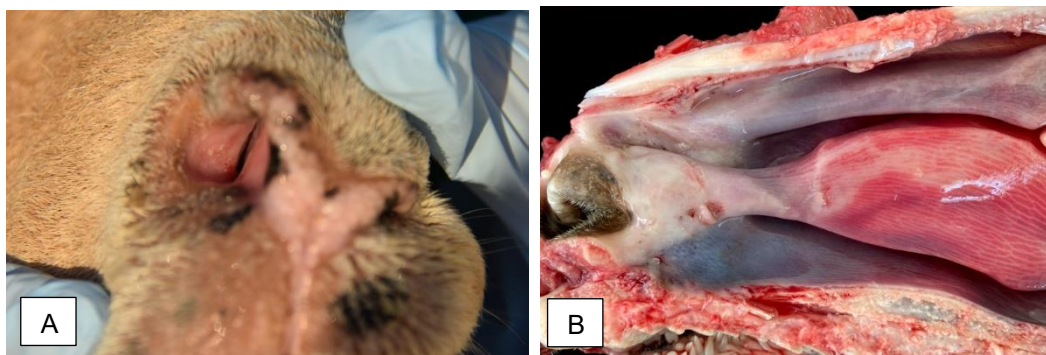


Figura 26-A- Espessamento da prega alar do segmento rostral da narina. B- Edemaciação do corneto nasal ventral e da prega alar (Fotografia gentilmente cedida pelo SCRUM).

Os sinais clínicos respiratórios que causa não são muito óbvios, porém resultante de uma fotossensibilização hepática secundária, os animais apresentam lesões dermatológicas, eczema facial e lesões hepáticas.

A esporidesmina após absorção pelo trato intestinal entra pela circulação portal onde, no sistema biliar, a sua presença leva à formação de radicais livres tóxicos que reagem com o oxigénio molecular para produzir radicais superóxido. A lesão dermatológica ocorre pela impossibilidade de o fígado expulsar a filoteritina (agente fotodinâmico) (Fernández et al., 2021).

Na necropsia deve ser observado com especial atenção a porção da asa da narina, que é espessa e com a superfície rugosa. É uma doença muito difícil de controlar e não existe tratamento.

3.6.5.4 Adenocarcinoma pulmonar ovino

O Adenocarcinoma pulmonar ovino, apesar de não ser uma afeção do trato respiratório superior, provoca uma neoplasia pulmonar contagiosa de transmissão por via aerógena ou lactógena e, à semelhança do ANE, é causado por um retrovírus, Jaagsiekete que induz a transformação oncogénica das células epiteliais de bronquíolos e alvéolos, sendo descrita também em todos os continentes exceto Oceânia (Quintas et al., 2022).

Os animais afetados apresentam sinais clínicos respiratórios, como dispneia mista, estertores e roncamentos, causados pela acumulação de fluidos nas vias respiratórias, tosse produtiva, sem febre e com perda de peso progressiva associada. Em fases mais avançadas exibem um abundante corrimento nasal seromucoso, que é observado, quando o animal baixa a cabeça ou é exposto ao teste do carrinho de mão (Ortín et al., 2019).

Estão descritas duas formas da doença, a forma clássica e a atípica. Na primeira, as lesões mais comuns são o aumento do tamanho dos pulmões pela presença da neoplasia, especialmente os lobos crânio-ventrais (Figura 27A), com coloração acinzentada ou púrpura e com espuma tanto na traqueia, como no pulmão (Figura 27B). É possível observar também linfadenomegália dos linfonodos mediastínicos e traqueobrônquicos (Griffiths et al., 2010).

Por sua vez, a forma atípica, maioritariamente assintomática, caracteriza-se por uns nódulos esbranquiçados encontrados na face diafragmática do pulmão. Ao corte apresentam uma consistência dura e seca, sem fluido espumoso (Griffiths et al., 2010).

No exame microscópico, o tecido tumoral caracteriza-se pela presença de múltiplos focos de proliferação neoplásica de células epiteliais em zonas alveolares e bronquiais, entre formas acinares e papilares, e que comprimem as estruturas ao seu redor (Quintas et al., 2022).

Não existe tratamento para esta doença. Os animais com APO não desenvolvem anticorpos, logo as provas de diagnóstico são muito escassas e por esse motivo preconiza-se a identificação precoce de animais afetados e sacrifício dos mesmos a fim de evitar a disseminação viral (Ortín et al., 2019).

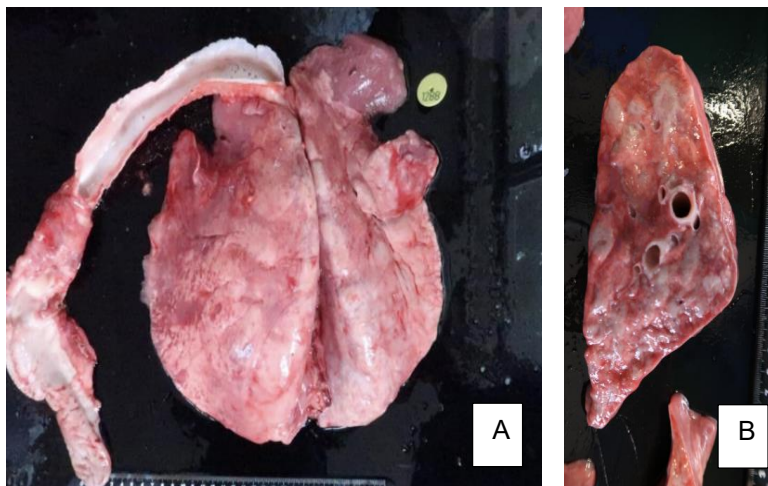


Figura 27-Lesões características de APO. A-Pulmão de ovino com aumento de tamanho, coloração alterada e presença de espuma na traqueia. B- Presença de espuma em pulmão de ovino (Fotografia original).

3.6.5.5 Conidiobolomicose

Os agentes envolvidos na etiologia desta doença são *Conidiobolus incongruus*, *Conidiobolus lamprauges* ou *Conodiobolus coromatus*, emergente em áreas tropicais e subtropicais onde as ovelhas pastoreiam em áreas próximas de reservatórios de água que contenham matéria vegetal em decomposição, associada a elevadas temperaturas e humidade que favorecem a proliferação do fungo (Quintas et al., 2022).

Os animais com esta doença apresentam uma lesão granulomatosa (Figura 28C/D) na cavidade nasal, com aparecimento agudo ou crónico, que em fases avançadas obstrui de forma completa as fossas nasais, causando dispneia.

Pode encontrar-se sob duas formas clínicas: rinofacial e rinofaríngeal. A forma rinofacial é caracterizada por aumento de volume no vestíbulo nasal, união da mucosa cutânea do nariz, alteração da textura da pele da região anterior da testa e o lábio superior, apresentando lesões ulceradas na mucosa nasal e no palato duro. A segunda ocorre mais frequentemente e cursa com o envolvimento da zona etmoidal, exoftalmia unilateral (Figura 28 A/B) e aumento dos linfonodos regionais (Carmo et al., 2020).

Ambas as formas caracterizam-se pela presença de secreção nasal serosa ou mucosa abundante, febre, apatia, anorexia, perda de peso, acentuado desconforto respiratório e eventualmente sinais neurológicos se a inflamação invadir o lobo frontal do cérebro.

Na necropsia é possível observar uma lesão inflamatória granulomatosa unilateral, irregular, multilobada e com massas amareladas (Quintas et al., 2022).

O diagnóstico definitivo desta doença deve basear-se na sintomatologia e as lesões encontradas no estudo anatomopatológico após o isolamento e identificação do agente etiológico.

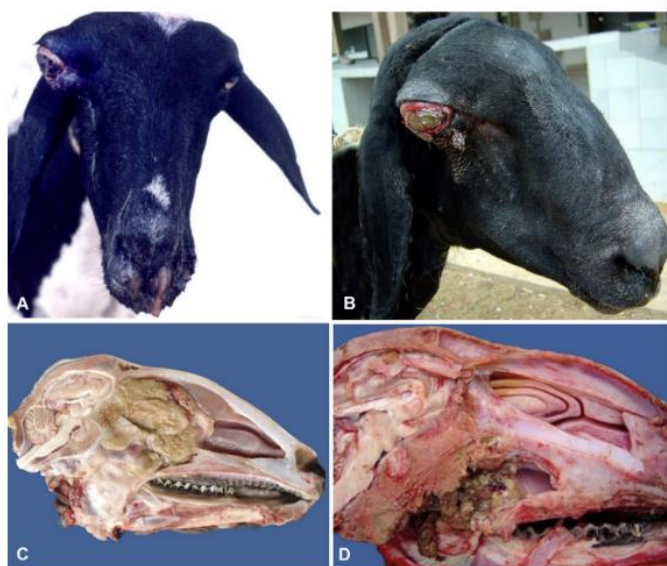


Figura 28-Ovelha com conidiobolomicose. A- Secreção nasal e exoftalmia unilateral. B-Exoftalmia unilateral com conjuntivite severa e ulceração. C/D- Corte sagital de cabeça com massa granulomatosa, amarelada, e firme na região nasal (C) e faríngea (D) (Adaptado de Carmo et al.,2021).

3.6.5.6 Pitiose

A pitiose é causada por *Pythium insidiosum* (classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales*, família *Pythiaceae*), um microrganismo semelhante a um fungo que afeta diversas espécies incluindo o ser humano. Estão descritas três formas de pitiose em ovinos: cutânea, rinofacial e digestiva. Por sua vez em caprinos há apenas descrição de um caso na forma cutânea (Ubiali et al., 2021).

A forma rinofacial pode ocorrer esporadicamente, mas também pode ser epizootica, com morbidade de 0,6–20% e letalidade de 100%, sendo uma importante causa de morte em ovinos e de perdas económicas (Carmo et al., 2021).

À semelhança da doença descrita anteriormente, esta ocorre também em regiões tropicais e subtropicais, com favorecimento do seu aparecimento nas mesmas condições ambientais que na conidiobolomicose, porém com evolução mais aguda (15-90 dias).

Os animais afetados apresentam caquexia, secreção nasal serosanguinolenta de odor fétido, dispneia, fístulas oro-rostrais com úlceras no palato duro (Figura 29A), aumento dos linfonodos retrofaríngeos e parotídeos, espirros e epistáxis (Quintas et al., 2022).

Ao contrário da doença anterior, a forma clínica mais comum é a forma rinofacial, onde há um aumento do volume da porção rostral da cavidade nasal, levando muitas vezes a deformações, sendo comum apelidar estes animais de “focinho de touro” (Figura 29B) (Quintas et al., 2022).

Na necropsia podem ser observadas lesões com exsudado caseoso, amarelado e fétido, muitas vezes associado a tecido necrótico (Figura 28C) desde a junção mucocutânea das narinas até a

porção média da cavidade nasal, podendo envolver o septo nasal, palato duro e maxila. É ainda possível observar uma infecção bacteriana secundária do osso frontal e tecidos moles adjacentes. Raramente, a infecção nasal causada por *P. insidiosum* em ovinos pode estender-se até à rinofaringe.

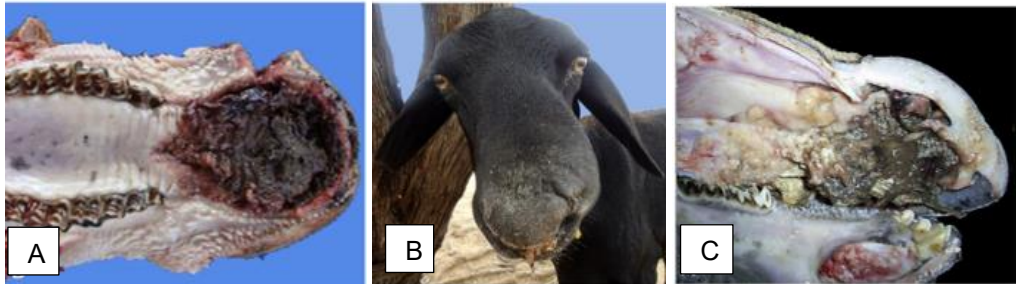


Figura 29-Lesões de Pitiose em ovelha. A- Úlcera extensa no palato. B-Deformação facial em ovino com Pitiose. C- Rinite necrótica (Adaptado de Carmo et al., 2021).

Apesar dos sinais clínicos exuberantes está descrito a recuperação dos animais com forma rinofacial severa após a administração de 1 g/dia de iodeto de potássio por via oral (Ubiali et al., 2021).

O diagnóstico presuntivo de pitiose pode ser feito com base nos sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas e deve ser distinguida da conidiobolomicose, que é clínica e morfológicamente semelhante, por esse motivo deve ser realizada a identificação do agente por métodos imunohistoquímicos, moleculares e/ou baseados em cultura.

Tabela 1- Etiologia, localização da lesão e sinais clínicos característicos dos diagnósticos diferenciais de ANE.

Processo respiratório	Etiologia	Localização da lesão	Tipo de corrimento nasal	Outro sinal clínico	Uni/Bilateral
Oestrose	Larva <i>Oestrus ovis</i> .	Toda a cavidade nasal	Mucoso/Hemorrágico ("Nariz sujo")	Espirros	Uni ou Bilateral
Rinite crônica proliferativa	<i>Salmonella entérica</i> subesp. <i>diarizonae</i>	Corneto ventral	Seromucoso	Tecido proliferativo	Uni ou Bilateral
Rinite obstrutiva	<i>Pithomyces chartarum</i>	Narinas	-----	Narinas estenosadas	Unilateral
APO	Vírus JSRV	Pulmões	Espumoso	Imagem ecográfica pulmonar alterada	Uni ou Bilateral
Conidiobolomicose	<i>Conidiobolus incongruus</i> , <i>lamprauges</i> , <i>coronatus</i>	Rinofacial/Rinofaringeal	Seroso/Muco-hemorrágico	Exoftalmia unilateral	Unilateral
Pitiose	<i>Pythium insidiosum</i>	Rinofacial/Rinofaringeal	Serosanguinolento e fétido	Deformação facial	Unilateral

Tabela 2- Técnicas de diagnóstico a aplicar nos diagnósticos diferenciais de ANE. Adaptada de Quintas et al.,2012.

Processo Respiratório	Sinais Clínicos	Termografia	Ecografia	Raio X	TC	Serologia	Cultura	Tipo De Amostra
Oestrose	Fácil				Difícil	X		Cabeça inteira
RCP	Moderados	X		X	X		X	Cornetos nasais Zaragatoas de exsudado nasal
Rinite obstrutiva	Fácil						X	-----
APO	Fácil		X	X	X		X	Pulmão
Conidiobolomicose	Fácil	X		X	X		X	Cabeça inteira
Pitiose	Fácil	X		X	X		X	Cabeça inteira

3.7 Tratamento e prevenção

Até ao momento não está descrito qualquer tratamento ou vacina eficaz contra o vírus ENTV. Foram documentadas duas tentativas experimentais de tratamento, porém sem sucesso (Švara et al., 2006).

Ducan et al., em 1967, referiram a melhoria dos sinais clínicos em duas ovelhas após irradiação da cavidade nasal e Rings & Robertson em 1981 registaram a remoção cirúrgica de parte da neoplasia em ovinos, porém 12 horas após o procedimento registou-se a morte dos mesmos.

Em animais de companhia, cães e gatos estão descritas a ressecção ou redução cirúrgica das massas nasais, ainda que com muitas complicações associadas. A radioterapia também poderá ser uma opção de tratamento. Esta última pode ser utilizada como tratamento definitivo ou paliativo. O tratamento paliativo, torna-se a opção mais viável pelo menor risco, existindo diferentes esquemas gerais de radiação que podem ser empregues, dependendo do tumor em si e a unidade de radioterapia em uso com o objetivo de reduzir a inflamação e minimizar o crescimento tumoral. Independentemente do tipo exato de radiação, estes tratamentos são administrados uma vez por dia durante vários dias a semanas, e é necessária anestesia para cada tratamento (Mortier & Blackwood, 2020).

Porém em animais de produção como os pequenos ruminantes, a ressecção cirúrgica nestes animais é considerada inviável, devido ao alto risco de hemorragia, pois é um procedimento muito invasivo, de recuperação longa e o valor da cirurgia, muitas vezes não cobre o valor do animal, já a radioterapia é uma técnica que exige a sua realização em ambiente hospitalar onde não é fácil estes animais terem acesso e comprometendo a possibilidade de destino do animal para consumo humano.

Não existindo tratamento efetivo, a forma correta de proceder com vista na prevenção e controlo da disseminação da doença na exploração, será a separação e abate dos animais afetados. Esta separação deve ocorrer o mais precocemente possível pois são eles a fonte do vírus aos restantes animais do rebanho, especialmente em explorações intensivas, bem como medidas de biossegurança gerais, porém rigorosas.

Será também muito importante continuar a estudar a doença e desenvolver técnicas de diagnóstico precoce que possam ser realizadas em vida, fáceis e rápidas, identificando os animais afetados numa fase ainda inicial, permitindo a sua separação e evitando o contágio entre animais tornando a prevenção mais eficaz.

II-Estudo experimental

Estudo comparativo de métodos para o diagnóstico precoce do Adenocarcinoma Nasal Enzoótico em caprinos.

1. Introdução

As doenças do trato respiratório são um dos principais problemas na produção de pequenos ruminantes, tanto em sistema intensivo como em extensivo, provocando perdas económicas diretas e indiretas ao produtor.

O ANE encontra-se incluído neste conjunto de doenças apresentado uma enorme relevância devido ao seu alto poder de contágio e elevada taxa de morbilidade que culmina em mortalidade. Dada a dificuldade que esta neoplasia apresenta na sua prevenção, e sem tratamento atualmente conhecido, é urgente realizar estudos e investigações que visem melhorar os métodos de diagnóstico atuais ou desenvolver métodos de diagnóstico diferentes e fiáveis, possíveis de ser executados em grandes rebanhos. Estes métodos devem conseguir identificar os animais infetados de forma precoce para que possa ocorrer a separação dos mesmos e evitar de alguma forma, o contágio.

O diagnóstico através de pesquisa serológica não é fiável, pois a resposta imune dos animais à presença do vírus associado à etologia de ANE continua a ser um tema controverso entre os diferentes investigadores. Atualmente o método de diagnóstico praticado, em vida, é a pesquisa viral por PCR, método de difícil execução e impraticável em efetivos de grandes dimensões pela dificuldade na colheita da amostra.

O presente estudo visa contribuir para o avanço científico sobre o ANE, procurando analisar e avaliar a fiabilidade de um outro método de diagnóstico, que possa ser realizado *ante-mortem*, de fácil execução e com resultados fiáveis, de forma a oferecer soluções práticas e fáceis que possam ser implementadas nas explorações e deste modo, minimizar os desafios enfrentados pelos produtores de pequenos ruminantes.

Neste sentido foram realizadas e analisadas a eficácia do uso de imagens termográficas para o diagnóstico precoce de ANE, tendo por base o método de diagnóstico considerado "*gold standard*", porém apenas possível de realizar *post-mortem*, a observação histopatológica de lesões em caprinos.

2. Objetivos

O presente estudo encontra-se dividido em duas partes, a **primeira parte** teve como principal objetivo avaliar a eficácia e precisão da utilização de imagens termográficas (método A) para o diagnóstico precoce de ANE. Para alcançar este objetivo foram definidos três objetivos específicos:

Objetivo Específico 1: Avaliar a concordância entre os resultados do Método A (Imagem termográfica) e o Método C (Histopatologia), considerado o método “*gold standard*” na identificação de lesões.

Objetivo Específico 2: Determinar a concordância entre os resultados obtidos pelo Método B (RT-PCR) e o Método C (Histopatologia).

Objetivo Específico 3: Determinar se os animais com resultados positivos do Método A (Imagem termográfica), que não são positivos ao Método C (Histopatologia), eram animais falsos positivos, ou verdadeiros positivos que ainda não tinha desenvolvido lesões capazes de ser identificadas pelo método C.

A **segunda parte** do presente estudo teve como objetivo realizar e analisar semanalmente as imagens termográficas de dois animais e avaliar se estas sofriam alterações compatíveis com as alterações observadas nos sinais clínicos que estes animais apresentavam.

3. Material e Métodos

3.1 Descrição do caso clínico

O presente estudo foi realizado com base num caso clínico proveniente da exploração, “Quesos de Catí”, em Espanha, resultante de um aumento exponencial de casos de ANE que alertou o produtor devido à crescente morbilidade e mortalidade observada nos seus animais. Este aumento exponencial ocorreu, após a introdução de 510 novos animais em 2020, destacando a coincidência temporal entre a integração dos novos animais e a incidência da doença.

3.2 Contexto e caracterização da exploração

A exploração “Quesos de Catí”, localizada em Ares del Mestre, na província de Castellón, Espanha abrange uma área coberta de 990 m² e possui cerca de 800 cabras de aptidão leiteira, para produção de queijos, da raça murciana granadina. Os animais são produzidos em regime semi-extensivo, permanecendo em área coberta apenas no momento da ordenha e de alimentação. São alimentadas com alimento fibroso *ad libitum* e alimento concentrado distribuído através de máquina de distribuição, 8 vezes por dia. O processo de distribuição do alimento concentrado gera uma quantidade considerável de pó, que provoca irritação das vias respiratórias e conseqüentemente, muita tosse nos animais.

O esquema de produção baseia-se no desmame dos cabritos com um mês de idade, enquanto as cabras são simultaneamente ordenhadas. Os machos são enviados para o matadouro após o desmame, enquanto as fêmeas permanecem para reposição.

A exploração iniciou atividade em 2016 com 160 cabras e registava cerca de 2-3 (1,9%) casos de ANE por ano. Em 2020 foram adquiridas mais 510 cabras da região de Múrcia e após a introdução dos novos animais no efetivo foi registado um aumento de casos desta neoplasia. Atualmente com cerca de 800 animais, e no momento em que este estudo iniciou (dezembro de 2023) registou-se entre 40 a 45 (5,6%) animais confirmados com a doença.

A hipótese que se coloca é que os animais provenientes de Múrcia não tenham sido previamente expostos ao vírus ENTV-2 e no momento de contacto com o restante efetivo, contraíram a infeção, resultando num aumento considerável da incidência de casos de ANE.

Na exploração, as principais causas de morte nos animais adultos, por ordem de relevância são, mamites, hipocalcemia pós-parto e ANE, enquanto nos cabritos, a principal causa de morte são as pneumonias.

Todos os dados partilhados referentes à exploração e aos seus animais foram devidamente autorizados pelo proprietário da mesma, através do consentimento informado disponível no anexo 5.

3.3 Amostra e obtenção de dados – Parte I

O estudo foi realizado em 41 animais provenientes da exploração acima mencionada, selecionados para abate pelo produtor, por diversos motivos, tais como sinais clínicos de ANE, claudicações, mamites, caquexia, entre outras causas durante os meses de janeiro até abril de 2024.

A todos os animais, em vida, na exploração, foram realizadas três imagens termográficas, registados a presença ou ausência de sinais clínicos, e recolha de amostras de corrimento nasal,

com zaragatoa, para pesquisa viral através RT-PCR. Após a realização destes três procedimentos, os animais foram enviados para o matadouro de Huesca, onde posteriormente se procedeu à recolha das suas cabeças e entrega na unidade de anatomia patológica da faculdade de veterinária da universidade de Zaragoza. Estas foram observadas com o intuito de realizar o registo de lesões macroscópicas aquando do corte sagital da cabeça e recolha de amostra de tecido nasal, da região etmoidal para análise histopatológica. Todos estes dados podem ser observados na tabela de registo no **anexo 1**.

3.3.1 Sinais clínicos

Os animais foram observados e marcados como “positivos” à clínica de tumor, aqueles que apresentassem pelo menos um sinal clínico entre os seguintes: corrimento nasal seroso ou seromucoso em grande quantidade, exoftalmia ou alguma deformação facial ou craniana compatível com ANE.

3.3.2 Imagens termográficas

A todos os animais foram realizadas sempre três imagens termográficas com a câmara Flir E8 Pro, sempre com as mesmas definições, filtro de cor, e a mesma distância aproximada, cerca de 50 centímetros entre a câmara e a cabeça do animal (Figura 30). Estas eram realizadas durante a última ordenha dos animais, num espaço coberto, sem manipulação do animal, evitando stress e possíveis alterações de imagem causadas por ele.



Figura 30- Posicionamento do operador perante o animal para realização de termografia (Fotografia original).

3.3.3 Recolha de amostra de corrimento nasal

As amostras foram obtidas através de zaragatoas nasais flexíveis de ambas as fossas nasais de cada animal, e enviadas ao laboratório “Exopol” para realização de PCR de DNA e RT-PCR para a deteção específica de ENTV-2, de provírus e vírus livre respetivamente, utilizando o *kit* comercial *EXOone Caprine Enzootic Nasal Tumour* (Exopol, España).

A técnica de PCR de DNA foi realizada apenas em 23 dos 41 animais sendo por isso considerada para este estudo apenas os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR.



Figura 31- Recolha de amostra de secreção nasal para pesquisa viral (Fotografia original).

3.3.4 Recolha de amostra de tecido nasal

Após o abate dos animais no matadouro de Huesca, as suas cabeças foram recolhidas e levadas para o departamento de anatomia patológica da faculdade de veterinária da universidade de Zaragoza. A todas as cabeças foi realizado um corte sagital, para observação das cavidades nasais. Foram registadas as lesões macroscópicas observadas e recolheram-se amostras de tecido da região etmoidal da cavidade nasal, apresentando ou não lesão de ambas as cavidades, com o máximo cuidado para preservar a sua arquitetura anatómica. As amostras foram colocadas em pequenos frascos, devidamente identificados, contendo formol a 10% para a fixação da amostra.

3.3.5 Preparação das lâminas para estudo histopatológico

As amostras permaneciam em cassetes devidamente identificadas no interior de frascos contendo formol a 10% durante 48 horas. Posteriormente eram processadas através de um processador de tecidos por um período de cerca de 20 horas, que desidrata a amostra, ao passá-la por diferentes cubas contendo álcool entre 60 a 100 graus. Esta desidratação prepara a amostra para receber em seguida a parafina durante 2 a 3 horas para formar o molde. A sua preparação termina com a refrigeração do molde em câmara frigorífica durante 30 minutos. Para a preparação da lâmina o molde é desbastado, hidratado e cortado a uma espessura de 4 micros. Por fim é colocado na lâmina que seguirá para uma estufa a 60 graus durante 1 hora. Após a colocação de uma gota de glicerina, para o molde agarrar à lâmina, esta é corada com coloração de hematoxilina e eosina. As lâminas foram submetidas para análise histopatológica realizada pelo Professor Marcelo De Las Heras no SCRUM.

3.4 Amostra e obtenção de dados - Parte II

Para a segunda parte do estudo foram recolhidos dois animais, uma cabra identificada com o número 5152 de 3 anos de idade, e uma identificada com o número 5153, também com 3 anos de idade, provenientes exploração acima descrita e permaneceram no SCRUM entre dezembro de 2023 e maio de 2024.

Durante este período foi realizado semanalmente um exame físico direcionado para o trato respiratório que incluía a observação de corrimentos nasais, dispneia, auscultação pulmonar, reflexo da tosse entre outros achados e imagens termográficas das suas cabeças para que fosse possível avaliar se as alterações registadas nos sinais clínicos eram igualmente manifestadas por alterações nas imagens termográficas.

Os registos dos resultados dos exames físicos eram registados em folhas de registo (**anexo 2**), e as imagens termográficas guardadas (**anexo 3**), para posteriormente serem analisadas e ser possível o acompanhamento das mesmas ao longo das diferentes semanas.

4. Análise estatística e descritiva

Para a apresentação dos resultados recorreu-se ao uso de tabelas e gráficos, com os dados estatísticos antecedidos de análise. A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando-se o software SPSS 24 (Statistical Package for the Social Sciences) e o programa Microsoft Excel 18.

Para realização da análise descritiva foram utilizados diversos parâmetros para a distribuição das variáveis, nomeadamente a frequência, percentagem, média e desvio-padrão.

Para conseguir alcançar os objetivos acima descritos foi aplicado o teste da independência do Qui-Quadrado que serve para testar se duas ou mais populações, ou grupos, independentes diferem relativamente a uma determinada característica, isto é, se a frequência com que os elementos da amostra se repartem pelas classes de uma variável qualitativa é ou não aleatória (Marôco, 2014).

Para reforçar a verificação do grau de concordância entre os métodos em estudo foi aplicado o coeficiente Kappa de Cohen (Figura 32), que leva em consideração a concordância que poderia ocorrer ao acaso. Este coeficiente é uma medida estatística utilizada para avaliar a concordância entre duas avaliações, em tarefas de classificação categórica (Landis, 1997).

Valor Índice Kappa (K)	Concordância
0	Pobre
0 a 0,20	Ligeira
0,21 a 0,40	Considerável
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1	Excelente

Figura 32-Valores de concordância - Índice Kappa (MMcHugh, 2012).

5. Resultados

- **Parte I**

Análise descritiva da amostra

Dos 41 animais utilizados para o estudo verificou-se que a idade está compreendida entre 1 e 10 anos. O gráfico 1 mostra a distribuição da variável "idade" da amostra total. A frequência é representada pelo número de animais de cada idade e a linha preta sobreposta ao histograma, representa a curva de distribuição normal ajustada aos dados. As estatísticas descritivas indicam que a média da idade é 3,39 anos, com um desvio padrão de 1,935. A distribuição mostra que a maioria dos indivíduos tem idades entre 1 e 4 anos, idades que correspondem à média de aparecimento desta neoplasia descrita na bibliografia, com a maior frequência observada nos animais com 4 anos.

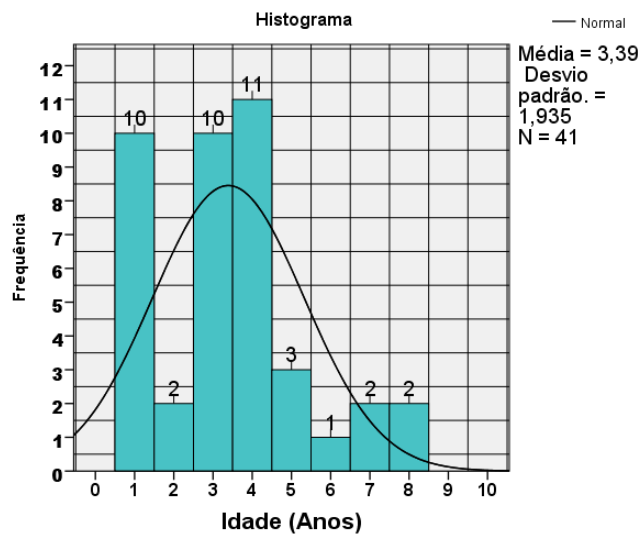


Gráfico 1- Distribuição normal da idade dos animais em estudo.

A **tabela 3** apresenta a frequência das variáveis em estudo, e a interpretação considerando a maioria dos casos para cada variável.

Tabela 3- Frequência das variáveis em estudo.

	N	%
Termografia (Método A)		
Negativo	17	41,5
Positivo	24	58,5
RT-PCR (Método B)		
Negativo	18	43,9
Positivo	23	56,1
Histopatologia (Método C)		
Negativo	26	63,4
Positivo	15	36,6
Animais		
Sem sinais clínicos	23	56,1
Com sinais clínicos	18	43,9

No Método A, termografia, a maioria dos casos (24 casos, 58,5%) foi positiva, indicando que a maioria dos indivíduos testados teve um resultado positivo para a presença de sinais detetáveis por imagem termográfica.

No Método B, que utiliza a técnica de RT-PCR, a maioria dos casos (23 casos, 56,1%) foi positiva, sugerindo que a maioria dos indivíduos estariam infectados com o vírus ENTV-2.

Na análise histopatológica, considerada o método “*gold standard*”, a maioria dos casos (26 casos, 63,4%) foi negativa, indicando que a maioria dos indivíduos não apresentou evidências histopatológicas da presença de lesões tumorais.

Em relação aos sinais clínicos característicos de ANE, a maioria dos animais (23 animais, 56,1%) não apresentou sinais clínicos indicando que estariam sãos ou numa fase inicial de infecção em que ainda não manifestam sintomas.

Na **Tabela 4** estão apresentados os resultados do cruzamento entre o método A (Termografia) e o método C (Histopatologia) utilizando o teste qui-quadrado de forma a avaliar o **objetivo específico 1**.

Tabela 4-Cruzamento do método A com o método C.

		Método A (Termografia)		Total	p
		Negativo	Positivo		
Método C (Histopatologia)	Negativo	N	17	9	26
		% Histopatologia	65,4%	34,6%	100,0%
		% (Método A)	100,0%	37,5%	63,4%
	Positivo	N	0	15	15
		% Histopatologia	0,0%	100,0%	100,0%
		% (Método A)	0,0%	62,5%	36,6%
Total	N	17	24	41	
	% Histopatologia	41,5%	58,5%	100,0%	
	% (Método A)	100,0%	100,0%	100,0%	

(p= Teste Qui-Quadrado)

Para os casos em que o método C foi positivo (15 casos, 36,6%), todos os resultados foram igualmente positivos pelo método A (62,5%). Isto revela que a termografia tem uma elevada sensibilidade (100%), pois foi capaz de detetar todos os casos positivos identificados pela histopatologia. Não houve falsos negativos, reforçando a eficácia do método A na identificação de casos positivos.

Para os casos em que a histopatologia foi negativa (26 casos, 63,4%), a maioria (17 casos, 65,4%) também foram negativos na identificação por termografia. Isto sugere que este método tem uma boa especificidade (65,4%), uma vez que todos os resultados negativos pela termografia coincidiram com os resultados negativos da histopatologia. No entanto, entre os 26 casos negativos pela histopatologia, 9 desses casos (34,6%) foram positivos pela termografia, indicando a presença de falsos positivos pelo método A. Estes falsos positivos são facilmente justificados pois, apesar da imagem ser considerada positiva, para este diagnóstico em termos clínicos seriam classificados como casos duvidosos sendo necessários avaliar a presença ou não de sinais clínicos, sugestivos de ANE, bem como da região exata do ponto de aumento de temperatura. Neste caso, estes animais não apresentavam sinais clínicos compatíveis com ANE

e a região de aumento de temperatura registada na imagem termográfica não era delimitada à região etmoidal.

Os dados revelam que o método A, termografia, possui alta sensibilidade e uma boa especificidade. Quando o método C é negativo, o método A também tende a ser negativo na maioria dos casos, embora existam alguns falsos positivos por esclarecer. Quando a histopatologia é positiva, o método A corresponde em 100% dos casos, sem falsos negativos. O valor de p inferior a 0.001 indica uma diferença estatisticamente significativa entre os métodos, destacando a confiabilidade do método A como ferramenta diagnóstica precoce no diagnóstico de ANE.

Tendo em consideração que a simples percentagem de concordância calcula apenas a proporção de vezes que os métodos concordam (método A - termografia e método C- histopatologia – “*gold standard*”), foi aplicado o coeficiente Kappa que leva em consideração a concordância que poderia ocorrer ao acaso.

Conforme apresentado na **Tabela 5**, a medida de concordância Kappa é de 0,580, com uma significância inferior a 0.001.

O valor Kappa de 0,580 sugere que a concordância observada é moderada, considerando a concordância que seria esperada ao acaso. A significância aproximada inferior a 0,001 indica que esta concordância é estatisticamente significativa, rejeitando a hipótese nula de que não há concordância entre os métodos. Além disso, o número de casos válidos utilizados na análise foi de 41, reforçando a robustez dos resultados.

Tabela 5- Medida de concordância entre o método A e o método C.

Medidas Simétricas			
(Método A - Termografia) e (Método C- Histopatologia)			
		Valor	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	0,580	0,000
Nº de Casos Válidos		41	
<i>(p= Teste kappa de Cohen)</i>			

Na **tabela 6** estão representados os dados resultantes do cruzamento entre o método B e o método C utilizando o teste qui-quadrado para avaliar o **objetivo específico 2**.

Tabela 6- Cruzamento do método B e do método C.

		Método B (RT-PCR)			p
		Negativo	Positivo	Total	
Histopatologia - Gold Standart	Negativo	N	17	9	26
		% Histopatologia	65,4%	34,6%	100,0%
		% (Método B)	94,4%	39,1%	63,4%
	Positivo	N	1	14	15
		% Histopatologia	6,7%	93,3%	100,0%
		% (Método B)	5,6%	60,9%	36,6%
Total	N	18	23	41	
	% Histopatologia	43,9%	56,1%	100,0%	
	% (Método B)	100,0%	100,0%	100,0%	

(p= Teste Qui-Quadrado)

Para os casos em que o método C foi negativo (26 casos, 63,4%), a maioria (17 casos, 65,4%) também foram negativos para o método B (RT-PCR RNA), representando 94,4% dos casos negativos pelo método B. Isto sugere que o método B tem uma boa especificidade (65,4%) o mesmo valor que o método A, uma vez que a maioria dos resultados negativos pelo método B coincidiram com os resultados negativos da histopatologia. No entanto, entre os 26 casos negativos pela histopatologia, 9 casos (34,6%) foram positivos pelo método B, indicando a presença de falsos positivos. Nesta situação estes resultados não são lineares visto que se trata de animais não doentes, pois não apresentavam ainda lesões, porém encontravam-se infetados.

Para os casos em que a histopatologia foi positiva (15 casos, 36,6%), a maioria (14 casos, 93,3%) também foram positivos pelo método de identificação viral por RT-PCR, representando 60,9% dos casos positivos por este método. Estes dados revelam a elevada sensibilidade (93,3%), que o método B apresenta, pois foi capaz de detetar a maioria dos casos positivos identificados pela histopatologia. No entanto, houve 1 caso (6,7%) negativo pelo método B, indicando a presença de falsos negativos onde cremos que a amostra tenha sido mal recolhida ou conservada e por esse motivo não foi possível detetar a presença do vírus.

Os dados revelam que o método B (RT-PCR) possui boa especificidade e sensibilidade. Quando histopatologia é negativa, o método B também tende a ser negativo na maioria dos casos. Quando a histopatologia é positiva, o método B corresponde a uma alta proporção de casos, com apenas um falso negativo. O valor de p inferior a 0,001 indica uma diferença estatisticamente significativa entre os métodos, destacando a confiabilidade do método B como ferramenta diagnóstica complementar à histopatologia.

Conforme apresentado na **Tabela 7** a medida de concordância Kappa para este cruzamento é de 0,528, sugerindo que a concordância observada é moderada entre a histopatologia e a pesquisa viral por RT-PCR. A significância inferior a 0.0001 indica que esta concordância é estatisticamente significativa, rejeitando a hipótese nula de que não há concordância entre os métodos

Tabela 7- Medida de concordância entre o método B e o método C.

Medidas Simétricas			
(Método B-RT-PCR RNA) e (Histopatologia - Gold Standart)			
		Valor	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	0,528	0,000
Nº de Casos Válidos		41	
<i>(p= Teste kappa de Cohen)</i>			

Para avaliar o **último objetivo específico**, analisou-se, os casos em que estávamos na presença de animais com imagens termográficas positivas e resultado da histopatologia negativa com o intuito de avaliar se seriam animais falsos positivos, observando ou não, a presença de sinais clínicos bem como da região do ponto de temperatura mais elevada na imagem termográfica.

Para os casos em que a histopatologia foi negativa (9 casos, 37,5%), a maioria (6 casos, 66,7%) foram positivos pelo método A, mesmo sem os animais apresentarem sinais clínicos e em todos foi identificado o vírus pelo método do RT-PCR, comprovando, desta forma que os animais estavam infectados, numa fase inicial onde possivelmente já tinham alguma inflamação nasal que aumenta a temperatura local e esta é detetada pela termografia, mesmo sem ainda apresentar sinais clínicos sugestivos, e sem desenvolver lesões, pelo que não seria possível detetar pela histopatologia e provando que a termografia conseguia bons resultados na deteção precoce.

Contudo, em 3 casos (33,3%) estes foram positivos as imagens termográficas, o vírus foi identificado pelo método RT-PCR, e os animais apresentavam sinais clínicos evidentes, porém não apresentavam lesões observadas por histopatologia. Segundo o patologista que analisou as amostras, todos apresentavam pólipos, lesões frequentes na presença deste tumor, sugerindo assim que a amostra poderá ter sido mal recolhida, impossibilitando a fiabilidade desta análise nestes 3 casos. É muito importante a correta recolha de tecido nasal para identificação de lesões quando estas não são macroscópicas, este deve ser recolhido da região mais caudal da cavidade nasal e não cranial onde muitas vezes se encontram pólipos.

- **Parte II**

Para avaliar o objetivo da segunda parte do estudo foram realizados exames físicos semanais aos animais, comparando os seus resultados com as imagens termográficas dos mesmos.

Os sinais clínicos mais relevantes do exame físico e aqueles em que se observou alterações com maior frequência estão resumidos nas tabelas 8 e 9, correspondendo aos animais 5152 e 5153 respetivamente.

✓ Animal 5152

Tabela 8- Quadro resumo dos exames físicos com foco no trato respiratório do animal 5152.

Exploração Clínica		Data											
		10/01	17/01	24/01	31/01	07/02	21/02	29/02	07/03	14/03	19/03	21/03	9/05
Secreção nasal	Unilateral												
	Bilateral	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	X
	Serosa	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
	Mucosa						x	x	x	x	x	x	X
Dispneia	Expiratória												
	Inspiratória				x	x	x	x	x	x	x	x	X
Sons do trato respiratório superior							R	R	R	R	R	R	R
Deformação cranial							Esq	Esq	Esq	Esq	Esq	Esq	Esq
Tosse	Seca			x		x	x		x				
	Produtiva												
Sons respiratórios									Sibilios	Não foi possível auscultar			
Observações				Abscesso subsolar							Golpe de calor		Necrópsia

A cabra 5152, no momento de recepção no SCRUM apresentava sinais clínicos ligeiros, secreção nasal bilateral serosa. As suas imagens termográficas revelavam um ponto de temperatura mais elevado, com coloração amarela na região etmoidal esquerda (Figura 33). Ao fim de três semanas estes sinais clínicos passaram a moderados, observando-se dispneia inspiratória e as termografias realizadas encontravam-se com alterações passando o ponto anteriormente detetado a surgir com coloração vermelha compatível com maior aumento de temperatura na região resultado de uma inflamação mais evidente.

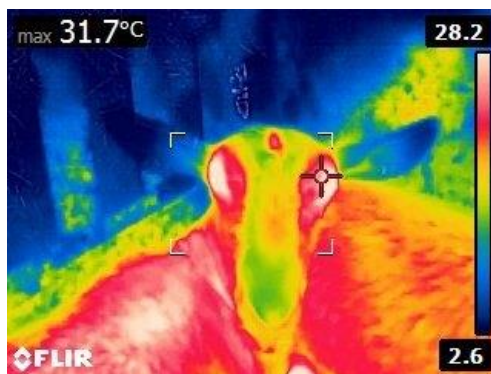


Figura 33-Termografia da cabra 5152 realizada no dia 10-01-2024 (Fotografia original).

Completando as 5 semanas da realização destes exames físicos, no dia 21 de fevereiro era possível a auscultação de roncos audíveis sem estetoscópio, uma dispneia inspiratória agravada, secreção nasal mucosa e deformação cranial do lado esquerdo. Na imagem termográfica era possível observar o ponto onde a temperatura se encontrava superior, cada vez mais extenso e evidente, com coloração vermelha e branca (Figura 34) do lado esquerdo da cavidade.

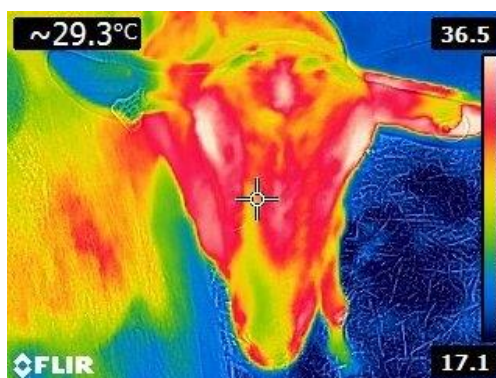


Figura 34-Termografia da cabra 5152 realizada no dia 21-02-2024 (Fotografia original).

Ao longo destas semanas, foi então possível compreender que havia concordância entre as alterações das imagens termográficas com o agravamento dos sinais clínicos apresentados pelo animal.

O animal foi sacrificado no dia 9 de maio onde, em necropsia, foi verificada a presença de lesão macroscópica compatível com ANE (Figura 35) e confirmada posteriormente por análise histopatológica (Figura 36).



Figura 35-Lesão observada em necropsia compatível com ANE na cabra 5152 (SCRUM).

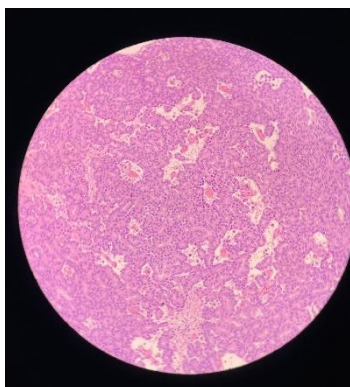


Figura 36-Observação histopatológica de ANE na cabra 5152 onde são observadas células formando acinos característicos desta neoplasia (SCRUM).

✓ Animal 5153

A cabra 5153 não apresentava sinais clínicos no momento da chegada ao SCRUM e foi recebida com o intuito de estudar a evolução da doença caso esta fosse transmitida por estar na presença de outro animal com suspeita de ANE, a cabra 5152. As primeiras imagens termográficas não apresentavam qualquer suspeita de lesão (Figura 37), eram imagens compatíveis com um animal saudável.



Figura 37-Termografia da cabra 5153 realizada no dia 10-01-2024 compatível com um animal saudável (Fotografia original).

Ao longo do tempo foram surgindo sinais clínicos ligeiros (**Tabela 9**) como secreção nasal serosa unilateral direita, e uma tosse seca registada apenas em duas semanas que foram coincidentes também alterações termográficas.

Tabela 9. Quadro resumo dos exames físicos com foco no trato respiratório do animal 5153.

Exploração Clínica		Data										
		10/01	17/01	24/01	31/01	07/02	21/02	29/02	07/03	14/03	21/03	9/05
Secreção nasal	Unilateral				X (Direito)	x	x	x	X			
	Bilateral									X	X	x
	Serosa			X	X	X	x	x	x			
	Mucosa									x	x	x
Dispneia	Expiratória											
	Inspiratória											
Sons respiratórios												
Deformação craneal												
Tosse	Seca					X	X					
	Productiva											
Sons respiratórios												
<u>Observações</u>						Mamite (teto esquerdo)	TC					Necrópsia

A 31 de janeiro surge um ponto de temperatura mais elevado (amarelo) na região do etmoide e a 7 de fevereiro a termografia volta a revelar um ponto de temperatura mais elevada na mesma região, porém desta vez com uma temperatura superior surgindo a coloração vermelha do lado esquerdo do animal (Figura 38).

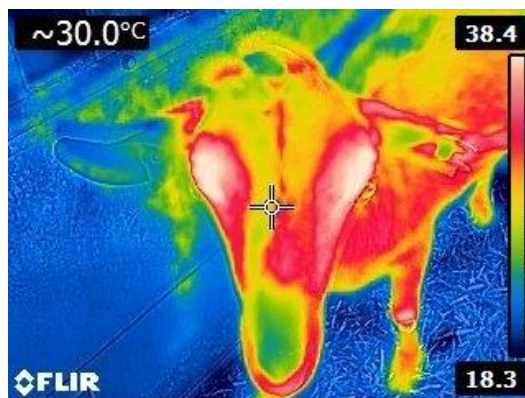


Figura 38-Termografia da cabra 5153 realizada no dia 07-02-2024 (Fotografia original).

Até então não tinha surgido qualquer alteração, o que fez suspeitar da presença de lesão nessa mesma região. Surgiu a oportunidade no dia 21 de fevereiro de realizar uma TC (Figura 39), um outro meio de diagnóstico possível de identificar lesões de ANE ainda que de muito difícil acesso a estes animais. Para a realização deste exame realizou-se uma sedação combinada com medetomidina na dose de 4 µg/Kg IM com buprenorfina na dose de 0,2mg/Kg IM. A indução realizou-se com propofol via IV na dose de 1-2mg/Kg e a manutenção da anestesia realizada com isoflurano 2-3%. Foi também aplicado contraste via endovenosa para melhor visualização das estruturas na dose de 2ml/Kg.

Este método diagnóstico não revelou a presença de qualquer lesão, apenas a presença de um pouco de muco na cavidade nasal direita do animal.



Figura 39-TC realizada à cabra 5153 para pesquisa de lesões de ANE (Fotografia original).

No dia 14 de março a secreção nasal passa a bilateral e com a sua consistência mucosa, como permanecia a suspeita de que o animal poderia estar infetado com ANE foi realizada uma recolha

de amostra de corrimento nasal de ambas as narinas e enviado ao laboratório para pesquisa viral por RT-PCR, cujo resultado foi positivo e encontra-se no anexo 4. O animal foi eutanasiado a 9 de maio, foi observada a sua cavidade nasal e recolha de amostra de tecido da região etmoidal da cavidade nasal.

Em necropsia não foram observadas quaisquer lesões macroscópicas compatíveis com ANE (Figura 40) apenas a presença de larvas de *Oestrus ovis* uma das doenças correspondentes ao diagnóstico diferencial de ANE.



Figura 40-Ausência de lesões macroscópicas compatíveis com ANE na cavidade nasal da cabra 5153 (SCRUM).

6. Discussão

Na primeira parte do estudo os resultados indicam que tanto o método A (Termografia) quanto o método B (RT-PCR) são ferramentas diagnósticas complementares eficazes na detecção de ANE, apresentando uma boa concordância com a análise histopatológica, considerada o método “*gold standard*”.

A pesquisa viral por PCR de DNA que necessita de células tumorais para identificar o vírus é o método atualmente utilizado para diagnóstico precoce de ENTV-2, e foi por isso realizado ao primeiro grupo de animais (n=23) desta amostra, porém assim que foram obtidos os primeiros resultados entendeu-se que esta técnica não seria a mais indicada. Concluiu-se que em lesões tumorais de pequenas dimensões não seria possível alcançá-las com zaragatoa, não obtendo desta forma células tumorais e conduzindo a falsos negativos. A movimentação da cabeça que os animais realizam no momento de introdução da zaragatoa impede, muitas vezes alcançar a região mais caudal da cavidade nasal, região onde se inicia o desenvolvimento da neoplasia.

Deste modo realizámos pesquisa de vírus livre na secreção nasal através do método de RT-PCR que foi realizado ao total de animais em estudo.

O método A apresentou uma boa sensibilidade (100%), pois conseguiu detetar a maioria dos casos positivos identificados pela histopatologia, embora tenha apresentado alguns falsos negativos. Situações destas, ocorrem quando não há desenvolvimento de lesões, ou estas apresentam um tamanho muito reduzido e por este motivo não há inflamação associada, não ocorrendo um aumento de temperatura e não sendo, por isso, detetadas alterações na imagem termográfica.

A especificidade apresentada por este método foi elevada (65,4%), identificando corretamente a maioria dos casos negativos conforme a histopatologia. É um método com custos reduzidos, de fácil aplicação, que não exige muita logística, no entanto a sua interpretação deve ser cuidadosa, motivo pelo qual houve alguns falsos positivos. Este método pode detetar aumentos de temperatura que não sejam responsáveis pelo crescimento tumoral mas sim por outras doenças que fazem parte do diagnóstico diferencial de ANE ou até mesmo resultantes de trauma. Por este motivo, a interpretação da termografia deve ter em conta a presença ou não de sinais clínicos do animal, a localização do ponto de temperatura mais elevado, que surge na imagem bem como fatores externos que possam inviabilizar a utilização deste método como a exposição solar direta. O valor preditivo positivo deste método foi de 62,5% e o valor preditivo negativo de 100%.

A câmara termográfica tem um custo variável entre os 600€ e 3000€ sendo o modelo utilizado neste estudo com um valor de cerca de 2000€, este valor é diluído pelo número de animais a realizar as imagens termográficas, e no presente estudo considerando os cerca de 800 animais na exploração rondaria os 2,5€ por animal, não esquecendo que é um equipamento que tem apenas um investimento inicial, apesar das necessárias calibrações, e que poderá ser utilizado ao longo de vários anos em diferentes animais. Porém apesar do seu baixo custo, necessita de mais estudos para detalhar bem as variáveis da sua interpretação.

Em suma, o método A, apesar de necessitar de uma interpretação rigorosa é um ótimo método para ser utilizado na deteção precoce de ANE, económico e fácil de utilizar.

O método B, RT-PCR RNA, também apresentou boa especificidade (65,4%), com a maioria dos resultados negativos coincidindo com os resultados da histopatologia. Quanto à sensibilidade apesar de apresentar bons resultados (93,3%) detetando a maioria dos casos positivos conforme a análise histopatológica, estes são inferiores quando comparados com o valor de sensibilidade do método A (100%). Ainda assim os dados indicam que o método B é uma ferramenta confiável na deteção do vírus associado a etiologia de ANE, porém, como qualquer método diagnóstico, não é isento de limitações e por este motivo apresentou alguns falsos positivos e também alguns falsos negativos.

O valor preditivo positivo deste método foi de 60,9% e o valor preditivo negativo de 94,4%. Apesar de ser um método que numa fase mais inicial possa ter alguma vantagem perante o método A, a sua exigência técnica, logística e de maneo, principalmente em grandes efetivos, bem como o custo dispendioso a ele associado, cerca de 12€ por animal, gera grandes dificuldades de execução.

Ambos os métodos demonstraram uma concordância estatisticamente significativa com a histopatologia, que apesar de ser considerado o método "*gold standard*" apresenta como desvantagem o facto de ser apenas utilizado após o sacrifício dos animais. Este trabalho torna-se então, cientificamente relevante pois são necessários estudos a fim de encontrar um método *ante-mortem* que possa ser utilizado para auxílio da deteção precoce desta neoplasia.

Estes resultados sugerem que ambos os métodos são válidos e úteis na prática clínica. A análise estatística, incluindo o coeficiente Kappa, revelou uma concordância moderada entre os métodos de diagnóstico em estudo e a histopatologia, reforçando a robustez dos resultados e a sua aplicabilidade na identificação de tumores.

Quanto à segunda parte do estudo, os resultados demonstraram que as alterações das imagens termográficas acompanham as alterações visíveis nos sinais clínicos.

A cabra 5152 apresentou alterações termográficas concordantes com as alterações nos seus sinais clínicos. Numa fase inicial, com sinais clínicos considerados ligeiros, apresentava secreção nasal serosa bilateral e a sua termografia revelava um ponto de temperatura mais elevado com coloração amarela. À medida que estes sinais se tornavam mais evidentes, apresentando dispneia, alterações na consistência da secreção nasal e roncos audíveis sem estetoscópio as suas termografias já revelavam temperaturas mais elevadas surgindo colorações vermelhas e brancas na região mais caudal da cavidade nasal, região correspondente à zona etmoidal onde surge esta neoplasia.

Apesar de não ter sido contabilizada a quantidade de corrimento nasal libertado com o passar dos dias, era visivelmente mais abundante e a dispneia cada vez mais severa.

Estas alterações comprovaram que a termografia manifestou alterações concordantes com as alterações observadas nos sinais clínicos e sugerindo a capacidade que este método têm de expor estas alterações.

Quanto à cabra 5153 apesar de haver imagens termográficas que revelam alterações, concordantes com os sinais clínicos, e do animal se encontrar infetado, confirmado por pesquisa viral por RT-PCR, em necropsia o diagnóstico de ANE não pôde ser confirmado pois este animal não apresentava lesões macroscópicas da neoplasia. No momento da necropsia o diagnóstico confirmado foi de Oestrose não sendo possível concluir a eficácia da termografia neste caso. Consideramos que apesar do resultado da análise de PCR ser positiva a alteração da temperatura detetada na termografia dever-se-ia à inflamação causada pela irritação nasal na

presença das larvas e não resultante de alguma inflamação tecidual resultante do crescimento tumoral.

Em síntese, os dados sugerem que a termografia e a pesquisa viral por RT-PCR são ferramentas valiosas para a detecção desta neoplasia, oferecendo uma boa combinação de especificidade e sensibilidade, sendo o método A o que apresenta sensibilidade superior.

Serão necessários mais estudos para uma correta utilização da termografia como único método *ante-mortem* a ser utilizado para este diagnóstico. Por enquanto, a análise estatística sublinha a importância da utilização conjunta do método A e B para que se possa melhorar a precisão diagnóstica, proporcionando uma abordagem mais abrangente e confiável para a detecção e monitorização de ANE. Este diagnóstico combinado apresenta um custo mais elevado do que utilizando apenas a termografia, porém, possivelmente compensará sempre o valor do animal.

7. Conclusão

A termografia, é um método de diagnóstico não invasivo, inovador, económico, e de fácil utilização, que apresenta múltiplos benefícios e utilidades, que permitem contribuir para uma melhor avaliação clínica dos animais sem lhes provocar stress.

Uma das vantagens da utilização de imagens termográficas é o auxílio na perceção e localização de lesões teciduais, evidenciando o comprometimento dos mesmos. Na reação inflamatória o calor é um dos sinais que indicam a presença deste processo, que surge mesmo antes dos sinais clínicos mais comuns e é este aumento de temperatura que é detetado com a câmara termográfica. Contudo é de salientar, que por este motivo, a maior desvantagem são os diversos fatores que podem conduzir à alteração de temperatura influenciando o resultado deste método como a exposição solar direta, a espessura da pele, entre outros.

Esta dissertação permitiu recolher informação sobre a utilização da termografia na tentativa de avaliar a sua eficácia e fiabilidade e, com base no estudo realizado, conclui-se que a utilização de imagens termográficas para além de, ser um bom método de diagnóstico de doenças do trato respiratório superior de pequenos ruminantes, pode ser um bom método de diagnóstico precoce de ANE quando correlacionado com a sintomatologia apresentada. Contudo são necessários mais estudos utilizando este método para padronizar a sua interpretação e torná-la mais rigorosa.

O presente trabalho apresentou como principal limitação a escassez de bibliografia e estudos prévios sobre o tema.

Considerando o conceito, tão atualmente abordado de “*One Health*” é crucial, visto tratar-se de um vírus do trato respiratório com transmissão por via direta, avaliar o seu potencial zoonótico.

Abordando as diversas possibilidades do uso da termografia como meio auxiliar no diagnóstico na medicina veterinária, acredita-se que o tema tenha potencial para serem realizados mais estudos e pesquisas que culminarão em avanços positivos.

Resultados de futuros trabalhos nesta área poderão ser comparados com os resultados obtidos neste estudo, permitindo uma avaliação estatística na evolução da utilização do método no diagnóstico precoce desta neoplasia e deste modo minimizar as perdas económicas que esta causa aos produtores de pequenos ruminantes.

Bibliografía

- Alsafy Samir, A., El-Gendy, & Rutland, C. (2022). Updates on Veterinary Anatomy and Physiology. Em M. A.M, A. Alsafy Samir, El-Gendy, & C. Rutland, *Anatomical Guide to the Paranasal Sinuses of Domestic Animals*.
- Alberto, A., Murgia, C., Liu, S., Mura, M., Cousens, C., Sharp, S., Palmarini, M. (2022). Envelope-Induced Cell Transformation by Ovine Betaretroviruses. *Envelope-Induced Cell Transformation by Ovine Betaretroviruses*, p. 8.
- Awaad, A., Maksoud, M., & Fathy, M. (13 de Fevereiro de 2019). Surgical anatomy of the nasal and paranasal sinuses in Egyptian native sheep (*Ovis aries*) using computed tomography and cross . *Surgical anatomy of the nasal and paranasal sinuses in Egyptian native sheep (Ovis aries) using computed tomography and cross* , p. 11.
- Aznar, I. R. (2017). *Valoración de técnicas de diagnóstico y estudio de posibles tratamientos de la rinitis crónica proliferativa en el ganado ovino*. Zaragoza.
- Barrios, A., Quinteiro, P., & Salazar, I. (Setembro de 2014). The nasal cavity of the sheep and its olfactory sensory epithelium. *The nasal cavity of the sheep and its olfactory sensory epithelium*.
- Carmo, P., Uzal, F., Pedroso, P., & Riet-Correa, F. (2020). Conidiobolomycosis, cryptococcosis, and aspergillosis in sheep and goats: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 826-834.
- Carmo, P., Uzal, F., & Riet-Correa, F. (2021). Diseases caused by *Pythium insidiosum* in sheep and goats: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20-24.
- Castells, E., Iacasta, D., Climent, M., Pérez, M., Sanromán, F., Jiménez, C., & Ferrer, L. (29 de Julho de 2019). Diagnostic imaging techniques of the respiratory tract of sheep. *Diagnostic imaging techniques of the respiratory tract of sheep*, pp. 112-126.
- Cetinkaya, M,A.& Demirutku,A. (2012). *Thermography in the assessment of equine lameness*. Turk J Vet AnimSci 36(1): pp. 43-48.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L., & Hayirli, A. (2008). Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91, 4244-4248.
- Davies, R. H., Evans, J., Chappell, S., Jones, E., & Preece, B. (2001). Increase in *Salmonella entericasubspecies diarizonaeserovar 61:k:l,5,(7)* in sheep. *VetRecord*, 555-557.
- De las Heras, M., García de Jalón, J. A., Balaguer, J., & Badiola, J. (1988). *Retrovirus-like particles in enzootic intranasal tumours in Spanish goats*.
- De las Heras, M., García de Jalón, J., & Sharp, J. (1991). Pathology of enzootic intranasal tumor in thirty-eight goats. *Veterinary Pathology* 28, 474-481.
- De las Heras, M., G. d., Minguijón, E., Gray, E., Dewar, P., & Sharp, J. (1995). Experimental transmission of enzootic intranasal tumors of goats. *Veterinary Pathology* 32, 19-23.
- De las Heras, M., Minguijón, E., Ferrer, L., Dewar, P., Cebrian, L., Pascual, Z., . . . Sharp, J. (1998). Naturally occurring enzootic nasal tumor of sheep in Spain: pathology and associated retrovirus. *Eur.J.VET.Pathol* 4, 11-15.

- De las Heras, M., Ortín, A., Cousens, C., Minguijón, E., & Sharp, J. (2003). Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. *Jaagsiekte Sheep Retrovirus and Lung Cancer. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 201-223.
- De las Heras, M., Ortín, A., Borobia, M., & Navarro, T. (2019). Enzootic nasal adenocarcinoma in sheep: an update. *Small Ruminant Research*, 131-134.
- De las Heras, M., Sharp, J., Ferrer, L., Garcia, J., & Cebrian, L. (s.d.). Evidence for a type D- like retrovirus. *Evidence for a type D- like retrovirus*, pp. 132-441.
- Dellmann, H. (1980). Respiratory System. Em H. Dellmann, & E. Brown, *Veterinary Histology* (pp. 201-205). Acribia.
- Dinter, Z., & Morein, B. (1990). *Virus infections of ruminants*. Amesterdão: Elsevier.
- Dyce, K., Sack, W., & Wensig, C. (2002). *Veterinary Anatomy*. Saunders.
- El Sissi, M., El shafey, A., Ali, A., & Allam, M. (2017). Endoscopic Sinus and Nasal Surgery Training Using Sheep as Animal. *Egyptian Journal of Anatomy*, 381-390.
- Fernández, M., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Espinosa, J., Menéndez, J., . . . Ferreras, M. (2021). Pathological Study of Facial Eczema (Pithomycototoxicosis) in Sheep. *Animals* , 1070.
- Ferrer, L., García de Jalón, J., & De lasHeras, M. (2002). Atlas de Patología ovina. 184-187.
- Ferrer, L. (21 de Setembro de 2018). Diagnóstico diferencial de la patología respiratoria en ovinos y caprinos . *Diagnóstico diferencial de la patología respiratoria en ovinos y caprinos* , pp. 19-21.
- Ferrer, L., Ramos, J., Castells, E., Ruíz, H., Climent, M., & Lacasta, D. (29 de Maio de 2020). Use of Computed Tomography and Thermography for the Diagnosis of Respiratory Disorders in Adult Sheep. *Use of Computed Tomography and Thermography for the Diagnosis of Respiratory Disorders in Adult Sheep*, pp. 2-11.
- Figueiredo, T.; Dzyekanshi, B.; Kunz, J.; Silveira, AB.; Ramos, C.M.G; Michelotto, J. (2012) *A importância do exame termográfico na avaliação do aparato locomotor em equinos atletas*. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 2012;9(18). Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/eLE4dfglj6RTrB2_2013_-6-25-17-23-40.pdf. ISSN: 1679-7353.
- Ganganaik, S., Jaiw, R. K., & Pawan, K. (28 de Abril de 2004). Ganganaik, S.; Jaiw, R. K.; Pawan, K. *Gross anatomy of the nasal cavity in sheep (Ovis aries)*, p. 4.
- Gracia, M., Ruíz de Arcaute, M., Ferrer, L., Ramo, M., Jiménez, & Figueras, L. (2019). Oestrosis: Parasitism by Oestrus Ovis». *Small Ruminant Research* 181. 91-98.
- Henriques, J. (28 de Dezembro de 2022). Imagiologia em Oncologia: Raios-X, Ecografia e Tomografia Axial Computorizada. *Imagiologia em Oncologia: Raios-X, Ecografia e Tomografia Axial Computorizada*.
- Horvath, L., Kraft, M., Fostiropoulos, K., Falkowski, A., & Tarr, P. (2016). Salmonella enterica subspecies diarizonae maxillary sinusitis in a snake handler: first report. *Salmonella enterica subspecies diarizonae maxillary sinusitis in a snake handler: first report*.
- Hunter, E. (2008). Retroviruses: General Features. Em B. Mahy, & M. Regenmortel, *Encyclopedia of virology, Third Edition* (pp. 459-467). Academic Press.

- Kahwa, C., & Purton, M. (29 de Agosto de 1995). Histological and histochemical study of epithelial lining of the respiratory tract in adult goats . *Histological and histochemical study of epithelial lining of the respiratory tract in adult goats* , p. 6.
- Kia'i, N., & Bajaj, T. (15 de Maio de 2019). Histology, Respiratory Epithelium. *Histology, Respiratory Epithelium*, p. 2.
- Lacasta, D. (s.d.). Diagnóstico diferencial de patología de vías altas en ganado ovino adulto. *Ecuphar, An Animalcare company*, 1-5.
- Lacasta, D., Ferrer, M. L., Ramos, J., Bueso, J. P., Boborbia, M., Ruiz de Arcaute, M., . . . De las Herreras, M. (2012). Chronic Proliferative Rhinitis Associated with Salmonella enterica Subspecies Diarizonae in Sheep in Spain. *Journal of Comparative Pathology*, 72.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174. <https://doi.org/10.2307/2529310>
- Leroux, C., & Mornex, J. (2008). Small Ruminant Research 76. *Retroviral infections in sheep and the associated diseases*, pp. 68-76.
- Liebich, H. (2019). Respiratory system. Em H. Liebich, *Veterinary Histology of domestic mammals and birds* (pp. 239-243). 5mPublishing.
- Ling-xu, L., Ying-jun, L., Qing-yong, G., Liao, Y., Gue, Y., Su, Z., . . . Yang, D. (11 de Março de 2022). Radiography, CT, and MRI Diagnosis of Enzootic Nasal Tumor in Goats Infected With Enzootic Nasal Tumor Virus. *Radiography, CT, and MRI Diagnosis of Enzootic Nasal Tumor in Goats Infected With Enzootic Nasal Tumor Virus*, pp. 8.
- Lopez-Tamayo, S., Rubira, I., De las Heras, M., Castells, E., & Lacasta, D. (2020). Use of thermography for the diagnosis of chronic proliferative rhinitis in sheep and its application in the differential diagnosis of the first case affecting. *Veterinary Record Case Reports*, 1-3.
- Marôco, J. (2014). *Análise Estatística: Com o SPSS Statistics* (6ª ed.). Lisboa: ReportNumber. ISBN 978-989-96763-4-3.
- McHugh, M. L. (2012). *Interrater Reliability: The Kappa Statistic*. *Biochemia Medica*, 22, 276-282. <https://hrcak.srce.hr/89395> <https://doi.org/10.11613/BM.2012.031>.
- McCafferty, D. (14 de Setembro de 2007). *The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions*. Obtido de *Mammal Review* 37: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00111.x>.
- Nierbele, K. (1940). *Über endemischen Krebs im Siebbein von Schafen*. *Krebsforsch* .
- Nisole, S., & Saib, A. (14 de Maio de 2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Early steps of retrovirus replicative cycle*, p. 20.
- Ortín, A., Cousens, C., Minguijo, E., Pascual, Z., Villarreal, M., Sharp, J., & De las Heras, M. (28 de Janeiro de 2003). Characterization of enzootic nasal tumour virus of goats: complete sequence and tissue distribution. *Characterization of enzootic nasal tumour virus of goats: complete sequence and tissue distribution*, p. 8.
- Ortiz, A., & Rodriguez, A. (2004). *Tratado de Histología Veterinaria*. Espanha: Masson.
- Özmen, O., Şahinduran, S., Haligur, M., & Demir, N. (2010). Clinical, Pathological, Immunohistochemical and Ultrastructural, observations on Enzootic Nasal

- Adenocarcinoma in Five Goats. *Clinical, Pathological, Immunohistochemical and Ultrastructural observations on Enzootic Nasal Adenocarcinoma in Five Goats*, pp. 1-7.
- Palmarini, M., & Fan, H. (2003). Molecular biology of Jaagsiekte sheep retrovirus. *Molecular biology of Jaagsiekte sheep retrovirus*, pp. 81-115.
- Pérez, M., Otero, L., Villamandos, J. C., Landero, J., & García, E. (2004). Aparato respiratorio. Em A. Ortiz, & A. Rodríguez, *Tratado de histología veterinaria* (pp. 301-303). Espanha: Masson.
- Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yanmaz, L. E., Oral, H., Bastan, A., . . . Hayirli, A. (2 de Agosto de 2018). *Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy*. Obtido de Journal of Dairy Science: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00370-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00370-X/fulltext)
- Puertas, T. V. (2021). *Revisión bibliográfica sobre las enfermedades caquetizantes en ganado ovino*. Saragoça.
- Quintas, H. (2012). Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes. Em H. Quintas, *Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes* (p. 9). Bragança.
- Quintas, H., Lacasta, D., & Ferrer, L. (2022). *Differential diagnosis in sheep*. Zaragoza: Dr. Herriot.
- Quinteiro, P. (19 de Fevereiro de 2022). *The Shape of the Nasal Cavity and Adaptations to Sniffing in the Dog (Canis familiaris) Compared to Other Domesticated Mammals: A Review Article*, p. 5.
- Redaelli, V.; Bergero, D.; Zucca, E. et al., *Uso da termografia infravermelha na pecuária de precisão* 109 of Thermography Techniques in Equines: Principles and Applications. Journal of Equine Veterinary Science, p.1-6, 2013.
- Ramos, J. J., & Ferrer, L. (2007). Exploración del aparato respiratorio. Em J. J. Ramos, & L. Ferrer, *La exploración clínica del ganado ovino y su entorno* (pp. 123-129). Zaragoza: Servet.
- Ramos, J., & Ferrer, L. (2007). Procedimientos complementares del aparato respiratório. Em J. Ramos, & L. Ferrer, *La exploración clínica del ganado ovino y su entorno* (pp. 145-146). Zaragoza: SERVET.
- Rodrigues, P. R. (2003). *Medicina de ovinos e caprinos*. Canoas, Brasil.
- Rodrigues, P. R. (2005). *Medicina de ovinos e caprinos*. 31-33.
- Rosati, S., Kwang, J., Rutili, O., Rossi, S., & Vitellozi, G. (1995). Antibody response during experimental and natural cases of enzootic nasal tumor in goats. *Veterinary Record* 137, 465-466.
- Rubira, I., Figueras, L., De las Heras, M., Bueso, J., Castells, E., Climent, M., & Lacasta, D. (2019). Chronic proliferative rhinitis in sheep: An update. *Small Ruminant Research* 1797, pp. 21-25.
- Rubira, I., Figueras, L., Jiménez, J. A., Ventura, J., & Lacasta, D. (2021). *Salmonella enterica subsp. diarizonae Serotype 61:k:1:5:(7) a Host Adapted to Sheep*. Intech Open.
- Ryff, J., & Browne, J. (1952). Paracolon abortion in ewes. *Vet med association* 121, 266-267.
- Schaefer, A., Cook, N., Tessaro, S., Deregts, D., Desroches, G., Dubeski, P., . . . Godson, D. (2004). Early detection and prediction of infection using infrared thermography. *Canadian Journal of Animal Science* 84, 73-80.

- Schröter, M., Roggentin, P., Hofmann, J., Speicher, A., Laufs, R., & Mack, D. (Janeiro de 2004). Pet Snakes as a Reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): A Prospective Study. *Pet Snakes as a Reservoir for Salmonella enterica subsp. diarizonae (Serogroup IIIb): A Prospective Study*, pp. 613-615.
- Scott, P. R. (2015). *Sheep Medicine*. United Kingdom: CRS Press.
- Sharp, J., & De las Heras, M. (2000). *Contagious respiratory tumors. Diseases of sheep*. Oxford: Blackwell Science.
- Simth, M. (15 de Abril de 2024). Polymerase Chain Reaction (PCR). *National Human Genome Resarch Institute*.
- Simth, M., & Sherman, D. (2009). Examination of the head. Em M. Simth, & D. Sherman, *Goat Medicine* (p. 16). USA: Willey-Blackwell.
- Simth, M., & Sherman, D. (2023). Respiratory System. Em M. Simth, & D. Sherman, *Goat Medicine third edition* (pp. 389-422). Wiley Blackwell.
- Smith, M., & Sherman, D. (2023). Respiratory System. Em T. E. *Goat Medicine, Smith, M.; Sherman, D.* (pp. 390-422). Wiley Blackwell.
- Stokar-Regenscheit, N., Overesch, G., Giezendanner, R., Roos, S., & Gurtner, C. (2017). *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) associated with chronic proliferative rhinitis and high nasal colonization rates in a flock of Texel sheep in Switzerland. Em N. Stokar-Regenscheit, G. Overesch, R. Giezendanner, S. Roos, & C. Gurtner, *Preventive Veterinary Medicine* (pp. 78-82). El Sevier.
- Švara, T., Gombač, M., Vrecl, M., Juntos, P., & Pogačnik, M. (2006). Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep . *The Scientific Journal of the Veterinary Faculty University of Ljubljana*, 7-11.
- Ubiali, D., Pereira, A., Boabaid, F., Dutra, V., Nakazato, L., Campos, C., . . . Riet-Correa, F. (5 de Dezembro de 2021). Successful potassium iodide treatment for rhinofacial pythiosis in sheep. *Successful potassium iodide treatment for rhinofacial pythiosis in sheep*, p. 7.
- Walsh, S., Stinson, K., Menzies, P., & Wootton, S. (14 de Maio de 2014). Development of an ante-mortem diagnostic test for enzootic nasal tumor virus and detection of neutralizing antibodies in host serum. *Development of an ante-mortem diagnostic test for enzootic nasal tumor virus and detection of neutralizing antibodies in host serum*, pp. 1843-1853.
- Yomechi, H., Ohgi, T., Fujimoto, Y., Okada, K., Onuma, M., & Mikami, T. (1978). Intranasal tumor of the ethmoid olfactory mucosa in sheep. *American Journal Veterinary Reshearch*, 1599-1606.
- Zúñiga, A. (2010). *Estudio sobre la infección y transmisión del retrovirus ovino de Jaagsiekte en un rebaño ovino afectado de adenocarcinoma pulmonar ovino*. Zaragoza.

Anexo 1.

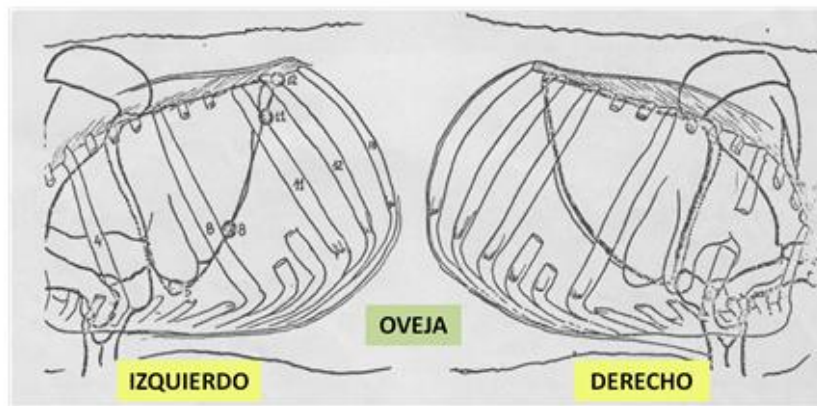
CROTAL	FECHA NACIMIENTO	Edad (Años)	RAZA	SEXO	ORIGEN	PROCEDENCIA	CLINICA TUMOR	NE FOTO	USO DE BAL	TERMO-REFORMACION	MACROSC	MECRO	PCR DNA	RMA- Método B	Logia- Golt- Obs- Histo
EST13000023018	23/08/2016	7	Murciense	MUJER	COMPA	EST1300000107	1	84328	TUMOR	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005192	06/07/2015	5	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	85236	AMITIS CRÓNIC	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005184	06/07/2015	4	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	84703	COJA	2	NO	NO	Negativo	Meg	Part
EST17000005334	07/07/2015	3	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	30358	AMITIS CRÓNIC	0	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005334	07/07/2015	3	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	30342	AMITIS CRÓNIC	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005338	15/08/2015	3	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	85346	PROLAPSO	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005338	15/08/2015	3	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	85404	AMITIS CRÓNIC	2	NO	NO	Negativo	Pos	Part
EST17000005338	15/08/2015	3	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	30524	AMITIS CRÓNIC	2	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005350	16/08/2012	2	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	30144	AMITIS CRÓNIC	0	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005350	16/08/2012	2	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	30703	AMITIS CRÓNIC	2	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005351	17/01/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	3150	TUMOR	2	NO	IZO	Negativo	Pos	Part
EST17000005358	28/06/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	85814	TUMOR	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005358	28/06/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	84524	TUMOR	2	IZO	IZO	Positivo (cq3)	Pos	Part
EST17000005358	22/06/2015	5	Murciense	HACHO	REPOSICION	EST1700000041	1	101653	HUY DELGADO	2	NO	BILATERAL	Negativo	Pos	Part
EST17000005358	28/06/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	102932	TUMOR	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005358	15/07/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	102001	TUMOR	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005359	23/07/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	101855	TUMOR	0	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005359	15/07/2013	1	Murciense	HACHO	REPOSICION	EST1700000041	0	104446	HUY DELGADO	2	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005359	16/07/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	102205	TUMOR	2	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005131	25/02/2011	4	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	85642	TUMOR	2	NO	BILATERAL	Zanarobal	Positivo (cq3)	Part
EST17000005135	05/05/2011	4	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	85055	AMITIS CRÓNIC	0	NO	NO	Negativo	Pos	Neq
EST17000005154	11/07/2011	4	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	0	30824	AMITIS CRÓNIC	0	NO	NO	Negativo	Meg	Neq
EST17000005157	24/08/2011	4	Murciense	MUJER	REPOSICION	EST1700000041	1	84919	TUMOR	2	NO	BILATERAL	Negativo	Pos	Part
EST17000005183	27/02/2011	4	Murciense	MUJER	REPOSICION		1	11-12-13	TUMOR	2	NO	DRCH	0	Pos	Part
EST17000005338	01/06/2011	3	Murciense	MUJER	REPOSICION		1	2.1-2.2-2.3	TUMOR	2	NO	IZO	0	Pos	Part
EST17000005140	29/02/2011	3	Murciense	HACHO	REPOSICION		0	3.1-3.2-3.3	COJERA	0	NO	NO	0	Meg	Meg
EST17000007356	28/04/2017	7	Murciense	HACHO	REPOSICION		0	4.1-4.2-4.3	COJERA	0	NO	IZO??	0	Meg	Meg
EST17000005350	24/01/2013	1	Murciense	MUJER	REPOSICION		1	5.1-5.2-5.3	TUMOR	2	NO	IZO	0	Pos	Part
EST17000005173	05/08/2011	4	Murciense	MUJER	REPOSICION		1	6.1-6.2-6.3	TUMOR	2	NO	DRCH	0	Pos	Part
EST17000005170	04/02/2011	4	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		0	1.1/1.2/1.3	CAE	2	NO	DRCH	0	Pos	Part
EST17000005145	22/02/2011	3	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		1	2.1	TUMOR	2	NO	NO	0	Meg	Meg
EST17000008353	21/07/2011	5	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		1	4.1/4.2/4.3	TUMOR	2	NO	NO	0	Pos	Part
EST17000005338	23/08/2011	3	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		1	5.1/5.2/5.3	TUMOR	2	IZO	Bilateral	0	Pos	Part
EST17000005166	04/02/2011	4	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		0	6.1/6.2/6.3	MAMITIS	2	NO	IZO	0	Pos	Part
EST13000023016	04/02/2016	3	HUCIARRA	MUJER	COMPA		0	8.1/8.2/8.3	COJA	2	NO	NO	0	Meg	Meg
EST17000005194	15/02/2015	5	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		1	9.1/9.2/9.3	TUMOR	2	NO	DRCH	0	Pos	Meg
EST17000005350	11/02/2013	1	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		0	10.1/10.2/10.3	MUY DELGADO	0	NO	NO	0	Meg	Meg
EST13000023016	04/02/2016	3	HUCIARRA	MUJER	COMPA		0	11.1/11.2/11.3	NO PREÑA	0	NO	NO	0	Meg	Meg
EST17000005338	23/07/2011	3	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		0	12.1/12.2/12.3	MAMITIS	0	IZO	NO	0	Meg	Meg
EST17000005123	15/08/2011	4	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		0	13.1/13.2/13.3	RESPIRATORI	2	NO	NO	0	Pos	Meg
EST17000005133	15/05/2011	4	HUCIARRA	MUJER	REPOSICION		1	14.1	TUMOR	2	NO	IZO	0	Meg	Meg

Anexo 2.

FICHA EXPLORACIÓN CLÍNICA APARATO RESPIRATORIO

Fecha: _____ Nº oveja: _____
Condición Corporal: _____ Edad: _____

Temperatura	Frec.Resp.	Frec. Card.	Aplast. traqueal



EXPLORACIÓN DE VÍAS ALTAS:

- Secreción nasal:
 - Unilateral o bilateral
 - Mucosa, serosa, purulenta, hemorrágica
- Sonidos de vías altas
- Disnea inspiratoria
- Estornudos
- Deformación craneal

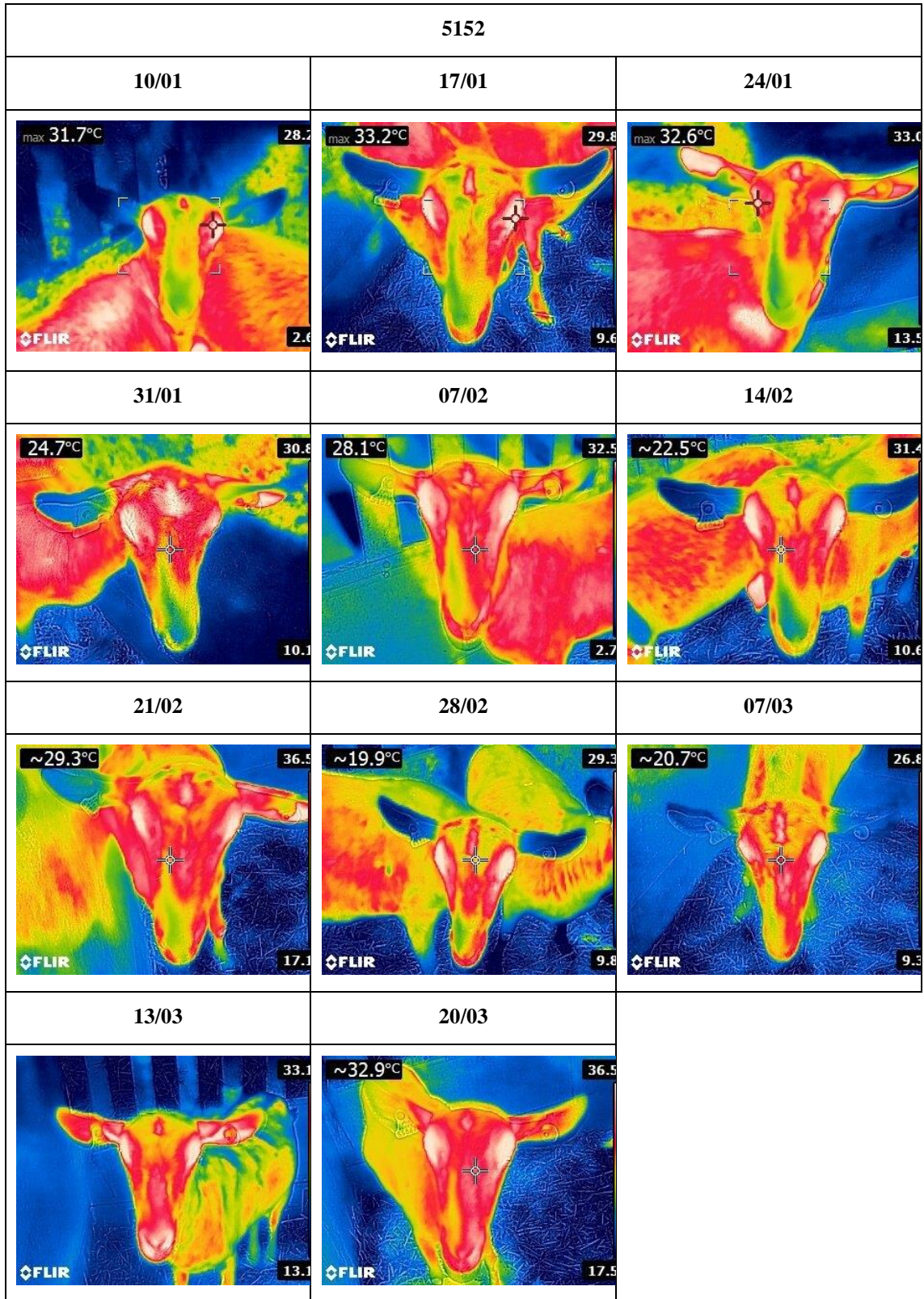
EXPLORACIÓN DE VÍAS BAJAS:

- Tos
 - Positiva o negativa
 - Productiva o seca
 - Maloliente
- Disnea espiratoria o mixta
- Prueba carretilla: POS / NEG
- Proceso localizado o difuso
- Proceso localizado:
 - Unilateral o bilateral
 - Craneal, dorsal o caudal
- Dibujar en pulmón la presunta localización
- Sonidos respiratorios
 - Estertores
 - Ronquidos
 - Sibilancias
 - Roce pleural

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL:

DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO:

Anexo 3.



5153		
10/01	17/01	24/01
31/01	07/02	14/02
21/02	28/02	07/03
13/03	20/03	

Anexo 4.



Analítica nº: M224820



Recepción	02/05/2024	Informe	03/05/2024
Referencia	Cabra 5153	Especie	Caprino
Enviado por	Aurora Ortín - Patología Animal, Fac. Veterinaria	Categoría	Desconocido
REGA		Edad	Adultos
Origen		Proceso	Respiratorio
Solicitada por	Patología Animal, Fac. Veterinaria	Muestras	2 Hisopos

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

REFERENCIA EXOPOL	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
1. His1	Hisopo	5153 izquierda
2. His2	Hisopo	5153 derecha
3. Pool His1-2	Pool	

REAL TIME PCR

DETERMINACIONES

MUESTRAS

Tumor nasal enzoótico (TNE)

Pool His1-2
Positivo(Cq 37)

Nota: detección mediante EXOone qPCR kits. Una muestra se considera positiva si tiene un valor de Cq \leq 38.

Nota: conservamos las muestras durante un periodo de 1 mes por si desea realizar estudios complementarios.

Si desea interpretación de los resultados obtenidos puede contactar con nuestro servicio técnico. En el siguiente enlace encontrará el contacto del veterinario técnico-comercial de su zona, así como los contactos de los especialistas de especie: <https://www.exopol.com/es/contacto/index.php>.

Los resultados de este análisis podrán ser utilizados de forma anónima para la elaboración de estadísticas, investigaciones y publicaciones científicas.

A final de mes se facturarán estos resultados a la dirección y NIF siguientes:	Hospital Clínico Veterinario Zaragoza HCVUZ C/ Miguel Servet 177 50013 Zaragoza España
Precio del diagnóstico (provisional): 10,5 € + IVA	NIF:Q5018001G

Laboratorio de Diagnóstico Veterinario autorizado por la Diputación General de Aragón. Resolución del 23/8/2009, BOA n.º 87.

Anexo 5.



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Formulário de consentimento informado

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora, será realizado um estudo que visa avaliar os métodos de diagnóstico precoce para o diagnóstico de Adenocarcinoma Nasal Enzoótico.

Para este efeito, serão recolhidos e partilhados dados da exploração "Quesos Catí" na região de Castellón, Espanha bem como alguns dados dos seus animais.

Com base nas informações fornecidas, eu Javier Balado Albiol, portador do cartão de cidadão nº 18953881H, pessoa responsável pela exploração com a marca nº ES120140000041, aceito de livre vontade, participar no estudo "Estudo comparativo de métodos para o diagnóstico de adenocarcinoma nasal enzoótico em cabras" para efeitos de Dissertação de Mestrado, realizado pela aluna Ana Isabel de Oliveira Neves, 41673.

Compreendi a explicação que foi dada, tendo autorizado a aluna que utilizasse e partilhasse os dados fornecidos.

Por ser verdade o que está acima referido, dato e assino o presente formulário,

Ares del Maestre (Castellón) a 8 de agosto de 2024

