

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS EQUINO EM PLACA AURAL EQUINA
POR QPCR**

MARIANA HERMAN

Botucatu-SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS EQUINO EM PLACA AURAL EQUINA
POR QPCR**

MARIANA HERMAN

*Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de mestre.*

Orientador: Professor Assistente Doutor José
Paes de Oliveira Filho (FMVZ/UNESP).

Co-Orientador: Professor Adjunto Alexandre
Secorun Borges (FMVZ/UNESP).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Herman, Mariana.

Detecção de papilomavirus equino em placa aural equina
por qPCR / Mariana Herman. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Oliveira Filho

Coorientador: Alexandre Secorum Borges

Capes: 50501062

1. Equino - Doenças. 2. Papilomatose. 3. Dermatologia
veterinária. 4. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Enfermidade dermatológica; Equino;
Papilomatose; Placa Aural; qPCR.

MARIANA HERMAN

**DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS EQUINO EM PLACA AURAL EQUINA
POR QPCR**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor José Paes de Oliveira Filho

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

Luiz Claudio Nogueira Mendes

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária/UNESP -Araçatuba -SP.

Professor João Pessoa Araújo Junior

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências/UNESP

- Botucatu-SP.

Data da defesa: 18 de abril de 2016.

“Se eu não for por mim, quem será por mim?

E se eu for só por mim, então quem sou?

E se não agora então quando?”

HILLEL

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador José Paes de Oliveira Filho pela confiança e orientação durante esse trajeto, ao professor Alexandre Borges pela oportunidade e a ambos por propiciarem um excelente ambiente de trabalho, com recursos e pessoas. Com um agradecimento especial e carinhoso aos membros do grupo de pesquisa com quem tive a sorte de poder conviver nesse período, Cesar Araújo, Giovane Olivo, Aline Angella, Campo Amor e Anelize Trecenti, cada um com a sua facilidade e especialidade, todos com um espírito de união. E às colegas de projeto Luiza Zakia e Juliana Mira.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto e a CAPES pela concessão da bolsa sem as quais esse projeto não poderia ter sido realizado. Também a instituição de ensino UNESP Botucatu, FMVZ e IBTEC e todos os funcionários.

Ao professor João Pessoa Araújo Júnior por suas imensas contribuições durante cada etapa deste. A oportunidade de assistir às suas aulas e frequentar seu laboratório foram um dos maiores ganhos desse programa. Um agradecimento carinhoso a sua equipe, especialmente a Camila Malossi e Leila Ullman.

Ao professor Pantoja pelas aulas que me deram base para desenvolver este e os próximos trabalhos. E pelo auxílio paciente e cuidadoso na análise dos meus dados.

Aos seguintes proprietários, funcionários e amigos que com a única intenção de ajudar concederam seu tempo, espaço e animais para realização das coletas: Astolfo Rodrigues Vale Filho, Antonio Zandonaide, Maurício Antonio do Vale Faria, Beto Falcão, Wanderley, Lucas Radel, João Sérgio, Sérgio Gonçalves, Antenor Neto, Valdivino Rosa, Robério Barros, Emerson Figueira, Neilton G. de Moraes, Cesar Vieira, Wanderson Peres, Welison Correa, Carlos Henrique de Macedo, Elison Gomes Pereira, Ricardo Fernandes Pena, Reginaldo Ferreira Godoi, Ronny Jean Rocha, Paulo Amaral Santana, Derivaldo Leite da Silva, Salvio Neri de Andrade, Zenóbio de Oliveira, José

Santana dos Santos, Arthur Zarife, Gilda de Miranda Nicolau, Jomar Ferreira, Julio Vieira Barros, Marquinhos Laidane, Célia Regina Hielgemberg, Marco Antonio Fausto de Souza e José Patrício.

Destes preciso agradecer com ainda mais ressalvas àqueles que abriram suas casas para pouso e alimentação, destinaram tempo e dinheiro na busca incessante por mais propriedades e animais e nos proporcionaram momentos extremamente agradáveis: Astolfo Rodrigues Vale, Maurício Faria e Adriana Montagno, Ronny e Michele Rocha, Sr. Salvio Andrade e família, Zenóbio e família, Marquinhos Laidane, Sra. Célia Hielgemberg e família e Marco Antonio Fausto de Souza. Meus sinceros agradecimentos, desejo poder retribuir.

Aos meus amigos antigos e recentes que auxiliaram direta e indiretamente nesse trajeto com ideias, conselhos e presença reconfortante: Natália Philadelpho, Sylise Santos, Carla Ulian, Gabriela Dantas, Raíssa Salgueiro e Elisa Santana.

Um agradecimento especial a mais presente e companheira em todos os momentos Caroline Vitória, seu apoio, presença, carinho, confiança e ajuda nas pequenas e grandes coisas tornaram o caminho mais fácil e prazeroso.

Agradeço com todo meu amor e gratidão a minha família, inclusos Eliana Lago, Bebel Herman, Katia Silva e Gilberto e Rosa Rolim. Em especial ao meu irmão Gabriel Ribeiro, por todas as palavras assertivas que me foram destinadas ao longo dos últimos anos, a vida é mais leve com você. O seu sorriso é parte marcante dos grandes momentos da minha vida, como este.

Ao meu pai, Martin Frank Herman, pela minha primeira aula de genética, o amor pelos equídeos e a experiência de vida ao lado destes. Sou enormemente grata pelo seu envolvimento na realização deste projeto de mestrado. Minha fase de coletas teria sido exaustiva e possivelmente inatingível sem a sua ajuda.

À minha mãe Eneida Herman, por ser a fundação e o exemplo, a mantenedora incansável.

À minha amada filha Rafaella Herman Rolim por sua admiração e amor incondicionais que são o maior incentivo para perseverar e prosseguir.

Finalmente ao universo desconhecido e todas as energias ao nosso redor por permitirem o plantio, o aprendizado, o crescimento, os frutos adjacentes e a colheita.

Lista de Siglas e Abreviações

BA - Bahia

BPV - *Bos taurus Papillomavirus*

CE - Ceará

CO - Centro-oeste

Ct - Ciclo Threshold

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxinucleotídeos Trifosfatos

E- Early

EcPV - *Equus caballus papillomavirus*

GO – Goiás

IC – Intervalo de Confiança

L - late

MG - Minas Gerais

N - Norte

NE - Nordeste

ORFs - Open Reading Frames

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PR - Paraná

PV - Papilomavírus

qPCR - PCR em tempo real

RJ - Rio de Janeiro

S - Sul

SC - Santa Catarina

Se – Sudeste **SP** - São Paulo

TO - Tocantins

Lista de Figuras

- Figura 1.** Pavilhão auricular de dois equinos apresentando placa aural. Lesão única, puntiforme, plana, despigmentada e pouco queratinizada (A). Lesões coalescentes, extensa e mais queratinizada, também despigmentada (B).....08
- Figura 2.** Corte histológico da pele do pavilhão auricular com placa aural. Evidencia-se: área de transição da pele integra/lesionada (quadro em destaque), espessamento epitelial com hiperkeratose (*) e hipomelanose epidérmica (seta).....09
- Figura 3.** Procedimento de biopsia com “punch” de 6 mm de diâmetro. A – Identificação da lesão (A). Secção do fragmento com “punch” (B). Pele após a remoção da amostra (C).....14
- Figura 4.** Curva de diluição e amplificação do EcPV3, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5.....17
- Figura 5.** Curva de diluição e amplificação do EcPV4, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5.....18
- Figura 6.** Curva de diluição e amplificação do EcPV5, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5.....20
- Figura 7.** Curva de diluição e amplificação do EcPV6, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5.....21
- Figura 8.** Gráfico obtido através do programa Microsoft Excel ilustrando os resultados das amostras experimentais.....22
- Figura 9.** Gráfico obtido através do programa Microsoft Excel ilustrando a incidência dos tipos virais em todas as regiões do país.....24

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição dos animais coletados entre os estados de cada região.....	13
Tabela 2. Desenho dos <i>primers</i> (ZAKIA et al., 2015) e sondas referente a cada um dos quatro tipos virais.....	15
Tabela 3. Localização dos Primers (Zakia et al., 2015) e sondas referentes a cada um dos tipos virais.....	15
Tabela 4. Comparativo entre os resultados obtidos pela técnica de PCR convencional (HERNANDEZ, 2015) e qPCR nas 104 amostras analisadas neste trabalho.....	26

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3. OBJETIVO.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
7. BIBLIOGRAFIA.....	28
8. ARTIGO.....	32

HERMAN, M. **Estudo etiológico da placa aural em equinos**. Botucatu, 2016. 51p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As papilomatoses ocupam uma posição de destaque na medicina humana e veterinária uma vez que são enfermidades virais dermatológicas com potencial para desenvolver malignidade tumoral. Nos equinos os papilomas estão associados às seguintes enfermidades: papilomatose clássica, associada ao EcPV1; carcinoma de células escamosas associado ao EcPV2; Massas tumorais em mucosas genitais (EcPV2 e EcPV7); placa aural, associado ao EcPV3, 4, 5 e 6; sarcóide equino, associado ao papilomavírus bovino 1 e 2 (BPV1 e 2). Dessas, a que está em estudo nesse trabalho é a placa aural, caracterizada por lesões puntiformes de poucos milímetros, despigmentadas e queratinizadas na face interior do pavilhão auricular, podendo evoluir e coalescer em lesões maiores e por vezes se estendendo por todo pavilhão auricular. Visando obter um teste de diagnóstico específico, sensível e rápido para identificação destes vírus, foi padronizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o EcPV3, 4, 5 e 6. E com a finalidade de avaliar a incidência dessa enfermidade no rebanho nas cinco regiões do país e estabelecer a prevalência de cada tipo viral a partir da técnica padronizada, foram coletadas 104 amostras das regiões Nordeste, Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Como resultado obteve-se a padronização da técnica. Na análise das amostras a prevalência de pelo menos um tipo viral na lesão foi 90,39%, com as seguintes prevalências por tipo: EcPV3 36,54%, EcPV4 81,73%, EcPV5 0,96% e EcPV6 10,58%, apresentando variação entre as diferentes regiões. O presente estudo traz uma evolução no que se refere às pesquisas relacionadas a Placa Aural e também levanta novos questionamentos para estudos futuros.

Palavras-chave: Equinos, enfermidades dermatológicas, papilomatose, qPCR, Placa Aural.

HERMAN, M. **Etiologic study of equine aural plaque**. Botucatu, 2016. 51p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Papillomatosis occupy a prominent position both in human and veterinary medicine, since they are viral skin diseases with potential to develop malignancy. In horses papillomas are associated with the following diseases: classical papillomatosis associated with EcPV1; squamous cell carcinoma associated with EcPV2; tumors in mucous membranes on the genital area (EcPV2 and EcPV7); aural plaque associated with EcPV3, 4, 5 and 6; equine sarcoid, associated with bovine papillomavirus (BPV1 and 2). Of all equine papillomatosis, aural plaque is the one analyzed in this work, which is characterized by small papules, with a few millimeters, hypochromic and keratinized on internal surface of the pinnae and can evolve and coalesce into larger lesions. To obtain a specific diagnostic test, also sensitive and quick to identify these viruses, a Real Time PCR was standardized for EcPV3, 4, 5 and 6. In order to evaluate the incidence of this disease in equine herds distributed in the five regions of Brazil and establish the prevalence of each viral type using the standardized technique, 109 samples were collected in the Northeast, North, South, Southeast and Midwest. The main result was the technique standardization of the technique. Applying the qPCR technique in the samples resulted in 90,39% of at least on viral type prevalence, the prevalence for each type was: EcPV3 36,54%, EcPV4 81,73%, EcPV5 0,96% e EcPV6 10,58%, with variation between different regions. This study represents an evolution in the area related to aural plaque and equine papillomatosis and raises new questions for future research.

Keywords: Equine, dermatological diseases, papillomatosis, qPCR, Aural Plaque

1. Introdução e Justificativa

Em dezembro de 2014 a agropecuária representava para o Brasil 23% do Produto Interno Bruto do país, e frente ao panorama de recessão esta foi considerada pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da USP como “setor estratégico para a economia brasileira” no ano de 2015 (CEPEA, 2014). Dados mostram que no primeiro semestre de 2015, enquanto setores como a Indústria demonstravam uma queda de 1,38%, a pecuária apresentou expansão de 0,53% com uma receita estimada de R\$ 397,96 bilhões, 32,5% da receita total do agronegócio brasileiro (CEPEA, 2015).

A equinocultura está inserida diretamente nesse quadro. Em 2004 quando a equinocultura brasileira possuía um total de 5,7 milhões de cabeças (SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS, 2015), mobilizava cerca de R\$7,3 bilhões/ano e empregava diretamente 640 mil pessoas no Brasil (CNA, 2004). Embora dados mais recentes sobre mobilização da economia e empregos correlacionados não tenham sido disponibilizados, dados do IBGE mostram que o número total de equinos no Brasil foi de 5,3 milhões em 2013.

É relevante destacar que não apenas no mercado nacional os equinos têm destaque, foram exportados no ano de 2005 um total de 2.054 cabeças de equinos. Em comparação à 1986 quando esse número era de 138 cabeças, demonstrando um crescimento na exportação destes ao longo dos anos (LIMA e FERRUCCI, 2007). Esse crescimento na exportação pode ser pouco representativo do ponto de vista econômico, mas cabe supor que são animais com alto valor agregado devido a sua qualidade genética ou habilidade esportiva.

Pode-se apontar que cada país tem a sua regulamentação para importação de animais vivos e protocolos correlacionados aos agentes infecciosos, o que justificaria uma preocupação com relação às enfermidades virais em rebanhos que visam exportação.

É sabido que a Placa Aural é uma enfermidade dermatológica de origem viral, causada por um papilomavírus e portanto caracterizada como uma doença infecciosa (ALFIERI et al, 2012).

A Federação Equestre Internacional, órgão envolvido diretamente com os jogos equestres nas olimpíadas, em suas regulamentações veterinárias mais atuais (FEI, 2015), estabelece como protocolo que durante o exame de entrada no recinto de esporte os animais sejam vistoriados para possíveis sinais de doenças infecciosas e ainda enfatiza, em um artigo próprio, a importância de que, visando a biossegurança, quaisquer animais apresentando sinais clínicos de enfermidades infecciosas devem ser reportados imediatamente.

Ainda que a placa aural seja uma papilomatose cutânea de caráter benigno e que grande parte das papilomatoses sejam altamente espécie específicas (JACKSON, H.A., 2003; MUNDAY e KIUPEL, 2010), é sabido que existem infecções heterólogas. Equinos podem ser infectados pelo Papilomavírus bovino (BPV) 1 ou 2 levando a um tumor fibroblástico conhecido como Sarcóide. (ALFIERI, A. A. et al, 2012)

De acordo com a World Organisation for Animal Health os agentes infecciosos encontrados nos rebanhos animais apresentam uma ameaça à saúde, economia, biodiversidade, segurança alimentar e saúde pública, uma vez que próximo de 75% das doenças infecciosas emergentes no mundo tem origem animal (OIE, 2015).

Até o presente momento nenhum estudo utilizando qPCR e com grande números de amostras foi realizado no Brasil e com tamanha distribuição entre as regiões do país.

2. Revisão de Literatura

2.1 Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) são pequenos vírus epiteliotróficos (ANTONSSON E HANSSON, 2002), não envelopados e com capsídeos icosaédricos (LONGWORTH E LAIMINS, 2004), resistentes às condições ambientes, com 52 a 55nm, pertencentes a família *Papillomaviridae*. Seu ácido nucleico é circular (TORRES E KOCH, 2013) formado por dupla fita DNA, com aproximadamente 8kpb (ALFIERI, A. A. et al, 2012). Até 2004, 118 tipos de PV já tinham sido descritos (VILLIERS et al., 2004).

Estes podem ser encontrados em condições latentes ou subclínicas, onde a enfermidade não se desenvolve ou é assintomática, respectivamente. Isso foi descrito por Antonsson (2002), quando diversos tipos virais desta família foram identificados em “swabs” de pele saudável de humanos e animais. No ambiente esses vírus podem sobreviver até 63 dias em condições de 4 a 8 °C e até seis horas a 37 °C (SCOTT E MILLER, 2011)

Os PVs não costumam promover grandes respostas inflamatórias e tem como célula alvo os queratinócitos, que por sua vez não são células que executam adequadamente a apresentação de antígeno. Essas duas características são determinantes para o entender o mecanismo de evasão deste pelo sistema imune do hospedeiro (GISSMAN, L., 1997)

As papilomatoses estão bastante difundidas entre os seres humanos e os animais domésticos e silvestres, acometendo as mais variadas espécies de caninos, felinos, equídeos, ruminantes, roedores, aves, primatas, suínos e até animais marinhos como o golfinho (BERNARD et al., 2010)

O genoma viral dos PV é constituído das seguintes regiões: early (E), late (L) e regulatória. Sabe-se que os genes E são expressos na camada basal e espinhosa da pele, enquanto os L predominantemente na camada córnea, sendo os primeiros responsáveis principalmente pela infecção primária e replicação (E1 e E2) e os seguintes pela liberação dos virions maduros (L1 e L2) (LONGWORTH E LAIMINS, 2004). Longworth e Laimins (2004) também

relatam que essa transcrição acontece a partir de oito “Open Reading Frames” (ORF) em uma única fita DNA.

Estudos das papilomatoses humanas demonstram que para que o hospedeiro seja infectado deve haver uma porta de entrada, uma vez que o vírus não é capaz de penetrar ativamente (NASIR E BRANDT, 2013). Basta uma microlesão que exponha a camada celular basal do epitélio, nesta camada as células estão em constante divisão, o que é favorável à expressão do genoma viral, onde são produzidas as primeiras proteínas E1 e E2. Também é nessa fase inicial que nos PVs de “alto risco” (associados a malignidade tumoral) são expressas as proteínas E6 e E7 (LONGWORTH E LAIMINS, 2004). Para favorecer a replicação viral utilizando-se de alterações favoráveis no ambiente celular são expressas também E4 e E5 (DOORBAR et al., 2012). E finalmente expressam-se as proteínas L1 e L2, responsáveis pela formação do capsídeo, maturação e liberação viral. (LONGWORTH E LAIMINS, 2004)

Vale citar que uma vez dentro da célula do hospedeiro, o DNA do vírus pode estar na forma integrada ou episomal, ou seja, ligado ou não ao DNA hospedeiro respectivamente, fator que também parece ter associação com a malignidade da infecção, uma vez que os vírus de alto-risco em geral apresentam-se na forma integrada (PARELLADA e PEREYRA, 2009).

2.2 Papilomatoses na espécie equina: enfoque na Placa Aural

Atualmente já foram identificados nos equinos os seguintes *Equus Caballus papillomavirus* (EcPV): EcPV1; EcPV2; EcPV3; EcPV4; EcPV5; EcPV 6 e EcPV7 (TORRES E KOCH, 2013). Também foram encontrados os seguintes *Bos taurus Papillomavirus* (BPV): BPV1 e BPV2. Estes associados à enfermidade dermatológica conhecida como Sarcóide (MUNDAY e KIUPEL, 2010), afecção neoplásica de caráter benigno, caracterizada por proliferação fibroblástica, localmente invasiva embora não metastática, com diferentes apresentações clínicas e de difícil tratamento pela alta taxa de recidiva (SELLON, 2007).

O EcPV1 pertence ao gênero Zeta-papillomavirus, cuja propriedade biológica é gerar lesões cutâneas em equinos (VILLIERS et al., 2004). Também conhecida como papilomatose cutânea (SELLON, 2007) ou

papilomatose equina clássica, que é caracterizada pelo aparecimento de lesões queratinizadas, geralmente na extremidade do focinho e ao redor dos lábios. Acomete animais jovens, abaixo de três anos e mais comumente abaixo de um ano, com remissão em aproximadamente dois a três meses. (SCOTT E MILLER, 2011)

Já o EcPV2 pertence ao gênero Dyovirus, e está correlacionado com papilomatoses genitais e carcinoma de células escamosas. Esse tipo viral foi isolado de carcinoma de células escamosas penianas, neoplasia peniana intraepitelial e papilomas penianos. Mas também foi isolado em sua forma latente em mucosas genitais saudáveis de equinos machos. O EcPV7, outro tipo de papiloma equino, também já foi identificado em massas penianas (TORRES E KOCH, 2013).

Os outros quatro papilomas equinos listados, EcPV3, 4, 5 e 6 estão correlacionados com a papilomatose auricular, também conhecida como placa aural (TORRES E KOCH, 2013). Esta é uma moléstia dermatológica do pavilhão auricular de equinos, que pode ser encontrada em uma ou ambas orelhas (SOUSA et al., 2008) de caráter benigno, sem regressão espontânea como a papilomatose clássica, aparentemente indolor e não pruriginosa (SELLON, 2007), podendo aparecer isoladas ou múltiplas, na forma de pápulas esbranquiçadas de 1 a 2mm de diâmetro, podendo ou não coalescer e formar placas queratinizadas (SCOTT E MILLER, 2011), adquirir aspecto verrucoso e até mesmo se estender por quase toda a superfície da pina (SOUSA et al., 2008).



Figura 1. Pavilhão auricular de dois equinos apresentando placa aurál. Lesão única, puntiforme, plana, despigmentada e pouco queratinizada (A). Lesões coalescentes, extensa e mais queratinizada, também despigmentada (B).

Seu diagnóstico se dá visualmente, uma vez que apresenta lesão característica, bem como outras papilomatoses (SCOTT E MILLER, 2011). Na avaliação histológica, essas foram caracterizadas por espessamento da camada epidérmica associada a hiperqueratose e hipomelanose (SOUSA et al, 2008) compatível com as descrições clínicas, como pode ser observado na figura dois.

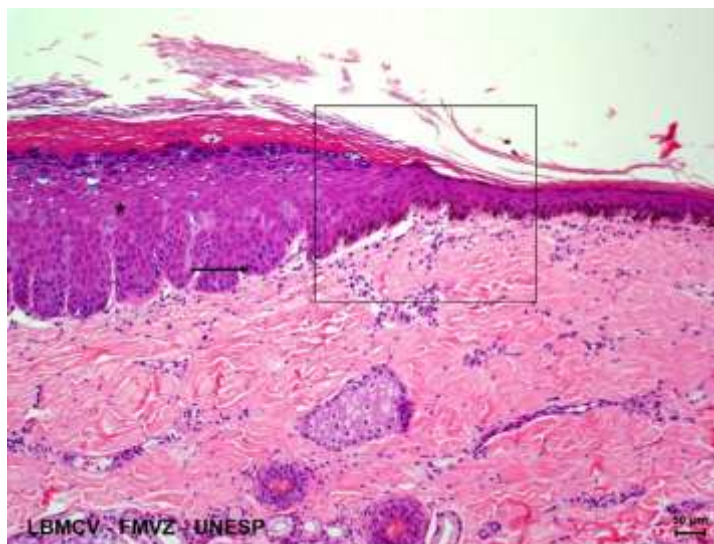


Figura 2. Corte histológico da pele do pavilhão auricular com placa aural. Evidencia-se: área de transição da pele integra/lesionada (quadro em destaque), espessamento epitelial com hiperqueratose (*) e hipomelanose epidérmica (seta).

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

PCR é uma técnica de biologia molecular baseada na amplificação exponencial de uma sequência de DNA alvo. Uma reação de PCR precisa dos seguintes elementos básicos: *Primers*, enzima polimerase, desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e sequência de DNA molde (COX, 2012).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) são responsáveis por conferir a especificidade da reação, uma vez que são sequências de nucleotídeos desenhados de modo complementar ao DNA desejado, visando a amplificação de um segmento específico. São fragmentos pequenos, com cerca de 18 a 30 nucleotídeos (PELT-VERKUIL et al., 2008), que se anexam na extremidade 3' da sequência alvo promovendo o início da amplificação da fita.

Dando início à participação da enzima DNA-polimerase, uma vez que o primer se ligou à fita estas começam a inserir os nucleotídeos livres no meio formando a nova sequência (COX, 2012). Nos organismos essa enzima normalmente é termolábil, ou seja, susceptível a temperatura, já nas reações de PCR são necessárias enzimas termoestáveis como a Taq polimerase que é

retirada da bactéria *Thermus aquaticus* e a Vent polimerase retirada da *Thermococcus litoralis* (PELT-VERKUIL et al., 2008).

Para que cada etapa aconteça é essencial um ciclo de aquecimento e resfriamento, que se baseia em três etapas: desnaturação, anelamento e polimerização.

A desnaturação é a fase em que as duplas fitas do DNA molde se separam e a enzima vai ser ativada, com temperaturas variando de 90 a 95 °C por 2 a 10 minutos iniciais e deve ser repetido a cada ciclo. Na fase seguinte deve-se respeitar a temperatura de anelamento do primer variando de 54 a 60 °C, esta normalmente dura de 15 a 60 segundos. E na última etapa a temperatura fica por volta de 72 °C de acordo com a temperatura ideal para funcionamento da enzima e o tempo variando de acordo com o tamanho do segmento a ser amplificado, esse período de polimerização ou extensão é quando os nucleotídeos são inseridos formando a cópia do DNA desejado (PELT-VERKUIL et al., 2008).

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica diferente do PCR convencional pois tem como característica fornecer dados sobre o volume de DNA produzido a cada ciclo, por isso caracterizado como “em tempo real” (REBRIKOV e TROFIMOV, 2006), que se dá através da fluorescência.

Um dos métodos para se obter esse dado é a partir da utilização de sonda compostas por um corante fluorescente em sua extremidade 5' e um *quencher* em sua extremidade 3', desenhadas para serem complementares ao DNA molde. O princípio dessa técnica está no anelamento destas à sequência de DNA molde e a quebra da sonda pela enzima polimerase, separando as duas extremidades e emitindo um sinal fluorescente (ESPY et al., 2006).

3. Objetivo

Padronizar um teste diagnóstico para os quatro *Equus caballus papillomavirus* previamente associados a placa aural equina (EcPV3, 4, 5 e 6) utilizando PCR em tempo real (qPCR) e aplicá-la na detecção destes em 104 amostras coletadas das cinco regiões do Brasil.

4. Material e Métodos

4.1 Comitê de ética e auxílios

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da FMVZ/ Botucatu, SP (Protocolo 120/2013).

Todos os procedimentos e materiais foram financiados com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número: 2013/15995-8.

4.2 Seleção dos animais

Foram utilizados 104 equinos, alguns com idade desconhecida ainda que adultos, sem predileção por raça, sexo ou pelagem, todos apresentando lesões características de Placa Aural.

A idade dos animais coletados variava entre 1 e 22 anos, com média de 6,5 anos, sendo 61 fêmeas e 43 machos. Distribuídos em 39 propriedades, espalhadas em 21 cidades pertencentes a 9 estados das cinco regiões do país.

Visando variar a amostragem, incluir um maior número de raças e considerando a possibilidade de identificar mais tipos de papilomas as coletas foram divididas entre as cinco regiões do país.

Foram inspecionados e coletados por essa equipe, animais de pequenas e grandes propriedades, com diferentes concentrações de animais e tipos de manejo, distribuídas em inúmeros municípios, nos diferentes estados, seguido da coleta dos clinicamente positivos como ilustrado na tabela a seguir.

Tabela 1. Distribuição dos animais coletados entre os estados de cada região.

Região	Estado	Número de Animais
Centro-Oeste	GO	17
Nordeste	BA	19
	MG	7
Sudeste	RJ	3
	SP	16
Sul	PR	17
	SC	3
Norte	TO	22
	Total	104

4.3 Coleta do Material

Os animais foram sedados com detomidina 0,01mg/kg de peso vivo IV, e o fragmento de tecido colhido com “punch” de 6 mm de diâmetro.

A biópsia era retirada da maior lesão presente no pavilhão auricular visando pegar apenas tecido acometido, seguido da aplicação de repelente tópico e acompanhamento do animal até retorno total da sedação.

As amostras eram colocadas em criotubos previamente identificados e mergulhadas em nitrogênio líquido durante todo o percurso até o laboratório, onde eram mantidas a -80°C até o momento da extração.

Todos os procedimentos de colheita das amostras foram previamente autorizados pelos proprietários através do preenchimento do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”.

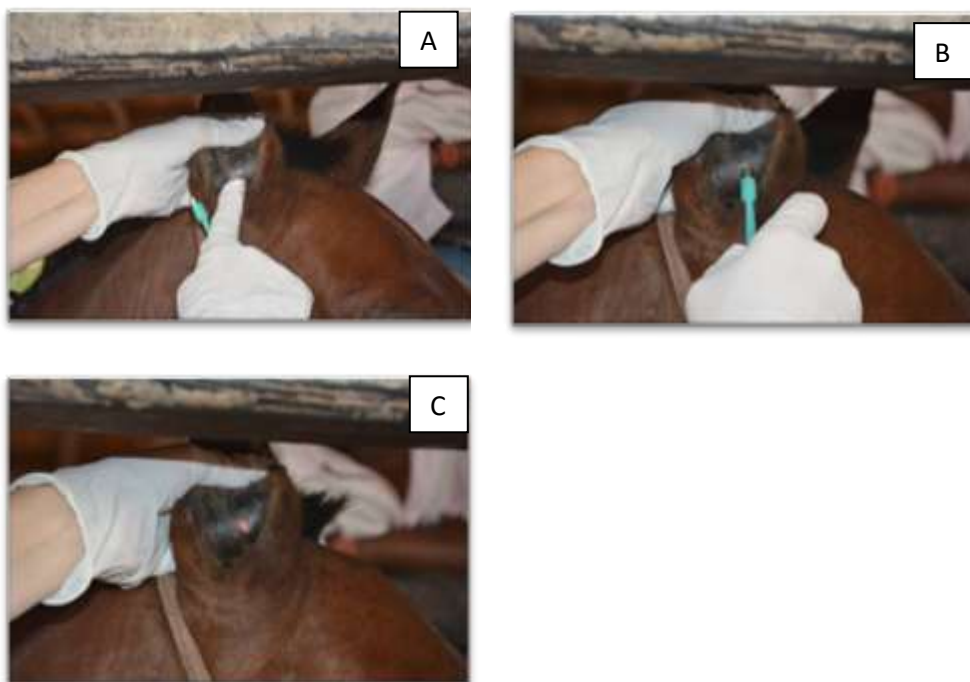


Figura 3. Procedimento de biópsia com “punch” de 6 mm de diâmetro. A – Identificação da lesão (A). Secção do fragmento com “punch” (B). Pele após a remoção da amostra (C).

4.4 Purificação do DNA

O processo de extração de DNA das amostras de biópsia foi realizado a partir de 20 mg da amostra de placa auricular maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo, utilizando kit de extração GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma®) seguindo as recomendações do fabricante. Ao final o DNA foi eluído com 80 µL de Buffer AE e avaliado em relação à sua concentração e qualidade por espectrofotometria (Nanodrop 2000). O DNA extraído foi mantido congelado a -20°C até a realização da qPCR.

4.5 Padronização da qPCR

4.5.1 Primers

As sondas específicas complementares a um fragmento de DNA referente a região L1 de cada tipo viral (EcPV3, 4, 5 e 6) foram desenhadas utilizando o programa PrimerExpress® (Applied Biosystems) e testados *in silico*

na ferramenta on line Blast® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a sequencia destes consta na tabela abaixo, juntamente com os Primers específicos para cada tipo viral, os mesmos usados por Zakia et al., 2015:

Tabela 2. Desenho dos *primers* (ZAKIA et al., 2015) e sondas referente a cada um dos quatro tipos virais.

Vírus	Primer Foward 5'-3'	Primer Reverse 5'-3'	Sonda 5'-3'
EcPV3	TTGCGCCAGGTTTCCACATCTA	TTGTTCTGGCCTTGTGCACGTT	ACACCCAGTGGCTCTTTGGTTAGT
EcPV4	ACAATGGTGTGTTGCTGGCACGA	ACCGTGCAAAGCTGCAGAATGA	GGTGTCCAAAGATATGCGGCCTGTA
EcPV5	GGCTCCGTAGACATTCTAAAG	CTGTTACACCCACGCCTAAT	GGCATGGAAGTAGGACGAGGTCA
EcPV6	CTACCAGAGGAACGAGCTTTAC	TAGCTCCCAATCTCCAAGATA	AGGCATGTGGAGGAGTTTGAGCTT

Tabela 3. Localização dos Primers (Zakia et al., 2015) e sondas referentes a cada um dos tipos virais.

Papillomavirus	Gen Bank	Localização P.F.	Localização P.R.	Localização Probe
Tipo 3	GU 384895.1	6145 - 6166	6239 - 6260	6178 - 6201
Tipo 4	JQ 031032.1	6372 - 6393	6537 - 6558	6448 - 6472
Tipo 5	JQ 031033.1	5574 - 5595	5738 - 5757	5712 - 5726
Tipo 6	JQ 965698.1	6335 - 6356	6516 - 6537	6418 - 6441

4.5.2 Reação de qPCR

Cada reação de qPCR com volume final de 20 µL dos quatro tipos virais foi montada como segue: 10 µL de qPCR master mix [GoTaq® Probe qPCR MasterMix, Promega®], 1 µL de Primer Forward, 1 µL de Primer Reverse, 0,5 µL de Sonda, 5,5 µL de H₂O livre de nucleasse e 2 µL de Amostra.

A qPCR foi realizada no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies), utilizando um período de ativação de 2 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos para os tipos 3 e 4 e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 62°C por 60 segundos para os tipos 5 e 6.

A sensibilidade relativada qPCR foi avaliada usando a curva de diluição seriada (10X) com onze pontos para cada tipo viral, a partir de uma

amostra comprovadamente positiva através de sequenciamento de produto de PCR. Foram consideradas positivas todas as amostras contendo um valor de Ct (ciclo Threshold) acima do estabelecido em cada curva de diluição.

5. Resultados e Discussão

5.1 EcPV3 - Curva de Diluição Seriada

Para execução da curva de diluição seriada de razão 10, foi escolhida a amostra 64, sabidamente positiva para o vírus em questão através do PCR convencional e sequenciamento.

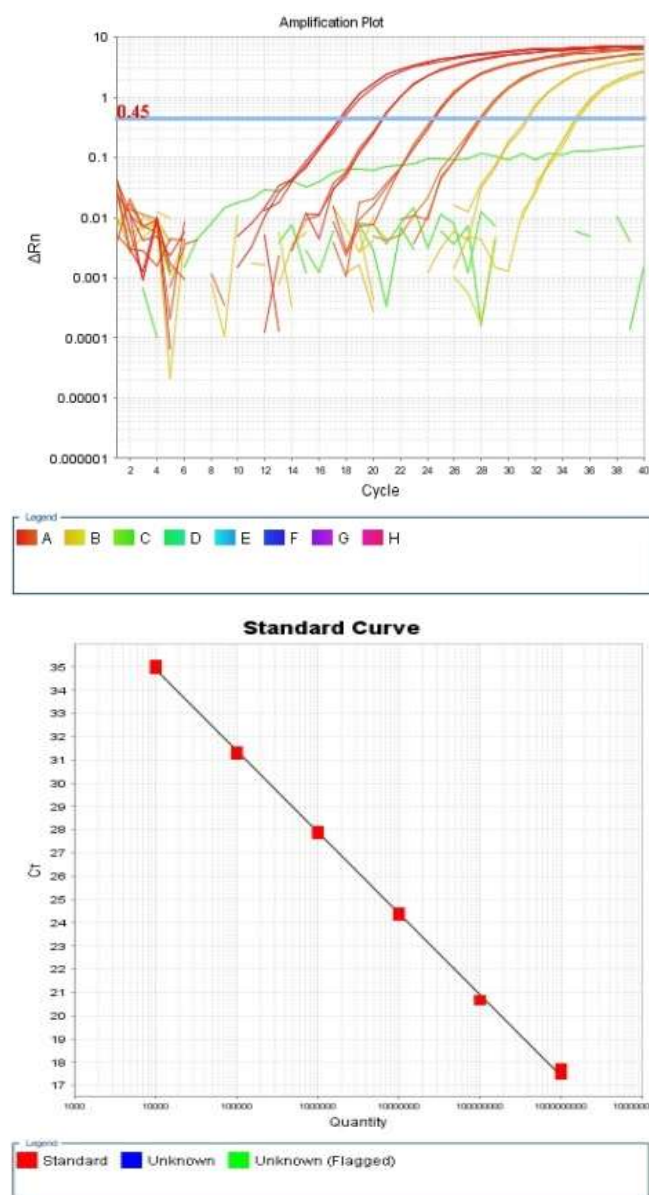


Figura 4. Curva de diluição e amplificação do EcPV3, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5

Foi obtida uma curva com amplificação até o sexto ponto de diluição, com slope de -3,49 e eficiência de 93,21%, possibilitando a determinação de

um Threshold de 0,45, este foi utilizado para padronizar o teste e estabelecer o Ct de cada amostra, sendo considerado positivo para o EcPV3 até 35.

5.2 EcPV4 - Curva de Diluição Seriada

Para execução da curva de diluição seriada de razão 10, foi escolhida a amostra 102, sabidamente positiva para o vírus em questão através do PCR convencional e sequenciamento.

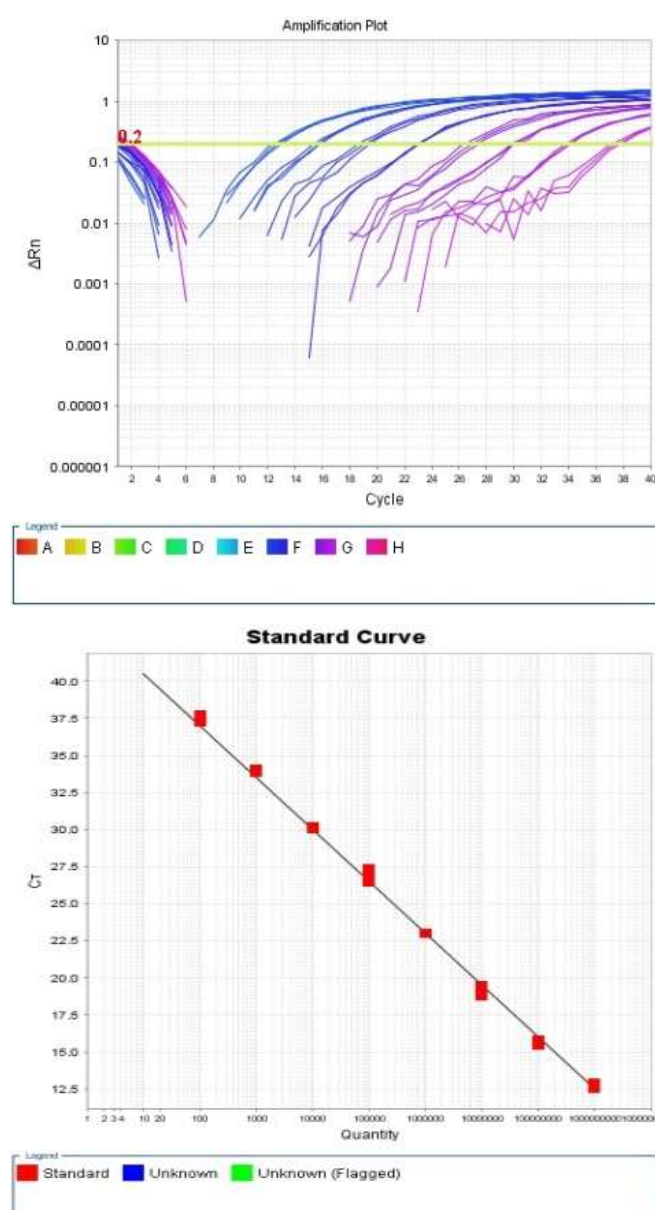


Figura 5. Curva de diluição e amplificação do EcPV4, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5

Foi obtida uma curva com amplificação até o oitavo ponto de diluição, com slope de -3,49 e eficiência de 93,31%, possibilitando a determinação de um Threshold de 0,2, este foi utilizado para padronizar o teste e estabelecer o Ct de cada amostra, sendo considerado positivo para o EcPV4 até o Ct 38.

5.3 EcPV5 - Curva de Diluição Seriada

Para execução da curva de diluição seriada de razão 10, foi escolhida a amostra 59, sabidamente positiva para o vírus em questão através do PCR convencional e sequenciamento, porém sua concentração inicial estava muito baixa, amplificando apenas até o segundo ponto de diluição. Portanto foi utilizado o produto amplificado dessa mesma amostra através do PCR e realizada a curva de diluição como descrita.

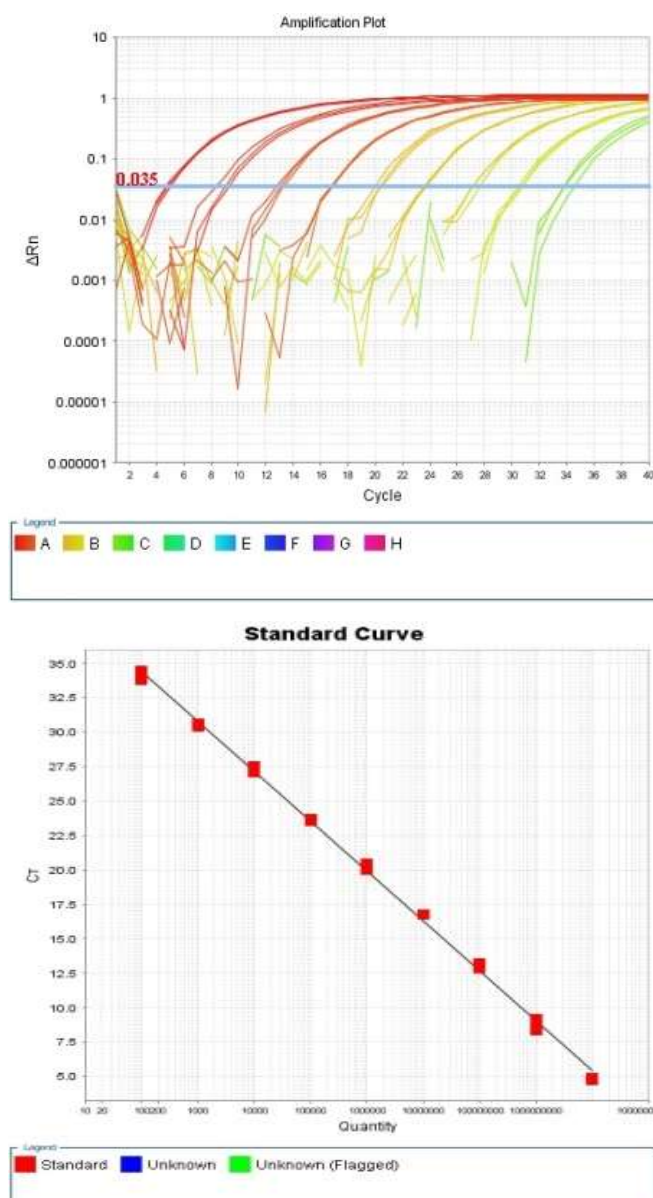


Figura 6. Curva de diluição e amplificação do EcPV5, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5.

Foi obtida uma curva com amplificação até o nono ponto de diluição, com slope de -3,6 e eficiência de 89,36%, possibilitando a determinação de um Threshold de 0,035, este foi utilizado para padronizar o teste e estabelecer o Ct de cada amostra, sendo considerado positivo para o EcPV5 até o Ct 36.

5.4 EcPV6 - Curva de Diluição Seriada

Para execução da curva de diluição seriada de razão 10, foi escolhida a amostra 10, sabidamente positiva para o vírus em questão através do PCR convencional e sequenciamento.

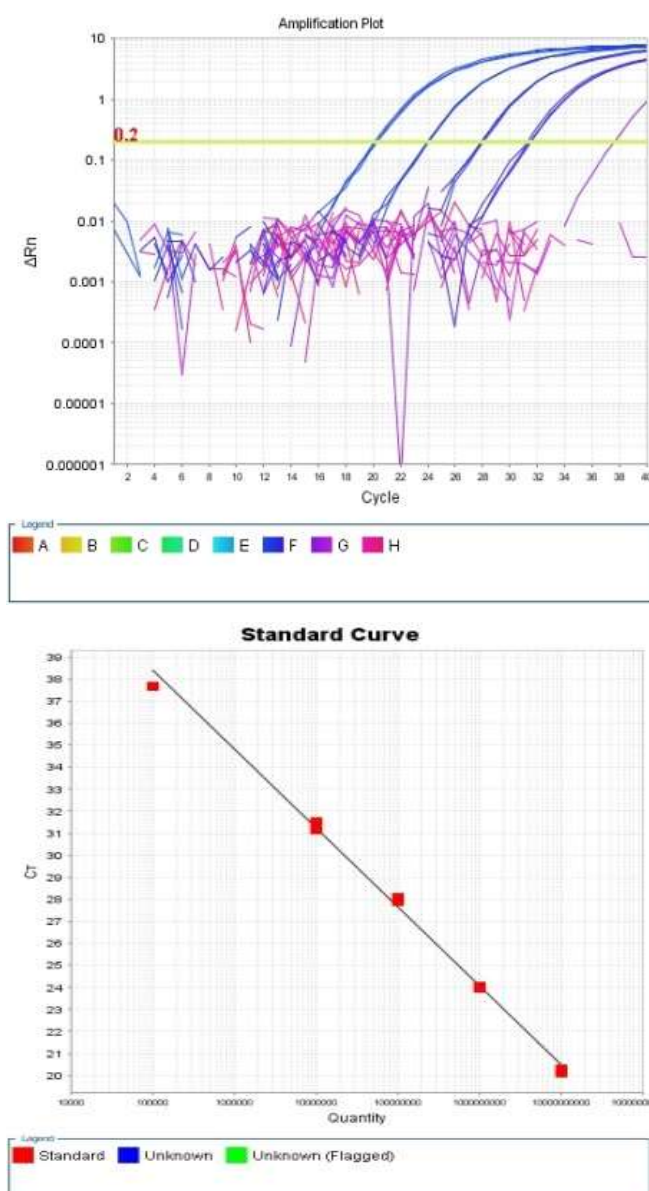


Figura 7. Curva de diluição e amplificação do EcPV6, obtidas pelo 7500 Software 2.0.5.

Foi obtida uma curva com amplificação até o sexto ponto de diluição, com slope de -3,58 e eficiência de 90,198%, possibilitando a determinação de um Threshold de 0,2, este foi utilizado para padronizar o teste e estabelecer o C_t de cada amostra, sendo considerado positivo para o EcPV6 até o C_t 38.

5.5 Amostras experimentais

Todas as amostras foram testadas usando os mesmos volumes de reação descritos na metodologia e programa utilizados na realização da curva

de diluição seriada e tiveram seus resultados analisados utilizando os valores de Threshold encontrados para cada vírus, sendo considerados positivos todos aqueles com curva de amplificação e CT estabelecido para cada tipo viral.

Das 104 amostras coletadas foram positivas: tipo 3 (38/104; 36,54%), tipo 4 (85/104; 81,73%), tipo 5 (1/104; 0,96%), tipo 6 (11/104; 10,58%), tipos 3 e 4 (35/104; 33,65%), tipos 3 e 6 (3/104; 2,88%), tipos 5 e 4 (1/104; 0,96%), tipos 4 e 6 (4/104; 3,85%), tipos 3, 4 e 6 (2/104; 1,92%). Para mais de um tipo viral (39/104; 37,5%). A média do Ct obtido nas amostras positivas foi de 25,59 para o EcPV3, 22,25 para o EcPV4 e 21,17 para o EcPV6.

Foram negativos para todos os tipos virais 10 das 104 amostras, ou seja 9,61%.

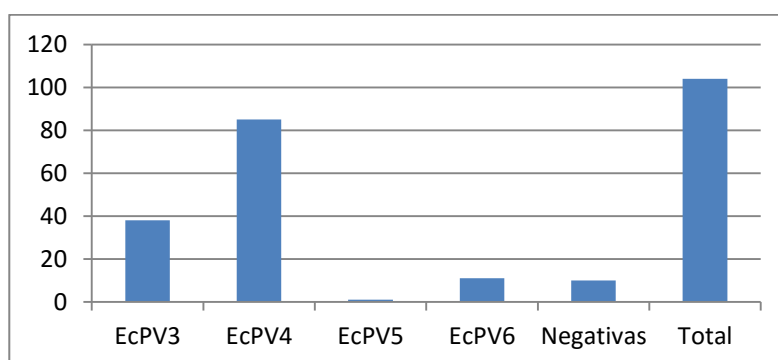


Figura 8. Gráfico obtido através do programa Microsoft Excel ilustrando os resultados das amostras experimentais.

Com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos para a incidência dos EcPVs utilizou-se o programa SAS 9.4, no qual obteve-se um intervalo de confiança (IC) de 0.273-0.465 para o EcPV3, para o EcPV 4 o IC foi 0.7295-0.8863, EcPV5 obteve-se um IC de 0.0002-0.0524 e IC de 0.0540-0.1814 para o EcPV6.

5.5.1 Nordeste

Na região Nordeste do país foram coletadas 19 biópsias, sendo as 19 na Bahia. Foram positivas para o EcPV3 um total de 4 amostras, EcPV4 um total de 18 amostras.

Demonstrando uma incidência de 21,05% do EcPV3 e 94,73% do EcPV4, sem amostras positivas para os tipos 5 e 6. Com 15,78% de infecção por mais de um tipo viral.

5.5.2 Norte

Na região Norte do país foram coletadas 22 biópsias, as 22 no estado do Tocantins. Positivas para o EcPV3 foram 21 amostras, EcPV4 foram 21 amostras e EcPV6 apenas 1 amostra.

Demonstrando uma incidência de 95,45% do EcPV3, 95,45% do EcPV4, 4,54% do EcPV6 e nenhuma amostra positiva para o EcPV5. A incidência de infecção por mais de um tipo viral foi de 95,45%.

5.5.3 Centro- oeste

Na região Centro-oeste do país foram coletadas 17 biópsias, as 17 no estado do Goiás. Foram positivas para o EcPV3 um total de 3 amostras e para o EcPV4 um total de 15 amostras

Demonstrando uma incidência de 17,64% para o EcPV3 e 88,23% para o EcPV4, sem amostras positivas para os tipos virais 5 e 6. Três das 17 amostras foram positivas para os tipos 3 e 4, com uma incidência de co-infecção de 17,64%.

5.5.4 Sul

Na região Sul do país foram coletadas 20 biópsias, 3 no estado de Santa Catarina e 17 no estado do Paraná. Para o EcPV3 foram positivas 4 amostras, para o EcPV4 foram positivas 9 amostras e para o EcPV6 foram positivas 6 amostras.

Demonstrando uma incidência de 20% do EcPV3, 45% do EcPV4 e 30% do EcPV6, sem nenhuma amostra positiva para o EcPV5. A incidência de infecção conjunta entre os tipos virais foi de 15%.

5.5.5 Sudeste

Na região Sudeste do país foram coletadas 26 biópsias, 7 no estado de Minas Gerais, 3 no Rio de Janeiro e 16 em São Paulo. Sendo 6 positivas para o EcPV3, 22 para o EcPV4 e 4 para o EcPV6.

Demonstrando uma incidência de 23,07% para o EcPV3, 84,61% do EcPV4, 3,84% do EcPV5 e 15,38% do EcPV6. Com 30,76% de infecção conjunta.

5.5.6 Distribuição entre Regiões

O resultado obtido neste estudo foi que todas as cinco regiões do país apresentam os EcPVs do tipo 3 e 4, sendo o tipo 4 de maior prevalência total e por segmento. Apenas as regiões Norte, Sul e Sudeste apresentaram amostras positivas para o EcPV6 e somente na região Sudeste o tipo 5 teve incidência.

Observa-se no gráfico abaixo a incidência de cada tipo viral para cada região do país.

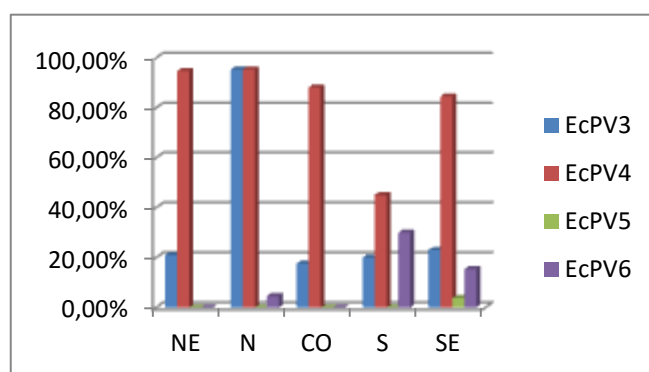


Figura 9. Gráfico obtido através do programa Microsoft Excel ilustrando a incidência dos tipos virais em todas as regiões do país.

5.6 Discussão

O total de amostras positivas para pelo menos um tipo viral foi de 90,39%, com maior prevalência nas amostras do EcPV4 81,73%, seguido pelo EcPV3 36,54%, então o EcPV6 10,58% e finalmente o tipo 5 0,96%. Gorino et al (2013) estudou a prevalência dos tipos virais 3 e 4 em 45 amostras de placa aural e obteve os seguintes resultados: total positivos 62,3%; EcPV3 8,89%; EcPV4 37,78%. Quando comparamos os resultados percebemos um aumento substancial na incidência dos tipos virais 3 e 4, demonstrando uma ascensão destes nos animais acometidos, ainda que a prevalência do EcPV4 se mantenha superior a do tipo 3. Observa-se também um aumento no número de

amostras positivas no presente estudo em comparação com o de GORINO (2013), parte desse aumento pode ser justificado pela pesquisa de mais dois tipos virais, sendo o EcPV5 e 6.

Porém dos 104 animais que apresentavam lesões características 9,61% foram negativos para os quatro tipos virais testados. Villiers et al. (2004) cita em seu artigo o crescimento do número de papillomavirus em humanos e animais, LANGE et al (2013) descreve esse crescimento especialmente nas papilomatoses equinas. Esses fatos incitam a pesquisas de mais tipos virais que possam justificar esse número, ainda que baixo, de amostras negativas.

Observa-se que prevalência observada nos resultados gerais não se manteve em cada região do país, isso fica evidente uma vez que o EcPV6 não foi identificado em nenhuma amostra das regiões CO e NE e teve sua maior incidência na região Sul com 30%, muito discrepante dos valores encontrados para SE (15,38%) e N (4,54%). E ainda EcPV4 seja o mais prevalente em todas regiões, 81,73% das amostras coletadas, também na região Sul sua prevalência foi discrepante com apenas 45%, possivelmente pela maior incidência já descrita do EcPV6. Essas variações podem ser justificadas pela extensa área do país e pelo trânsito de animais tanto nacional quanto internacionalmente que difere de região para região.

Como descrito na revisão de literatura, esses vírus são relativamente resistentes às condições ambientais e podem ser encontrados em sua forma latente em fragmentos de tecidos saudáveis, o que poderia levantar o questionamento de se esses vírus estariam causando a lesão ou apenas presentes nesta, especialmente nas amostras positivas para mais de um tipo viral. No entanto, Gorino et al (2013) demonstra que em tecidos saudáveis esses vírus não foram identificados.

De acordo com o intervalo de confiança obtido na análise estatística, dado que este representa os limites superiores e inferiores dos resultados prováveis em 95% das vezes que esse mesmo experimento fosse reproduzido, todos os quatro tipos virais aqui analisados obtiveram um curto intervalo como observado nos resultados e por isso uma boa precisão e reprodutibilidade.

Para testar a sensibilidade relativa do teste, os resultados da análise das 104 amostras testadas por qPCR foram comparadas com as mesmas 104 amostras analisadas através do PCR convencional por HERNANDEZ (2015).

No trabalho citado foram avaliadas 108 amostras, das quais apenas 104 foram usadas, as quatro amostras faltantes não possuíam volume de material para participar deste.

Observa-se na tabela abaixo o comparativo entre os resultados obtidos com as duas técnicas.

Tabela 4. Comparativo entre os resultados obtidos pela técnica de PCR convencional (HERNANDEZ, 2015) e qPCR nas 104 amostras analisadas neste trabalho.

Tipos Virais	PCR	qPCR
EcPV3	43	38
EcPV4	87	85
Ecpv5	1	1
Ecpv6	19	11

Das amostras discrepantes para o EcPV4, quatro foram positivas apenas no PCR convencional e negativas no qPCR e duas outras positivas para qPCR e negativas para PCR convencional.

Das amostras discrepantes para EcPV3, dez eram positivas apenas na PCR convencional e cinco apenas na qPCR. Das amostras discrepantes para o EcPV6 nove foram positivas na PCR convencional e uma apenas para a qPCR.

Visando justificar esse achado todas as sequencias foram reavaliadas aos pares utilizando o programa **Geneious 9.1**, a intenção era identificar a sequência referente a sonda de hidrólise nestas que foram negativas na qPCR porém positivas na PCR convencional e descartar alguma alteração genômica que justificasse. Nenhuma alteração foi identificada.

A análise dos resultados leva a crer que a sensibilidade relativa não foi a esperada, porém a qPCR foi capaz de detectar como positivas amostras dadas como negativas para a PCR convencional.

Pode-se concluir finalmente que todos os objetivos propostos neste trabalho foram atingidos.

Uma vez que foi coletada a quantidade total de amostras propostas, o DNA viral foi extraído e a prevalência de cada tipo viral determinada de acordo com as cinco regiões do país.

Além disso o desenho dos *primers* e sondas e padronização da técnica provou-se eficiente e específica para cada tipo viral como observado na curva de diluição e detecção de amostras positivas.

6. Considerações Finais

Este trabalho padronizou a técnica de qPCR para os EcPV3, 4, 5 e 6, além de determinar a prevalência viral em cinco diferentes regiões do país.

De acordo com Lange et al. (2013) a PCR é uma das técnicas mais sensíveis para detecção de PV em lesões. Em papilomatoses humanas é considerado o melhor método diagnóstico uma vez que além de permitir a diferenciação entre os tipos virais a amostra inicial pode ser retirada apenas do raspado de outras técnicas como lâminas coradas ou tecidos embebidos em parafina (MULLIS et al., 1994).

Mackay et al. (2002) além de reforçar que em se tratando de DNA o PCR é a técnica considerada padrão ouro ainda acrescenta que a qPCR tem como benefícios a rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e menores chances de contaminação. Pode-se inferir que sua especificidade analítica também seja um ponto positivo, uma vez que a sonda também é desenhada de maneira complementar ao alvo.

No entanto, com os resultados obtidos percebe-se a necessidade de estudos futuros visando identificar atividade viral na lesão e tentativa de isolamento de novos vírus.

É válido ressaltar para as considerações finais que todas as amostras positivas no PCR convencional por HERNANDEZ (2015) foram sequenciadas. Destas cinco foram dadas como incompatíveis para o EcPV4, nove para o EcPV3 e três para o EcPV6. Todas essas amostras foram negativas na qPCR, demonstrando a especificidade analítica desta e a complementariedade das duas técnicas para evitar falsos positivos, uma vez que o custo para sequenciamento supera o custo da qPCR.

BIBLIOGRAFIA

- ALFIERI, A.A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.F. Papillomaviridae. In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. 2012. 2ª Ed. p 463-480.
- ANTONSSON, A., HANSSON, B.G. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.* 76, 12537–12542. 2002.
- BERNARD, H-U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; DOORLAERS, K.; HAUSEN, H.; VILLIERS, E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. V.401. p.70–79. 2010
- BOGAERT, L.; WILLEMSSEN, A.; VANDERSTRAETEN, E.; BRACHO, M.A.; BAERE, C.; BRAVO, I.G.; MARTENS, A. EcPV2 DNA in equine genital squamous cell carcinomas and normal genital mucosa. *Veterinary Microbiology*. v.158. p.33–41. 2012.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. v.55:4. p.611–622. 2009.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. *Perspectivas para o Agronegócio em 2015*. CEPEA. Piracicaba, dezembro/2014. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_Perspectivas%20Agroneg2015_relatorio.pdf> Acesso em: 29/09/2015
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. *Relatório Pibagrobrasil*. 2015. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_PIB_BR_jun_final.pdf> Acesso em: 29/09/2015
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Brasília: CNA, 2014. 68p. Disponível em: < http://cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo_resumo.pdf> Acesso em: 27/09/2015
- COX, M.M.; DOUDNA, J.A.; O'DONNELL M. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. 1ed. PortoAlegre: Artmed. 2012. p.914.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I.G.; STOLER, M.; BROKER, T.R.; STANLEY, M.A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 30S. p55-70. 2012

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WEGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R.; SMITH, T.F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19, No. 1. p. 165–256. 2006

FEI. 2015. *2015 VETERINARY REGULATIONS 13th Edition 2014, effective 1 January 2015*. Disponível em: <http://www.fei.org/sites/default/files/2015Vet_Regs%20-%20Clean%20version_3.pdf> Acesso em: 27/09/2015

GISSMANN, L. Respostas Imunológicas à Infecção Pelo Papilomavírus Humano. In: *Papilomavirus Humano HPV*. 1997. 1ed. p45-58

GORINO, A.C.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; TANIWAK, S.A.; BASSO, R.M.; ZAKIA, L.S.; ARAUJO, J.P.; BORGES, A.S. Use of PCR to estimate the prevalence of *Equus caballus* papillomavirus in aural plaques in horses. *The Veterinary Journal*. V 197, I 3. p.903–904. 2013.

HERNANDEZ, J.M. Pesquisa do DNA viral de papilomavirus equino em lesões de placa aural. 2015. 64 folhas. Dissertação. FMVZ Unesp Botucatu, São Paulo. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro, V.41, p1-108, 2013. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2013_v41_br.pdf> Acesso em: 28/09/2015

JACKSON, H.A. Papillomatosis (Warts). In: *Current Therapy in Equine Medicine*. 2003. 5ed. p 212-213

LANGE, C.E.; VETSCH, E.; ACKERMANN, M. FAVROT, C.; TOBLER, K. Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. *Journal of General Virology*. 94. P.1365–1372. 2013

LIMA, R.A.S.; FERRUCCI, A.C. Comércio internacional de cavalos vivos: evolução, competitividade e agenda de pesquisa para o Brasil. XLV CONGRESSO DA SOBER, 2007. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/6/201.pdf>> Acesso em: 27/09/2015

- LONGWORTH, M.S.; LAIMINS, L.A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, V.68, N°2. p.362-372. 2004
- MULLIS, K.B; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. The Polimerase Chain Reaction. 1ed. Birkhauser Boston. 1994. 458p.
- MUNDAY, J.S.; KIUPEL, M. Papillomavirus-Associated Cutaneous Neoplasia in Mammals. *Veterinary Pathology*. 47(2). p.254-264. 2010
- NASIR, L.; BRANDT, S. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Veterinary Microbiology* 167. p.159–167. 2013.
- OIE. 2015. *Biological Threat Reduction Strategy: strengthening global biological security*. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Biological_Threat_Reduction_Strategy_jan2012.pdf> Acesso em: 27/09/2015
- PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A.; HAYS, J.P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 1ed. Springer. 2008. 327p.
- PERELLADA, C.I.; PEREYRA, E.A.G. Papilomavíruses Humanas. In: *Tratado de Infectologia*. V1. 4ed. p681-698. 2009.
- REBRIKOV, D. V.; TROFIMOV, D.Y. Real-Time Pcr: A Review Of Approaches To Data Analysis. *Applied Biochemistry And Microbiology*. Vol. 42 No. 5. p.455-463. 2006.
- SCOTT, D.W.; MILLER JR, W.H. Equine Dermatology. 2ed. Elsevier 2011. 536p.
- SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS, Dados Do Rebanho Equino Minas Gerais E Brasil 2015. Disponível em <http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Pecuaria/2015/abr/equideocultura_abr_2015.pdf> Acesso em: 11/10/2015
- SELLON, D.C. Papillomavirus Infections. In: *Equine Infectious Disease*. 1ed. p226-232. 2007
- SOUSA, N.R.; ADORNO, V.B.; MARCONDES, J.S.; OLIVEIRA FILHO, J.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; AMORIM, R.L.; BORGES, A.S. Características clínicas e histopatológicas da placa aural em eqüinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha. *Pesq. Vet. Bras*. 28(6). P.279-284. 2008

- TORRES, S.M.F.; KOCH, S.N. Papillomavirus-Associated Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. V29, Issue 3. p643-655. 2013
- VILLIERS, E.-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.-U.; HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. V.324. p 17-27. 2004.
- ZAKIA, LS; BASSO, R.M.; OLIVO, G.; HERMAN, M.; ARAÚJO JR, J.P.; BORGES, A.S.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Detection of papillomavirus DNA in formalina-fixed paraffin-embedded equine aural plaque sampes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. V6, n4. p.1193-1196. 2015.

9. ARTIGO – Trabalho enviado e aprovado para publicação na revista VETERINARY DERMATOLOGY

Normas para publicação:

Scientific Papers and Brief Communications

Manuscripts should be arranged as follows: title; acknowledgements; abstract; text with subdivisions as given below; references; legends for illustrations.

Case Reports

These are usually a chronological description of the case describing the history, physical findings, differential diagnoses, diagnostic tests, specialist diagnostic procedures, diagnoses, treatments and outcome.

Title Page

The title of the article should be concise but informative. Drug trade names will not be included in the title. The first name, middle initial(s), and last name of each author must be given. Professional affiliations of the authors at the time of the study should be indicated using the symbols *, †, ‡, §, ¶, then **, †† etc., in this order; these are not superscripts. Titles (e.g. professor) and qualifications (e.g. DipACVD) are not required.

Please provide full address details for all of the authors. If an author's affiliation has changed since the study was performed, the author's new affiliation should be identified. The name of the corresponding author, any conflicts of interest and sources of funding (see section 2.5) should be stated. If information in the text has been presented at a scientific meeting, this should be indicated. A short running title of no more than 40 characters (counting letters and spaces) should also be included. The short running title will be used in the journal at the top of the page, see current publications. Keywords are NOT required.

Abstract

The abstract should be no more than 250 words and must be constructed using the subheadings given below. While this format is most appropriate for scientific studies, the authors of reviews, brief communications and case reports are encouraged to also provide a structured abstract using the following:

- Background – A brief explanation of why the study was performed.
- Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.
- Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g. research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g. disease status).
- Methods – A statement of overall study design (e.g. randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.
- Reports of clinical trials should try to comply with the REFLECT guidelines <http://www.reflect-statement.org/statement/>.

Introduction

State the purpose of the article. Summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references and do not review the subject extensively.

Materials and Methods

These should be described in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. References for study design and statistical methods should be to standard works (with pages stated) when possible rather than to papers where designs or methods were originally reported. Specify any statistics computer programs used. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial).

The methods of data collection and use of statistical analysis will be checked by the referees, editors and, if necessary, a statistician. It is highly recommended that authors consult a professional statistician for advice on complex statistical

analyses. It is also recommended that authors provide details of which statistical methods and the *P*-value, if relevant, have been used for each component of the data set (e.g. $P = 0.08$; ANOVA).

Drugs and therapeutic agents should be given in the format: drug ingredient (trade name; manufacturer name, city, (state), country), e.g. fenbendazole (Panacur; Intervet-Schering Plough, Milton Keynes, UK).

Drug names should follow the recommended International Non-Proprietary Names (rINN). Common examples include cefalexin, ciclosporin, meticillin and rifampicin.

Products such as equipment or methods should be given as: Product name (Company name; town or city, (state) and country); e.g. Datex CD 200-02 (Datex; Hatfield, UK); or SuperScript[®] III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The detailed information about drugs, therapeutic agents and products need only be given once.

Results

Present your results in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Do not repeat in the text data in the tables or illustrations. In manuscripts describing more than one animal, all animals should be assigned a case number.

Discussion

The discussion should emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Include the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly indicate them as such.

Recommendations, when appropriate, may be included.

Acknowledgements (should be made on the title page or as a separate supplementary file and not included on the manuscript). These are to indicate support, advice or technical help that does not justify authorship. Please use first and second (family) names, e.g. The authors would like to thank Fred Flintstone for assistance with statistical analysis.

Funding sources should be included in the declared sources of funding (see section 2.5).

Language and style

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript thoroughly, and preferably professionally, edited by an English speaking person before submission to make sure that the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author; use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Imiquimod treatment for *Equus caballus* papillomavirus infection in equine aural plaques

Abstract

Background - Aural plaques are a dermatopathy associated with *Equus caballus* papillomaviruses (EcPVs). This disease affects horses of all ages, genders and breeds and causes sensitivity of the ears, which has been reported by several owners.

Hypothesis/Objectives - The aim of this study was to evaluate the clinical efficacy of 5% imiquimod cream for the treatment of aural plaques and to compare the PCR detection of EcPV 3, 4, 5 and 6 before and after treatment.

Animals - Eight horses diagnosed with aural plaques (14 ears) were used in this study. Three mares with aural plaques were used as a control group (untreated group).

Methods - The imiquimod cream was applied topically on non-consecutive days until complete resolution of the aural plaques was noted. The animals were evaluated clinically for 180 days after the end of treatment. PCR for detecting EcPV 3, 4, 5 and 6 was performed using aural plaque biopsies collected before treatment and at 90 days after the end of treatment.

Results – Clinical resolution was observed in 93% of the treated ears. Imiquimod treatment promoted the clearance of EcPV in 71.4% of the treated ears. Clinical remission of the aural plaques and changes in EcPV DNA positivity in the first and second biopsies were not observed in the control group.

Conclusions – The results of this study support the hypothesis that 5% imiquimod cream may be used as an effective treatment for aural plaques in horses because high rates of clinical resolution and EcPV clearance were observed.

Introduction

Aural plaques are a dermatopathy associated with *Equus caballus* papillomaviruses (EcPVs) 3, 4, 5 and 6.^{1,2,3} The lesions have a verrucous aspect and are located on the inner surface of the pinna in horses, and they affect horses of all breeds, genders and ages.^{4,5} In Brazil, equine aural plaques are a potentially significant problem because horses with this disease may be prevented from participating in certain sporting or exhibition events.⁶ Additionally, the disease decreases the commercial value of horses with severe lesions, causing economic losses.⁶ Moreover, aural plaques may cause ear sensitivity; sensitivity was observed in almost 70% of horses examined in a previous study, and the animals showed resistance to touching of the ears and bridling.⁷ A previous study demonstrated that 35% of the Quarter Horses and 57% of the Mangalarga breed horses in Sao Paulo State, Brazil, had unilateral or bilateral lesions.⁶ Another study found aural plaque lesions in 22% of horses from ranches in Oregon, USA.⁴

Typically, an aural plaque diagnosis is based on clinical⁶ and/or histopathological findings in cases in which it is possible to detect characteristics of papillomavirus lesions such as koilocytosis, increases in the number and size of keratohyalin granules, papillated epidermal hyperplasia and epidermal hypomelanosis.^{6,8} Moreover, the diagnosis may be supported by immunohistochemistry⁵ and PCR.⁹

Although the lesions do not regress spontaneously,^{4,5} a few anecdotal treatments have been reported,¹⁰ such as biopsy and shaving off of the lesions, which stimulates temporary regression.⁷ The treatment of equine papillomatosis using ivermectin,¹¹ cisplatin eletrochemotherapy,¹² and *Sanguinaria canadensis* extract (eastern bloodroot) in zinc chloride has been reported;⁵ however, the efficacies of these products against aural plaques have not been proven.

Although 5% imiquimod cream was initially approved to treat anal and genital warts in humans,^{13,14,15} some studies have recommended topical imiquimod for the treatment of sarcoid¹⁶ and aural plaques in horses.⁷ Imiquimod is a imidazoquinoline amine and an immune response modifier with a topical action due to its hydrophobic properties. Its mechanism of action is through toll-like receptor 7 and 8 activation, which stimulates IFN- α synthesis. Therefore, an induction of proinflammatory cytokines, chemokines and other mediators occurs, leading to the activation of antigen-presenting cells and consequently to indirect antiviral activity.¹⁵

Complete resolution of aural plaques has been reported in 87.5% of horses treated with imiquimod cream.⁷ Although a previous study evaluated the efficiency of 5% imiquimod cream for the treatment of aural plaques,⁷ EcPV DNA detection was not performed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficacy of 5% imiquimod for the treatment of aural plaques and to assess the presence of papillomaviruses by PCR before and after treatment.

Materials and methods

All experiments were performed according to the Institutional Animal Care and Use Committee (120/2013-CEUA) of the University. Eight adult horses (four males and four females) diagnosed with aural plaques were used in this study. Horses were included in this study if they had never received any treatment for aural plaques and if EcPV 3, 4, 5 or 6 DNA was detected by PCR before the treatment (first biopsy). The sample size was calculated using the McNemar test¹⁷ to detect treatment efficiency of 80 to 90%.⁷ The calculated sample size was six animals, and we included two animals above the minimum needed for the study. Using the same selection criteria as that used for the treated group, three adult crossbreed mares diagnosed with aural plaques were selected and used as a control group (untreated group); these mares were observed throughout the study to evaluate clinical signs of spontaneous remission.

The animals in the treated group (two Quarter Horses, one Paint Horse, one Mangalarga and four crossbreed horses) had unilateral (n=2) or bilateral (n=6) aural plaque lesions, for a total of 14 treated ears. The horses were housed in individual covered stalls and received the same feed during the experiment. A thin layer (125 mg) of 5% imiquimod cream (Modik[®], Germed Farmacêutica Ltda, Hortolândia, Brasil) was applied to the inner surface of the pinna. The cream covered the entire surface, not only the lesions, and was applied on non-consecutive days. Before each application, the crusts were removed with dry gauze or soaked in sterile water. If the horse was too reactive for ear manipulation, it was sedated with detomidine hydrochloride (20 µg/kg of body weight). Sedation was performed for all procedures for which the horse showed signs of stress. The treatment was discontinued once complete resolution of the aural plaque was noted. Then, the animals were examined daily for 90 days. Treatment was restarted if any sign of an aural plaque lesion was observed. The animals were also evaluated clinically at 180 days after the end of the treatment.

For the treated group, aural plaque samples were obtained by biopsy with a disposable 4-mm punch before (first biopsy) and at 90 days after the end of treatment (second biopsy). The first and second biopsies were obtained from the same region of the inner surface of the pinna. The mares in the control group were subjected to two biopsy procedures with an interval of 90 days. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C prior to the DNA extraction procedure.³ PCR for EcPV 3, 4, 5 and 6 was performed using specific primers and conditions that have been previously described.¹⁸ Additionally, a 'no-template' control reaction was performed to verify the absence of contamination for each PCR. The PCR products were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis. All of the obtained PCR products were the predicted size for each primer set. The PCR products were purified with a NucleoSpin Gel and PCR Clean Up Kit (Macherey-Nagel®, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany) following the manufacturer's instructions and sequenced using a BigDye Kit (Life Technologies™, Carlsbad, California, EUA) and 3500 Genetic Analyser (Life Technologies). The sequences were compared using the Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information, USA), and the L1 sequences were deposited in GenBank for each of the four EcPVs. All of the sequences showed homology only to the EcPV for which the primers were designed.

Results and discussion

In the present study, seven horses (87.5%) exhibited sensitivity of the affected ears prior to treatment, and the extent of the lesion directly influenced the symptoms. All six animals with coalescent lesions showed severe sensitivity, whereas the horses with a punctate lesions showed no sensitivity or mild sensitivity (**table 1**).

Although few studies have investigated the treatment of aural plaques, imiquimod seems to be the most effective option. In contrast to a previous study in which 5% imiquimod cream was applied to aural plaques three times per week on non-consecutive days every other week⁷, herein, the treatment protocol consisted of application of the cream on non-consecutive days until complete clinical resolution of the aural plaques was observed. Four of the eight treated horses (six ears) did not show signs of recurrence after the first treatment session. The other horses showed signs of recurrence between 30 and 75 days after the first treatment session, and then the second treatment session was started. Two horses showed signs of recurrence after the second treatment session and underwent a third treatment session. On average, 18 imiquimod applications were necessary (ranging from eight to 30 applications). Ninety days after the last treatment, none of the horses showed signs of

aural plaques; however, a punctate lesion was noted in one ear of a horse at 180 days post-treatment (the right ear of animal 5, **table 1**). Therefore, clinical resolution was observed in 88% of the treated animals and in 93% of the treated ears. A similar clinical resolution rate of equine aural plaques after imiquimod treatment was observed in a previous study.⁷ Although it varies, the efficacy rate of imiquimod for human papillomavirus (HPV)-related lesions may be similar to that observed in equine aural plaque treatment (e.g., the complete resolution of anogenital warts using 3.75% imiquimod cream ranges from 45 to 78.5%,¹⁹ and the complete response rate to imiquimod treatment in HPV-related vaginal intraepithelial neoplasia ranges from 5 to 88%).²⁰

The animals were kept in indoor pens during the treatment period because exposure to the sun was contraindicated due to a high risk of sunburn. Because removal of the crust prior to treatment may be painful,⁷ another important point regarding the use of imiquimod for the treatment of equine aural plaques is the need for sedation of the animals prior to each application. In the present study, the ears of all of the horses were very sensitive during the cleaning process of the treatment, and 75% of the horse had to be sedated with detomidine prior to treatment (**table 1**). This sensitivity is a consequence of the adverse effects (inflammatory processes) commonly observed during imiquimod treatment,⁷ which include erythema, oedema, erosion to ulceration, exudation and crusting. These adverse effects were also observed in the present study (**figures 1, 2 and 3**). A total of 57.1% (4/7) of the horses that showed sensitivity of the ears prior to the treatment demonstrated no sign of discomfort or pain a few weeks after the end of the treatment. The only noticeable change after the treatment was development of an area of focal depigmentation on the inner surface of the pinna (**figure 4**), as described in a previous study.⁷ Adverse effects are frequently reported in humans treated with 5% imiquimod cream; the intensities of these effects range from mild to severe, and in some cases, it is necessary to stop or reduce the dose of the treatment.²⁰ A formulation with a lower concentration of imiquimod (e.g., 3.75%) has been used in humans to reduce the severity of adverse effects, permit daily application of imiquimod and reduce the rate of treatment discontinuation.¹⁹ In the present study, we used human commercial formulations containing 5% imiquimod similar to a previous study.⁷ Unfortunately, a commercial formulation of imiquimod for horses or a human formulation with a lower concentration of imiquimod is not available in Brazil. Therefore, in the present study, the intensity of the adverse effects was not compared with the imiquimod concentration used to treat the horses. However, the intensity of the adverse effects previously described in horses treated with imiquimod for aural plaques

three times per week on non-consecutive days every other week⁷ did not differ from that of the current study, in which the cream was applied on non-consecutive days until complete resolution of the aural plaques was observed. In the current study, a mean of 18 imiquimod applications was necessary to complete the treatment, and a half sachet (125 mg imiquimod) was used for each application per ear. Thus, the cost of the complete treatment (on average) with imiquimod cream was US\$18.00 per ear. However, the costs of veterinarian's fees and anaesthetic and sedative drugs should be added to this amount.

EcPV DNA was detected by PCR in all 14 aural plaque samples collected before treatment (**table 2**). EcPV 3 was found in 29% (4/14) of the ears, EcPV 4 was detected in 100% (14/14), EcPV 6 was observed in 50% (7/14), and EcPV 5 was not detected. In the treated group, coinfection was observed in 10 ears, and a total of 60% (6/10) of the coinfections involved EcPV 4 and 6, 30% (3/10) involved EcPV 3 and 4, and 10% (1/10) involved EcPV 3, 4 and 6. PCR performed at 90 days after the end of treatment (second biopsy) using DNA purified from auricular cutaneous samples revealed the presence of EcPV DNA in four ears (EcPV 4, n=2; and EcPV 6, n=3). However, a punctate aural plaque was noted in only one of these four ears at 180 days post-treatment. Therefore, imiquimod treatment promoted the clearance of EcPV in 71.4% (10/14) of the ears (**table 2**). The activation of IFN and the cell-mediated immune response by imiquimod has been described both during and after imiquimod treatment of human genital warts, and this activation might lead to a significant reduction in the HPV load and the elimination of clinically visible warts.²¹ The previous study⁷ describing the treatment of aural plaques with imiquimod did not assess the presence of EcPV DNA before or after the end of treatment. Therefore, the clearance of EcPV observed in the present study after imiquimod treatment of aural plaques cannot be compared with the results of previous studies of horses.

There was no clinical remission of the aural plaques in the animals in the non-treated group in this study (**table 1**), and the EcPV DNA detection rates by PCR were similar for the first and second aural plaque biopsies (**table 2**). These findings are in contrast with those of human genital warts caused by HPV, in which spontaneous regression of the warts is commonly observed,^{19,21} and in young horses with classical equine viral papillomatosis associated with EcPV 1,²² in which complete spontaneous remission of the lesions may occur within a few weeks. Indeed, the spontaneous remission of equine aural plaques rarely occurs.⁵ Therefore, the treatment of the lesions with imiquimod described herein and in a previous study⁷ may represent an alternative for

resolving this neoplasm. However, because aural plaque transmission may occur between horses, possibly via ectoparasites such as mosquitoes and ticks,^{5,6} and treatment may not prevent future infection, it is essential that healthy horses avoid contact with horses with aural plaques, even indirect contact via ectoparasites. Recently, researchers have developed and recommended a prophylactic vaccine containing EcPV 2 L1 virus-like particle for EcPV 2-associated genital tumours and the related disease in equids.²² Although EcPV 2 has not yet been associated with aural plaques, the development of vaccines against EcPVs can be an important tool for preventing infection of horses with these viruses.

Conclusions

Imiquimod cream (5%) may be used to effectively treat aural plaques in horses because a high rate of clinical resolution and clearance of EcPV were observed in the present study.

Figure legends



Figure 1. Left ear of horse 7 before treatment, with coalescent aural plaque lesions.



Figure 2. Left ear of horse 7 after five applications of 5% imiquimod cream. Aural plaque lesions can be observed at the base and top of the ear, and areas with erythema, oedema, erosion and crusting are present.



Figure 3. Left ear of horse 7 after 12 applications of 5% imiquimod cream. Only adverse effects associated with the inflammatory process were observed.



Figure 4. Left ear of horse 7 at 90 days post-treatment. Complete clinical resolution of the aural plaques and a focal depigmentation area can be observed on the inner surface of the ear.

References

1. Lange CE, Tobler K, Ackermann M, *et al.* Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. *Vet Microbiol* 2011; 149: 85-90.
2. Lange CE, Vetsch E, Ackermann M, *et al.* Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. *J Gen Virol* 2013; 94: 1365-1372.
3. Taniwaki SA, Gorino AC, Oliveira-Filho JP, *et al.* Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. *Vet Microbiol* 2013; 162: 85-93.
4. Binninger CE, Piper RC. Hyperplastic dermatitis of the equine ear. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 153: 69-75.
5. Scott DW, Miller WH. *Equine Dermatology*. Maryland Heights, MO: Saunders, 2011; 700-707.
6. Souza NR, Adorno VB, Marcondes JS, *et al.* Clinical and histopathological characteristics of the aural plaque in Mangalarga and Quarter Horses. *Pesq Vet Bras* 2008; 28: 279-284.
7. Fairley RA, Haines DM. The electron microscopic and immuno- histochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. *Vet Pathol* 1992; 29: 70-81.
8. Gorino AC, Olivera-Filho JP, Taniwaki SA, *et al.* Use of PCR to estimate the prevalence of *Equus caballus* papillomavirus in aural plaques in horses. *Vet J* 2013, 197: 903-904.
9. Smith BP. *Large Animal Internal Medicine*. St. Louis, MO: Mosby, 2009; 1317-1318.
10. Torres SMF, Malone ED, White SD, *et al.* The efficacy of imiquimod 5% cream (Aldara) in the treatment of aural plaque in horses: a pilot open label clinical trial. *Vet Dermatol* 2009; 21: 503-509.
11. Aslan O, Oruç E. Is it possible to treat equine papillomatosis with Ivermectin given orally? *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 1065-1068.

12. Tamzali Y, Borde L, Rols MP, *et al.* Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases. *Equine Vet J* 2012; 44: 214-220.
13. Kreuter A, Potthoff A, Brockmeyer NH, *et al.* Imiquimod leads to a decrease of human papillomavirus DNA and to a sustained clearance of anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected men. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2078-2083.
14. Pressanti C, Cadiergues MC. Imiquimod: Mode of action and implication in treatment of cutaneous viral infections in humans and animals. *Pratique Médicale et chirurgicale* 2013; 48: 105-112.
15. Brandt HRC, Fernandes JD, Patriota RCR, *et al.* Treatment of human papillomavirus in *childhood with imiquimod 5% cream*. *An Bras Dermatol* 2009; 84: 549-553.
16. Nogueira SAF, Torres SMF, Malone ED, *et al.* Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of equine sarcoids: a pilot study. *Vet Dermatol* 2006; 17:259-65.
17. Pagano M, Gauvreau K. Principles of Biostatistics. Belmont, CA, Duxbury Press, 2000.
18. Zakia LS, Basso RM, Olivo G, *et al.* Detection of papillomavirus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded equine aural plaque samples. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015; 67: 1193-1195.
19. Baker DA, Ferris DG, Martens MG, *et al.* Imiquimod 3.75% cream applied daily to treat anogenital warts: combined results from women in two randomized, placebo-controlled studies. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011; 2011: 11.
20. de Witte CJ, van de Sande AJ, van Beekhuizen HJ, *et al.* Imiquimod in cervical, vaginal and vulvar intraepithelial neoplasia: A review. *Gynecol Oncol* 2015, Aug 31. pii: S0090-8258(15)30110-4. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.08.018. [Epub ahead of print]
21. Arany I, Tying SK, Stanley MA, *et al.* Enhancement of the innate and cellular immune response in patients with genital warts treated with topical imiquimod cream 5%. *Antiviral Res* 1999; 43: 55-63.

22. Ghima SJ, Rectorb A, Deliusc H, *et al.* Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1108-1115.
22. Schellenbacher C, Shafti-Keramat S, Huber B, *et al.* Establishment of an in vitro equine papillomavirus type 2 (EcPV2) neutralization assay and a VLP-based vaccine for protection of equids against EcPV2-associated genital tumor. *Virology* 2015; 486:284-290.

Table 1: Clinical evaluation of the horse lesions.

Horse / ear	Initial characteristics of the lesions	Total number of treatments	Observation during the treatment	Final observation
Animal 1 (Right ear)	Coalescent Severe sensitivity*	30	Sedation since the second application. Twelve initial treatments, relapse after 30 days. Ten more treatments, relapse after 60 days. Eight more treatments.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Animal 1 (Left ear)	Coalescent Severe sensitivity	22	Sedation since the second application. Twelve initial treatments, relapse after 30 days. Ten more treatments.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Animal 2 (Right and Left ears)	Multiple punctate lesions Moderate sensitivity	12	Sedation only during the last application.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Animal 3 (Left ear)	Punctate No sensitivity	8	Did not need sedation during the treatment.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Animal 4 (Right ear)	Punctate Mild sensitivity	10	Did not need sedation during the treatment.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Animal 5 (Right and Left ears)	Multiple punctate lesions Mild sensitivity	26	Sedation since the fifth application. Eight initial treatments, relapse after 45 days. Ten more treatments, relapse after 60 days. Eight more treatments.	No sign of lesion after 90 days post-treatment. However, a punctate lesion was noted on the right ear after 180 days post-treatment.
Animal 6 (Right and Left ears)	Coalescent Severe sensitivity	24	Sedation since fourth application. Twelve initial treatments, relapse after 60 days. Twelve more treatments.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Animal 7	Coalescent	12	Sedation since the first application.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.

(Right and Left ears)	Severe sensitivity			
Animal 8	Coalescent	18	Sedation since second application.	
(Right and Left ears)	Severe sensitivity		Ten initial treatments, relapse after 75 days. Eight more treatments.	No sign of lesion after 180 days post-treatment.
Control 1	Punctate		Not treated	The lesions were still exactly the same as 90 days before. The animal still presented severe sensitivity.
(Left ear)	Severe sensitivity			
Control 2	Punctate		Not treated	The lesions were still exactly the same as 90 days before. The animal still presented severe sensitivity.
(Left ear)	Severe sensitivity			
Control 3	Punctate		Not treated	The lesions were still exactly the same as 90 days before. The animal still presented severe sensitivity.
(Left ear)	Severe sensitivity			

*Sensitivity of the ear was classified as no sensitivity (no reaction to palpation), mild sensitivity (mild reaction to palpation), moderate sensitivity (resistance to palpation, the animal only allowed the ear to be touched when in stocks), and severe sensitivity (violent reaction to palpation, the animal only allowed the ear to be touched after sedation).

Table 2: PCR results of the aural plaque samples obtained by biopsy procedures before (first biopsy) and at three months (second biopsy) after the end of treatment with 5% imiquimod cream and the PCR results of the aural plaque biopsy samples obtained from the control group mares.

		EcPV PCR results	
Samples		First biopsy	Second biopsy
Animal 1	Right ear	EcPV 4	not detected
	Left ear	EcPV 4 and 6	not detected
Animal 2	Right ear	EcPV 4	not detected
	Left ear	EcPV 4	not detected
Animal 3	Left ear	EcPV 3 and 4	not detected
Animal 4	Right ear	EcPV 3 and 4	not detected
Animal 5	Right ear	EcPV 3, 4 and 6	EcPV 4 and 6
	Left ear	EcPV 4 and 6	not detected
Animal 6	Right ear	EcPV 4 and 6	not detected
	Left ear	EcPV 4 and 6	EcPV 6
Animal 7	Right ear	EcPV 4	not detected
	Left ear	EcPV 4 and 6	EcPV 4
Animal 8	Right ear	EcPV 4 and 6	EcPV 6
	Left ear	EcPV 3 and 4	not detected

Control 1	Left ear	EcPV 4 and 6	EcPV 4 and 6
Control 2	Left ear	EcPV 4	EcPV 4
Control 3	Left ear	EcPV 4	EcPV 4
