

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PESQUISA DO DNA VIRAL DE PAPILOMAVIRUS EQUINO EM  
LESÕES DE PLACA AURAL**

**JULIANA MIRA HERNÁNDEZ**

Botucatu-SP  
Novembro 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PESQUISA DO DNA VIRAL DE PAPILOMAVIRUS EQUINO EM  
LESÕES DE PLACA AURAL**

**JULIANA MIRA HERNÁNDEZ**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Adj. Alexandre Secorun Borges.

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Paes de Oliveira-Filho

Botucatu- SP

Novembro 2015

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

Hernandez, Juliana Mira.

Pesquisa do DNA viral de papilomavirus equino em lesões de placa aural / Juliana Mira Hernandez. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: José Paes de Oliveira-Filho

Capes: 50501062

1. Equino - Doenças. 2. Cavalo - Doenças. 3. Doenças do vírus do papiloma. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Papilomavírus. 6. DNA - Pesquisa.

Palavras-chave: Equinos; Equus caballus papilomavirus; PCR.

Nome do autor: Juliana Mira Hernández

Título: Pesquisa do DNA viral de papilomavirus equino em lesões de placa aural.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Adj. Alexandre Secorun Borges

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP-Botucatu

Prof. Adj. João Pessoa Araújo Junior

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências- UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP-São Paulo

Data da Defesa: 16 de novembro de 2015

## Dedicatória

Aos meus pais, **Augusto e Maria Helena**, pelo amor, educação e apoio em todos meus projetos.

A minhas irmãs, **Natalia, Carolina e Valeria**, pelo amor e acompanhamento constante, e por me ensinar o sentido da fraternidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a **Deus**, por sempre ter me acompanhado.

Aos **meus amigos colombianos e peruanos** no Brasil, em especial a Diego N. Rodriguez, Lina M. Delgado, Gabriela Pacheco, Carmen A. Daza e Viviana Vallejo, pela companhia constante e pelos conselhos que fizeram a vida em outro país muito mais fácil.

Aos **meus amigos de sempre**, José L. Bedoya, Silvia Posada, Sebastián Ordoñez, Lizeth Quintana, Sara Restrepo, Catalina D'Amato e Cristian Castillo, que de algum jeito me acompanharam e ajudaram desde a Colômbia e o Chile.

Aos **meus amigos brasileiros**, em especial a Aline Angella e Giovane Olivo, pela transparência, sinceridade e apoio desinteressado.

Aos **meus colegas da salinha e da salinha do lado**, Campo Amor, César, Danilo e Anelize, pela amabilidade e ajuda, em especial a Mariana pela ajuda nas coletas e o apoio no projeto.

Ao **Professor José Carlos de Figueiredo Pantoja**, por ter me ensinado muitas coisas especialmente que a qualidade do trabalho inicia com a dedicação.

Aos **meus colegas das consultorias da estatística**, pela ajuda e os bons momentos trabalhando junto.

Ao **Professor Alexandre Secorun Borges**, por ter me recebido e ter facilitado a possibilidade de cumprir um sonho.

Ao **Professor José P. Oliveira-Filho**, pela orientação constante e pelo apoio em todas as coisas do meu projeto.

Ao **Professor João Pessoa Araújo Jr**, pela colaboração permanente com o projeto.

Ao **Programa Convenio Estudante de Pós-graduação (PEC-PG) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq** pela concessão da bolsa (processo: 190237/2013-9).

## LISTA DE TABELAS E CUADROS

<b>Quadro 1.</b> Proteínas codificadas pelo papilomavirus e suas funções.....	14
<b>Tabela 1.</b> Sequências de <i>primers</i> com tamanho do produto amplificado e temperatura de anelamento de cada <i>primer</i> .....	23
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos equinos amostrados e positivos em cada região.....	26
<b>Tabela 3.</b> Frequência de detecção segundo o tipo de papilomavirus.....	26
<b>Tabela 4.</b> Frequência de detecção por tipo de papilomavirus no total das amostras em cada região.....	27
<b>Tabela 5.</b> Distribuição das coinfeções dos papilomavirus.....	28
<b>Tabela 6.</b> Frequência das características da lesão (distribuição e tipo) segundo a presença de coinfeção.....	29
<b>Tabela 7.</b> Frequência das características da lesão (distribuição e tipo) segundo o tipo de papilomavirus.....	29

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Genoma do papilomavirus HPV 16.....9
- Figura 2.** Representação esquemática do ingresso do papilomavirus humano na célula.....11
- Figura 3.** Representação esquemática da pele para indicar o padrão de expressão do HPV enquanto a célula infectada migra em direção à superfície epitelial..... 15
- Figura 4.** Representação dos quadrantes nas orelhas; OE: orelha esquerda, OD: orelha direita; os números dos quadrantes estão indicados na figura.....22
- Figura 5.** Orelhas com lesões de placa aural; categorias das lesões: A —“uma cinco pontos”, B —“multiponto”, C “coalescente”.....22

**LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SIMBOLOS**

- = menos

% = porcentagem

® = marca registrada

°C = graus Celsius

µL = microlitro

amp = amps

bp = pares de bases

DNA = ácido desoxirribonucleico

EcPV = *Equus caballus papillomavirus*

g = força g

GAG = cadeias de glicosaminoglicano

HPV = papilomavirus humano

HSPG = proteoglicanos de heparan sulfato

ICTV = International Committee on Taxonomy of Viruses

kg = kilograma

LCR = região controladora ou “log control region”

mg = miligrama

mL = mililitro

mm = milímetros

nm = nanômetros

nM = nanomolar

ORF = sequência aberta de leitura ou “open reading frame”

PCR = reação em cadeia pela polimerase

pmol = picomol

PsV = pseudovirions de papilomavirus

PV = papilomavirus

W = watts

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Família Papillomaviridae.....	5
2.2. Características dos papilomavirus.....	6
2.2.1. Classificação.....	6
2.2.2. Estrutura do vírus.....	8
2.2.3. Organização genômica.....	8
2.2.4. Ciclo de vida.....	10
2.2.4.1. Ingresso na célula hospedeira.....	10
2.2.4.1.1. Adesão.....	10
2.2.4.1.2. Mudanças na estrutura extracelular.....	11
2.2.4.1.3. Receptor de internalização.....	12
2.2.4.1.4. Endocitose.....	12
2.2.4.1.5. Sinalização.....	12
2.2.4.1.6. Transporte vesicular e desnudamento.....	13
2.2.4.2. Expressão de proteínas virais.....	13
2.2.4.3. Amplificação do genoma e egresso.....	14
2.3. Doenças causadas por papilomavirus em equinos.....	16
2.3.1. Papilomatose clássica.....	16
2.3.2. Papilomatose genital.....	16
2.3.3. Sarcoide equino.....	17
2.3.4. Placa aural.....	17
2.4. Diagnóstico dos papilomavirus.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Comitê de ética e auxílios.....	21

4.2. Amostras.....	21
4.3. Características da lesão.....	21
4.4. Extração de DNA.....	22
4.5. Técnica da PCR.....	23
4.6. Eletroforese.....	24
4.7. Purificação dos produtos de PCR.....	24
4.8. Sequenciamento.....	24
4.9. Análise dos dados.....	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÕES.....	36
8. REFERÊNCIAS.....	37
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	49

MIRA, J. **Pesquisa do DNA viral de papilomavirus equino em lesões de placa aural**. Botucatu, 2015. 59p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

A placa aural é uma doença que acomete uma ou ambas as orelhas dos equinos, caracterizada por lesões bem demarcadas, despigmentadas e geralmente cobertas por uma crosta queratinosa branca. O objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de DNA viral dos *Equus caballus papilomavirus* (EcPV) 1-7 utilizando a técnica de PCR em tecidos de placas aurais de equinos de diferentes regiões do Brasil. Foram coletadas 108 biópsias e informações das características da lesão. Foi detectada a presença de DNA dos EcPVs em 97,22% (105/108) das amostras testadas. Nenhuma amostra foi positiva para os EcPV-2 e 7. Dentre as amostras, o vírus mais frequente foi o EcPV 4 (86,67%, 91/105), seguido do EcPV 3 (42,86%, 45/105), EcPV 1 (35,24%, 37/105), EcPV 6 (18,10%, 19/105) e do EcPV 5 (1,90%, 2/105). Quando avaliada a existência de coinfeção dos diferentes vírus, 59,05% (62/105) das amostras foram positivas para mais de um tipo viral, sendo as coinfeções mais frequentes EcPV 3+4, EcPV 3+1 e EcPV 3+4+1. Nenhuma associação foi encontrada quando avaliada a lesão (tipo e distribuição) com o tipo de papilomavirus detectado e a presença de coinfeção. Os resultados indicam que além dos tipos já detectados em lesões da placa aural em outros estudos (EcPV 3 e 4) no Brasil, também foi confirmada a participação dos EcPV 1, 5 e 6 nas lesões de placa aural em equinos. Além disso, os resultados sugerem a coinfeção como um possível fator na etiologia da placa aural equina. Portanto, conclui-se que o EcPV 4 é o vírus mais detectado isoladamente ou em coinfeção, mas que outros vírus também participam da etiologia da placa aural em equinos no Brasil.

**Palavras chave:** equinos, *Equus caballus papilomavirus*, PCR

MIRA, J. **Equine papillomavirus DNA research in aural plaque lesions.** Botucatu, 2015. 59p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”.

### **ABSTRACT**

Aural plaque is a disease that affects one or both equine ears characterized by well-demarcated depigmented lesions, generally covered by a whitish keratinous crust. The aim of this study was to research the presence of *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) DNA in aural plaque lesions of horses from different regions of Brazil by PCR. One hundred eight biopsies and information about the lesion were collected. EcPVs DNA was detected in 97.22% (105/108) of the tested samples. None of the samples were positive for EcPV 2 and 7. From all samples, EcPV 4 (86.67%, 91/105) was the most frequently found, followed by EcPV 3 (42.86%, 45/105), EcPV 1 (35.24%, 37/105), EcPV 6 (18.10%, 19/105) and EcPV 5 (1.90%, 2/105). When co-infection was assessed, 59.05% (62/105) of the samples were positive for more than one virus type and EcPV 3+4, EcPV 3+1 and EcPV 3+4+1, were the most frequently co-infections. No association was found between the lesion (type and distribution) and the type of papillomavirus and presence of co-infection. These results indicate that in addition to the types (EcPV 4 and 3) already detected in Brazil, it was also confirmed the presence of the types 1, 5 and 6 in aural plaque lesions of equines. The results suggest the co-infection as a possible factor involved in aural plaque etiology. The EcPV 4 was the virus most detected alone or in co-infection, besides the other types also participate of equine aural plaque's etiology in Brazil.

**Key words:** equines, *Equus caballus papillomavirus*, PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Os papilomavirus (PV) pertencem a um grupo de vírus globalmente difundido que pode ser encontrado na pele de indivíduos doentes e sadios. São pequenos vírus DNA de fita dupla com tropismo pelos tecidos epiteliais, podendo causar proliferações na pele e mucosas (ANTONSSON e HANSSON, 2002; ANTONSSON e MCMILLAN, 2006; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015) com apresentações clínicas que variam desde verrugas auto-limitantes até câncer invasivo (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). A maioria das infecções por PV são subclínicas e não produzem lesões clínicas. A manifestação clínica depende de múltiplos fatores como: o genótipo viral e/ou do hospedeiro, o tipo de epitélio infectado e fatores ambientais (estado imunológico e nutricional do hospedeiro) (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Além disto, acredita-se que estes vírus podem permanecer em estado latente infectando as células do epitélio basal e, em casos de imunossupressão, a replicação viral pode ser aumentada desencadeando uma reinfecção (MAGLENNON e DOORBAR, 2012).

Os equinos podem ser infectados por diferentes papilomavirus desenvolvendo neoplasias benignas (papilomas) ou neoplasias com aparência maligna como o sarcoide. Os papilomas são comuns e podem se manifestar de três formas: papilomatose clássica, papiloma auricular (ou placa aural) e papilomatose genital (SCOTT e MILLER, 2003). No caso do sarcoide, encontra-se relacionado com a infecção por papilomavirus bovino tipo 1 e é considerado o tumor mais comum em equinos (WOBESER et al., 2010; VALENTINE, 2006). Os animais acometidos por papilomavirus podem ter o valor de comercialização significativamente reduzido, além de impedidos de participar de apresentações públicas e leilões (GHIM et al., 2004; SOUSA et al., 2008).

A placa aural é uma papilomatose cutânea que se apresenta com lesões pequenas [um a quatro milímetros (mm) de diâmetro e maiores de 20 mm quando coalescem], elevadas, bem demarcadas, despigmentadas (rosadas, acinzentadas ou esbranquiçadas), de superfície plana, frequentemente escamosa e ligeiramente papilomatosa, que podem ser facilmente removidas durante o exame, revelando base eritematosa e brilhante. Ocorrem uni ou bilateralmente no interior dos

pavilhões auriculares, isoladamente ou de forma múltipla (BINNINGER e PIPER, 1968; KNOTTENBELT, 1998).

Apesar da presença dos *Equus caballus papillomavirus* 3, 4, 5 e 6 já ter sido demonstrada na placa aural anteriormente através de diferentes métodos (FAIRLEY e HAINES, 1992; POSTEY et al., 2007; LANGE et al., 2011; LANGE et al., 2013; TANIWAKI et al., 2013; GORINO et al., 2013), ainda não se tem determinado no Brasil a presença dos EcPV 5 e 6 e talvez de outros tipos virais nas mesmas lesões. Além disso, não foi descrita a frequência dos tipos virais relacionados com a lesão nas diferentes regiões do país. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de DNA viral de papilomavirus equino (tipos 1-7) nas lesões de placa aural de cavalos em diferentes regiões do Brasil.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Família *Papillomaviridae*

*Papillomaviridae* é uma família diversa composta por vírus pequenos não envelopados que infectam vertebrados (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2005; BERNARD, 2005). Esta é uma das famílias virais mais antigas e em ativa expansão (ALFIERI et al., 2007). O isolamento em cultivo convencional ainda não tem sido possível (KING et al., 2012, BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Por isto, a identificação e caracterização das alterações produzidas pela infecção são difíceis de se estabelecer (KING et al., 2012; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Nos últimos anos, com os avanços na reação em cadeia da polimerase (PCR) [BERNARD, 2005], da amplificação em círculo (rolling circle amplification RCA), o sequenciamento de primeira e segunda geração e da metagenômica (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015), além do genoma relativamente estável destes vírus, foram estabelecidos algoritmos filogenéticos que tem possibilitado a comparação das sequências genômicas (ALFIERI et al., 2007; VAN DOORSLAER et al., 2013a). Modelos animais têm sido empregados para estabelecer a patogenicidade e os mecanismos de infecção dos papilomavirus humanos (PEH et al., 2002; KING et al., 2012). Os tipos de papilomavirus não humanos conhecidos até agora foram recuperados de 54 espécies diferentes que incluem mamíferos, aves e répteis (BERNARD, 2005; BRAVO et al., 2010; RECTOR e VAN RANST, 2013).

Os papilomavirus (PV) são altamente espécie/tecido-específicos (BERNARD, 2008; KING et al., 2012), mas alguns vírus tem capacidade de infectar mais de uma espécie como é o caso do papilomavirus bovino (NASIR e BRANDT, 2013). Os vírus desta família (*Papillomaviridae*) causam proliferações epiteliais benignas e malignas. Apesar das lesões benignas (verrugas) terem geralmente uma regressão espontânea, algumas infecções podem se tornar cancerígenas (NICHOLLS e STANLEY, 2000; DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2008; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

## 2.2. Características dos papilomavirus

### 2.2.1. Classificação

O papilomavirus era classificado originalmente na mesma família junto com os polyomavirus, na família *Papovaviridae*. Tal classificação foi baseada nas semelhanças dos capsídeos não envelopados e nos genomas de DNA de fita dupla. Posteriormente foi reconhecido que o genoma destes vírus têm organizações e sequências completamente diferentes e, atualmente, se encontram em duas famílias distintas: *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2008).

Para um PV novo ser reconhecido deve ser clonado e sequenciado pelo menos o DNA da sequência aberta de leitura L1 (open reading frame ORF L1). Esta sequência deve ter uma diferença superior a 10% de outras conhecidas de PVs. Uma diferença de dois a 10% na homologia define um subtipo e uma inferior a 2% uma variante viral. Esta classificação foi acordada por todos os cientistas que estudam os PVs. Os vírus de gêneros diferentes apresentam menos de 60% de semelhança na sequência da ORF L1 e entre 23% a 43% de semelhança na sequência completa do genoma viral. Para as espécies virais que pertencem ao mesmo gênero deve existir uma semelhança na sequência da ORF L1 de 60 a 70% (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2010; VAN DOORSLAER et al., 2011; BERNARD, 2013). Existem divergências sobre a classificação dos papilomavirus, mas o documento oficial é controlado pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). O critério usado para a classificação taxonômica pelo ICTV encontra-se baseado na relação das sequências genômicas, a variedade de hospedeiros naturais, o tropismo celular e de tecido, a patogenicidade e citopatologia, além do modo de transmissão, das propriedades físico-químicas e antigênicas do vírus (DE VILLIERS, 2013; BERNARD, 2013). No entanto, existe outra base de referência de sequências genômicas de papilomavirus, apoiada pelos pesquisadores que estudam PVs, que segue com mais ordem o critério de classificação do ICTV, chamada de —Eisteme dos Papilomavirus” (ainda não reconhecida oficialmente) [VAN DOORSLAER et al., 2013a].

A maioria dos tipos de PV já descritos são isolados de humanos (RECTOR e VAN RANST, 2013; BERNARD, 2013; MUNDAY, 2014; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015), com aproximadamente 200 PV listados como genomas de referência (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015), que podem ser encontrados no “Episteme dos Papilomavirus”. Até 2013 foram caracterizados 112 tipos de PV não humanos, os quais se encontram disponibilizados no GenBank®, e estão distribuídos em 32 gêneros diferentes, deixando os gêneros Gamma, Mupa e Nupapapilomavirus exclusivamente com tipos que infetam humanos (RECTOR e VAN RANST, 2013). Ainda não está bem esclarecido se as diferenças na diversidade entre os grupos são por viés dos métodos utilizados, bem como a preferência de estudo por amostras de humanos, ou se reflete a existência de forças de diversificação distintas nos grupos virais (MENGUAL-CHULIÁ et al., 2012).

Nos equinos, foram isolados até hoje sete tipos de papilomavirus de diferentes lesões e caracterizados por análise filogenética. Também têm sido encontrados mais de um tipo viral na mesma lesão. Os tipos já descritos são: *Equus caballus papillomavirus* tipo 1 (EcPV-1), *Equus caballus papillomavirus* tipo 2 (EcPV-2), *Equus caballus papillomavirus* tipo 3 (EcPV-3), *Equus caballus papillomavirus* tipo 4 (EcPV-4), *Equus caballus papillomavirus* tipo 5 (EcPV-5), *Equus caballus papillomavirus* tipo 6 (EcPV-6) e *Equus caballus papillomavirus* tipo 7 (EcPV-7) [RECTOR e VAN RANST, 2013].

O EcPV-1 foi descrito pela primeira vez no ano 2004 e encontra-se dentro do gênero *Zetapapillomavirus* e está relacionado com a papilomatosis cutânea, antigamente descrita (GHIM et al., 2004; RECTOR e VAN RANST, 2013). O EcPV-2 foi descrito em 2010 e encontra-se dentro do gênero *Dyoiotapapillomavirus* e foi isolado de lesões de carcinoma de células escamosas (SCC) e de papilomas genitais (SCASE et al., 2010; RECTOR e VAN RANST, 2013). O EcPV-3 foi descrito no 2011 e tem sido isolado de lesões aurais e pertence ao gênero *Dyorhopapillomavirus* (LANGE et al., 2011; RECTOR e VAN RANST, 2013). Os EcPVs 4, 5 e 6 em 2013 também foram isolados e caracterizados de lesões aurais (placa aural) e estão localizados nos gêneros *Dyoiotapapillomavirus* e *Dyorhopapillomavirus*, respectivamente (TANIWAKI et al.,

2013; LANGE et al., 2013; RECTOR e VAN RANST, 2013). E finalmente em 2013 o EcPV-7, foi isolado de lesões genitais e encontra-se situado no gênero *Dyrorhopapillomavirus* com os tipos 3 e 6 (LANGE et al., 2013; RECTOR e VAN RANST, 2013).

### **2.2.2. Estrutura do vírus**

Os papilomavirus são vírus pequenos não envelopados de 52 a 55 nanômetros (nm) de diâmetro, com um capsídeo icosaédrico composto por 72 capsômeros (BERNARD, 2008; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011; KING et al., 2012; NASIR e BRANDT, 2013). Cada capsômero contém uma proteína principal ou maior (L1) e uma secundária ou menor (L2), que são as mediadoras da transmissão e dos mecanismos de ingresso do vírus e são codificadas pelo vírus (BERNARD, 2008; NASIR e BRANDT, 2013).

Este vírus possui uma molécula de DNA circular de fita dupla com 7,3 a 8 kpb (kilo-paresbases) e um peso molecular de  $5,0 \times 10^6$  daltons, representando 10% a 13% do peso do vírion (BERNARD, 2008, MACLACHLAN e DUBOVI, 2011; KING et al., 2012). Dentro e fora da célula, o genoma viral está conjugado com histonas formando complexos semelhantes com a cromatina celular. Esta partícula viral é resistente às condições do meio ambiente e aos solventes lipídicos (éter e clorofórmio) [ALFIERI et al., 2007; BERNARD, 2008; KING et al., 2012].

### **2.2.3. Organização genômica**

Embora o papilomavirus tenha um genoma relativamente pequeno, a organização do vírus é muito complexa (VAN DOORSLAER et al., 2013a). Todas as ORFs estão localizadas numa das fitas de DNA, a fita codificante, a qual contém os segmentos: inicial (early-E) e tardio (late-L). O primeiro contém oito ORFs e o segundo duas (MCBRIDE, 2008; KING et al., 2012; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

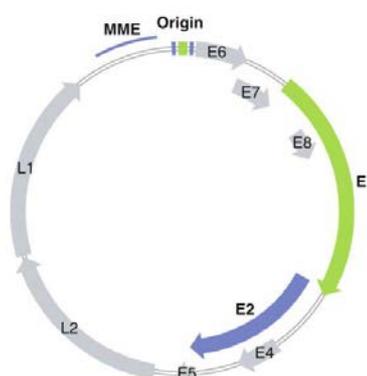
O segmento inicial (45% do genoma viral) codifica as proteínas para as etapas iniciais de replicação e transcrição viral (ALFIERI et al., 2007; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Este segmento contém as ORFs das proteínas regulatórias (E1 e E2) e oncogênicas (E5, E6 e E7) [BERNARD, 2013; WHITE e

HOWLEY, 2013, BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015]. As proteínas iniciais se expressam em células recentemente infectadas, em infecções não produtivas e em células transformadas (MCBRIDE, 2008).

Cerca de 40% do genoma viral corresponde ao segmento L (ALFIERI et al., 2007), e esta encarregado de codificar as proteínas tardias ou do capsídeo (L1 e L2). São encontradas somente em infecções produtivas (WANG e RODEN, 2013; BUCK et al., 2013; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). As ORFs E1, E2, L1 e L2 são particularmente bem conservadas entre todos os papilomavirus (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

A região controladora longa (long control region-LCR ou upstream regulatory region URR) encontra-se entre os segmentos inicial e tardio. A LCR não contém segmentos para codificar proteínas, mas possui elementos promotores e regiões regulatórias de replicação viral (MME e origem da replicação)(**figura 1**) (MCBRIDE, 2008; BERNARD, 2008; BERNARD, 2013; VAN DOORSLAER et al., 2013a; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

**Figura 1.** Genoma do HPV 16.



\*As ORFs inicial e tardia estão indicadas como E1-E8 e L1-L2, respectivamente. O *ori* e o MME estão ilustrados na LCR. Adaptado de MCBRIDE (2008).

O genoma viral pode ser encontrado no núcleo da célula infectada em forma episomal (lesões iniciais e benignas) ou integrada (células transformadas, integrado ao cromossomo) [MCBRIDE, 2008; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015].

#### **2.2.4. Ciclo de vida**

A maioria dos estudos sobre papilomavirus estão centrados no estudo do papilomavirus humano (HPV), particularmente no HPV 16 por ser a causa principal do câncer cervical em mulheres. É por isto que os modelos sobre expressão do genoma viral estão baseados nesse tipo viral o qual, com algumas modificações, são aplicáveis aos vírus de outros grupos (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

##### **2.2.4.1. Ingresso na célula hospedeira**

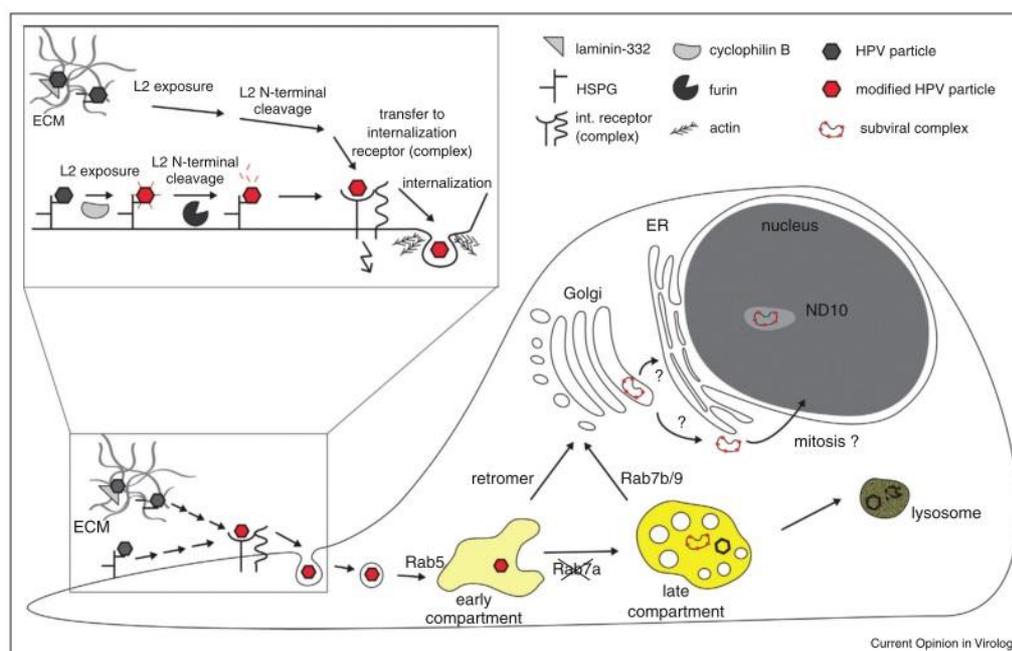
O vírus precisa de uma ruptura no epitélio estratificado para invadir às células basais (DOORBAR, 2005). A infecção tem início com a adesão dos vírions à superfície das células do epitélio basal e depende do programa de diferenciação dos queratinócitos (MCBRIDE, 2008; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015;). O vírus penetra possivelmente através de endocitose e é transportado pelo citoesqueleto em direção ao núcleo (MCBRIDE, 2008; KING et al, 2012). Durante esse processo, o vírus é desestruturado e perde o capsídeo, embora este processo não seja completamente entendido. Mediante os poros nucleares, o DNA viral entra no núcleo da célula (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Uma particularidade deste vírus é o tempo prolongado de residência na superfície celular antes da endocitose da partícula viral (DAY e SCHELHAAS, 2014).

##### **2.2.4.1.1. Adesão**

Os PVs inicialmente se ligam a cadeias de glicosaminoglicano (GAG) de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) [GIROGLOU et al., 2001; DOORBAR, 2005; MCBRIDE, 2008; BUCK et al., 2013]. Nas culturas celulares, os pseudovirions de papilomavirus (PsV) podem se unir à matriz extracelular (ECM) por interação com HSPG e laminina-332 (CULP e CHRISTENSEN, 2004; CULP et al., 2006a; CULP et al., 2006b; SELINKA et al., 2007). Alguns autores afirmam que o vírus não precisa de um complexo proteico de HSPG específico para infectar (HUANG e LAMBERT, 2012), mas a especificidade da união e posterior entrada à célula ocorre pela sequência de GAGs e pelo padrão de sulfatação (CERQUEIRA et al., 2013). Informações sobre este vírus sugerem que a adesão é relativamente rápida, mas a endocitose é bastante lenta. A razão para essa residência

prolongada na superfície celular ainda não foi determinada (**figura 2**) (DAY e SCHELHAAS, 2014).

**Figura 2.** Representação esquemática do ingresso do papilomavirus humano na célula.



\*Adaptado de DAY e SCHELHAAS (2014).

#### 2.2.4.1.2. Mudanças na estrutura extracelular

A interação do vírus com HS-GAG induz a exposição do epítipo linear que se encontra coberto entre os capsômeros, e também produz outras mudanças conformacionais que levam à exposição do extremo amino terminal da proteína L2 (DAY e SCHELHAAS, 2014). Esta exposição necessita de ciclofilina extracelular B (CyPB/isomerase) (BIENKOWSKA-HABA et al., 2009). Esse extremo amino terminal de L2 tem um sítio de clivagem furina/convertasa, proproteína importante para a união com a membrana celular (RICHARDS et al., 2006). Há relatos de que estas alterações estruturais diminuem a afinidade do vírus pelo HSPG, o qual é necessário para sua união com o receptor secundário e os passos seguintes da entrada (desnudamento e penetração) [SELINKA et al., 2003].

#### 2.2.4.1.3. Receptor de internalização

A identidade do receptor putativo secundário ainda não foi esclarecida. Talvez possa indicar que não é utilizada como receptor só uma molécula (HORVATH et al., 2010; DAY e SCHELHAAS, 2014). Porém, os receptores possíveis são: integrina alfa 6, tetraspanina CD151 e um heterotetrâmero de anexina A2 (CULP et al., 2006b; DSIDUSZKO e OZBUN, 2013; SCHEFFER et al., 2013). Todos esses receptores tem a característica de ser altamente expressos nas células do epitélio basal, as quais são o principal objetivo da infecção por PVs *in vivo*. A integrina alfa 6 e a anexina A2 não podem se considerar indispensáveis, pois as células desprovidas dessas moléculas são igualmente infectadas. Também tem-se proposto que o mecanismo de invasão celular é por meio de HSPG associado a fatores de crescimento. No entanto, esse mecanismo ainda não foi comprovado porque células que carecem de HSPG também são infectadas (**figura 2**) [DAY e SCHELHAAS, 2014].

#### 2.2.4.1.4. Endocitose

Na literatura disponível existe pouca concordância sobre esse tema, porque alguns autores afirmam que o ingresso é mediado por clatrina (CULP e CHRISTENSEN, 2004; DOORBAR, 2005), em quanto outros afirmam que é independente de clatrina (SCHELHAAS et al., 2012). Tal fato talvez ocorra por diferenças dos modelos experimentais e da alta complexidade das vias de endocitose do vírus (DAY e SCHELHAAS, 2014). Estudos indicaram que este processo é dependente de actina e independente de clatrina, caveolina e “rafts” lipídicos, e confirmaram a importância dos microdomínios de tetraspanina (TEM) como mediadores do ingresso (**figura 2**) [SPODEN et al., 2008].

#### 2.2.4.1.5. Sinalização

A união do vírus aos receptores de membrana geralmente ativa eventos de sinalização que podem facilitar a infecção (DAY e SCHELHAAS, 2014). A ativação da via da quinase Ras/MAPK por partículas similares a vírus (VLP) tem sido sugerida como indutora de proliferação celular inicial depois da ligação do vírus na superfície celular (**figura 2**) [PAYNE et al., 2001].

#### 2.2.4.1.6. Transporte vesicular e desnudamento

Após da endocitose o vírus é transportado ao sistema endosomal (MCBRIDE, 2008), dependente de Rab 5 (membro da família Rab GTPasa) no compartimento inicial. Após amadurecer será o compartimento tardio. Durante esse tempo em que o vírus permanece no endossomo várias mudanças estruturais acontecem, como o desnudamento do vírus (DAY e SCHELHAAS, 2014). Ainda não se tem estabelecido qual é o ativador do desnudamento, mas se tem sugerido que a mudança de pH estimula este processo (DOORBAR, 2005) [figura 2].

#### 2.2.4.2. Expressão de proteínas virais

Os papilomavirus parecem ser vírus muito simples que codificam algumas proteínas, mas cada uma dessas interage e regula várias proteínas celulares (MCBRIDE, 2008). Os primeiros indicadores da transcrição aparecem aproximadamente quatro semanas após a infecção, quando é possível detectar os genes E1 e E2 expressos (**tabela 1**) [ALFIERI et al., 2007], os quais estão encarregados de manter o DNA como epissoma e um número de cópias muito baixo (DOORBAR, 2005).

Durante a infecção produtiva, as células basais da epiderme aumentam sua taxa de proliferação, talvez em resposta às proteínas expressas pelo gene E5, e ao bloqueio da proteína p53 pela proteína viral E6 ou, ainda, com o bloqueio da proteína pRB pela proteína viral E7 resultando na expressão de genes da fase S, o que interfere com o crescimento da célula hospedeira (**tabela 1**) [MCBRIDE, 2008; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011]. E5 também diminui a expressão do complexo principal de histocompatibilidade I (CMH I), auxiliando a evasão do vírus do sistema imunológico (MCBRIDE, 2008; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Essas proteínas transformadoras podem ser diferentes entre papilomavirus e o mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido (MACLACHLAN e DUBOVI, 2011).

**Quadro 1.** Proteínas codificadas pelo papilomavirus

<b>PROTEÍNA</b>	<b>TAMANHO</b> (aminoácidos)	<b>FUNÇÃO</b>
<b>E1</b>	605	Junto com a proteína E2, são as primeiras a serem produzidas. É uma helicase dependente de ATP que está encarregada de separar as fitas de DNA e é um fator de extensão durante a replicação. Também participa como proteína regulatória na oncogênese viral.
<b>E2</b>	306	Encontra-se envolvida na transcrição e replicação do DNA viral, e é regulatória na oncogênese.
<b>E4</b>	120	São proteínas pequenas, expressadas tardiamente, e participam da transformação da célula, modificando a mitose.
<b>E5</b>	44	É uma proteína de transformação celular que interage com receptores de fatores de crescimento, impedindo a supressão do crescimento celular. Altera o controle do ciclo celular, auxiliando na evasão da apoptose.
<b>E6</b>	137	É uma proteína de transformação celular que quando ligada com o p53 (supressão de neoplasia), causa sua degradação. Também altera o ciclo celular deixando a célula imortal.
<b>E7</b>	127	É uma proteína de transformação celular que quando ligada ao pRb ou ao p107 (supressores de neoplasia), produz degradação dos mesmos, fazendo a célula ficar na fase S da replicação celular.
<b>L1</b>	495	Proteína principal do capsídeo que constitui 80% do mesmo. Tem epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes. Pode virar VLPs.
<b>L2</b>	469	Proteína secundária do capsídeo, também com epítomos indutores de anticorpos neutralizantes. Encarregada de recrutar a proteína L1 para o conjunto do vírus.

\*Adaptado de ALFIERI et al (2007); BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ (2015).

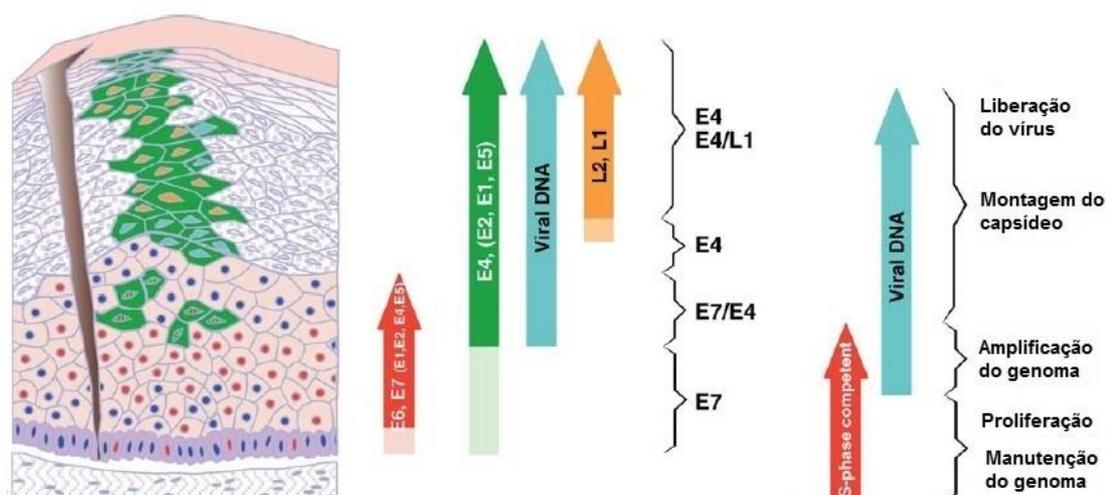
### 2.2.4.3. Amplificação do genoma e egresso

Após o transporte do DNA viral até o núcleo celular, este é amplificado de acordo com as fases da diferenciação das células epiteliais basais (DOORBAR, 2005; MCBRIDE, 2008; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015) em aproximadamente 10 a 50 cópias por célula (DOORBAR, 2005; MCBRIDE, 2008), mas pode variar dependendo da lesão (DOORBAR et al., 2012). Nessa etapa as proteínas iniciais

(E1, E2, E6 e E7) são produzidas em baixa quantidade (DOORBAR, 2005; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Nas células diferenciadas da epiderme, o DNA viral é amplificado em grande quantidade e de modo descontrolado (**figura 3**) [DOORBAR, 2012].

O final do ciclo de vida do papilomavirus inclui a expressão da proteína L2, a saída da célula do ciclo celular e a expressão da proteína L1 para envolver o vírus (DOORBAR, 2012). Estes processos ocorrem no núcleo celular (MCBRIDE, 2008; DOORBAR, 2012). É importante ressaltar que a montagem do capsídeo ocorre mesmo sem a presença de DNA viral, o que favorece a produção de partículas similares a vírus (vírus like particles VLPs), as quais são úteis na produção de vacinas (ALFIERI et al., 2007). A maturação do vírus ocorre nos queratinócitos mais superficiais em processo de morte, os quais perderam a fosforilação oxidativa mitocondrial, transformando o ambiente em oxidativo. Esse processo favorece a formação de pontes dissulfeto entre proteínas L1, o que produz vírions infectantes extremamente estáveis (DOORBAR, 2012).

**Figura 3.** Representação esquemática da pele para indicar o padrão de expressão de proteínas do HPV enquanto a célula infectada migra em direção à superfície epitelial



\*Adaptado de DOORBAR (2005)

## **2.3. Doenças causadas por papilomavirus em equinos**

### **2.3.1. Papilomatose clássica**

Esta doença representa 5% das neoplasias encontradas em laboratórios de diagnóstico. Se encontra associada ao EcPV-1 (SCOTT e MILLER, 2003; GHIM et al., 2004) e geralmente acomete cavalos com menos de 3 anos de idade, sem predileção, até o momento, por raça ou sexo (SCOTT e MILLER, 2003; JACKSON, 2003). A transmissão pode ser direta ou indireta por fomites. As lesões iniciam como pápulas de um milímetro (mm) ou menos e podem alcançar até 20 mm (JACKSON, 2003), com uma superfície acinzentada a branca. Na medida em que estas lesões aumentam de volume desenvolvem uma superfície hiperqueratótica com numerosas projeções (GHIM et al., 2004; TORRES e KOCH, 2013). Os animais acometidos podem apresentar de 10 a 100 lesões, das quais, quando são muitas podem coalescer (JACKSON, 2003). Os locais mais frequentemente afetados são os lábios e o focinho, embora se tenham descrito nas pálpebras, região paragenital e porção distal dos membros. Alguns autores relataram lesões genitais, embora tal localização tenha sido negada por outros estudos (TORRES e KOCH, 2013).

Esta doença geralmente apresenta evolução espontânea após quatro a nove meses (JACKSON, 2003; SCOTT e MILLER, 2003; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011). Quando a lesão persiste talvez exista imunossupressão do animal (JACKSON, 2003). Na maioria dos casos se desenvolve imunidade completa contra o vírus (SCOTT e MILLER, 2003; JACKSON, 2003; REES, 2004; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011).

### **2.3.2. Papilomatose genital**

Tem sido demonstrada associação com o EcPV-2 (SCASE et al., 2010, KNIGHT et al., 2011, LANGE et al., 2012). Já foi detectado o EcPV-7 no mesmo tipo de lesão (LANGE et al., 2013), mas sem análise histopatológica é difícil estabelecer o verdadeiro papel desse vírus no desenvolvimento da lesão (TORRES e KOCH, 2013). As lesões são caracterizadas por pápulas ou nódulos individuais ou em placas, e podem ser encontradas em diversos locais (mucosa

oral, ocular e genital). As lesões podem ser individuais ou múltiplas (papilomatose genital) [KNIGHT et al., 2011].

Lange et al. (2012) afirmam que a papilomatose genital, o carcinoma de células escamosas (SCC) “in situ” e o SCC invasivo, são diferentes etapas da mesma doença causada por papilomavirus. Porém são necessários mais estudos antes de afirmar que o EcPV-2 é o causador de SCC em cavalos (TORRES e KOCH, 2013).

### **2.3.3. Sarcoide equino**

São os tumores mais comuns em cavalos, mulas e jumentos (JACKSON, 2003) e encontram-se associados ao papilomavirus bovino tipo 1 (BPV-1) (CHAMBERS et al., 2003; YUAN et al., 2007; POSTEY et al., 2007; BOGAERT et al., 2008; NASIR e CAMPO, 2008). Histopatologicamente, as células predominantes são fibroblastos transformados (REES, 2004). Os sarcoides tem grande capacidade de invadir a derme, mas a disseminação metastásica verdadeira não ocorre (SCOTT e MILLER, 2003). Uma lesão como esta pode permanecer estável por anos ou mostrar crescimento exagerado e agressivo com alta infiltração no tecido subjacente. Estas neoplasias não são letais, mas as falhas no tratamento e a perda da função do órgão acometido levam à eutanásia do animal (BOGAERT et al., 2008).

### **2.3.4. Placa aurial**

Também chamada acantose pineal, placa fúngica, dermatite hiperplásica auricular ou papiloma auricular (SCOTT e MILLER, 2003). A placa aurial é uma variante da papilomatose cutânea, caracterizada por lesões bem demarcadas, brilhantes, eritematosas ou despigmentadas (JACKSON, 2003; SCOTT e MILLER, 2003; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011), geralmente cobertas por uma crosta queratinosa esbranquiçada. Afetam a superfície côncava de uma ou ambas as orelhas, e podem ser individuais, múltiplas ou coalescentes (SCOTT e MILLER, 2003; JACKSON, 2003). Em alguns casos pode cobrir a orelha inteira (TORRES e KOCH, 2013). Não existe predileção por sexo, raça ou idade. Porém raramente é

diagnosticada em animais com menos de um ano (JACKSON, 2003; SCOTT e MILLER, 2003).

As principais alterações encontradas nos casos de placa auricular descritos por Sousa et al. (2008) foram moderada a intensa acantose com discreta papilomatose e presença de largas cristas epidérmicas que se projetavam para o interior da derme. Além disso, havia hiperqueratose ortoqueratótica lamelar, que na maioria dos cortes, foi compacta. Nas biópsias que representaram junção de pele normal com a lesão, notou-se alteração abrupta entre a epiderme normal e a neoplásica, onde ficou evidente a hipomelanose epidérmica.

A presença de papilomavirus tem sido demonstrada nestas lesões através de microscopia eletrônica (FAIRLEY e HAINES, 1992) e imunohistoquímica (FAIRLEY e HAINES, 1992; POSTEY et al., 2007). Recentemente foram isolados e relatados como possíveis responsáveis por causar doença os EcPV-3, 4, 5 e 6 utilizando técnicas moleculares como RCA e PCR (LANGE et al., 2011; TANIWAKI et al., 2013; LANGE et al., 2013).

Os cavalos acometidos podem ser assintomáticos ou apresentar algum grau de hipersensibilidade nas orelhas (SCOTT e MILLER, 2003; TORRES e KOCH, 2013), e os sinais clínicos podem agravar com a presença de insetos picadores (JACKSON, 2003; SCOTT e MILLER, 2003). Até o momento, não se têm casos descritos de regressão espontânea ao contrário à papilomatose clássica, (JACKSON, 2003; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011). O tratamento com melhor eficácia relatada é baseado no imiquimod a 5%, via tópica (TORRES et al., 2010).

São escassos os estudos epidemiológicos e de prevalência clínica bem definidos envolvendo a placa auricular de equinos no mundo (TORRES et al., 2010). Somente um estudo foi publicado no Brasil, embora desenvolvido somente em um Estado do país. Nesse estudo, a prevalência foi de 57% em cavalos Mangalarga e 35% em Quartos de Milha (SOUSA et al., 2008). Na América do Norte, outro estudo relatou prevalência de 22% em cavalos (BINNINGER e PIPER, 1968).

#### **2.4. Diagnóstico dos papilomavirus**

O diagnóstico comumente é embasado no aspecto clínico das lesões, as quais têm características típicas. O uso da histopatologia possibilita descartar neoplasias de outras origens (TORRES e KOCH, 2013). Na microscopia eletrônica é possível visualizar as partículas virais no tecido afetado (FAIRLEY e HAINES, 1992), embora esse método seja de alto custo e limitado a algumas instituições acadêmicas (TORRES e KOCH, 2013).

A disponibilidade do genoma completo dos sete tipos de PVs do equino possibilita a utilização da PCR para a detecção do genoma viral a partir de lesões compatíveis com PV (GHIM et al., 2004; LANGE et al., 2011; TANIWAKI et al., 2013; LANGE et al., 2013; GORINO et al., 2013). Na imuno-histoquímica também é possível detectar proteína viral no interior do núcleo de células infectadas (FAIRLEY e HAINES, 1992; POSTEY et al., 2004).

Considerando a escassez de literatura referente à prevalência dos diferentes tipos de papilomavirus em lesões de placa aural em um grande número de amostra e varias regiões de um país, além da escassez de relatos de coinfeções nessas lesões, foi realizado o presente estudo sobre pesquisa do DNA viral dos papilomavirus equinos 1-7 em lesões de placa aural de cavalos nas regiões do Brasil.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Pesquisar a presença de DNA viral de papilomavirus equino em lesões de placa aurál de cavalos das regiões do Brasil utilizando a técnica da PCR.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Detectar a presença de material genético dos *Equus caballus papillomavirus* 1-7 utilizando a PCR em biopsias de placa aurál mantidas a menos 80°C.
- Definir a frequência e coinfeções dos tipos virais em diferentes regiões do Brasil.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Comitê de ética e auxílios

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP (processo 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.

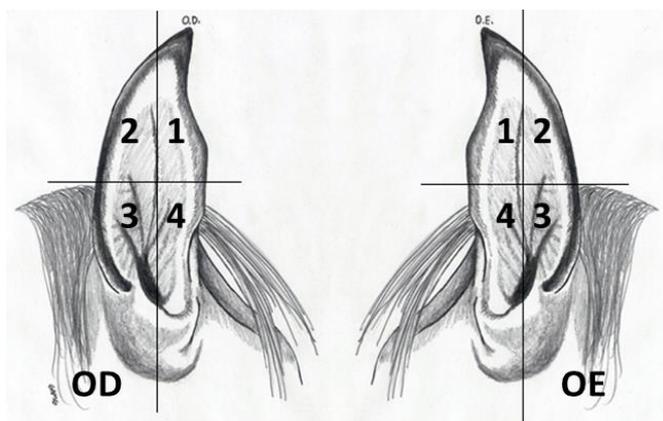
### 4.2. Amostras

Foram colhidas 108 biopsias de uma das orelhas de equinos com lesões compatíveis com placa auricular, de ambos os sexos, de qualquer raça, com idade superior a um ano, clinicamente saudáveis (sem outros sinais clínicos), distribuídos nas diferentes regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul), sendo animais de trabalho, cria e exposição. Também foram coletados dados sobre as características da lesão. Os animais foram mantidos em troncos de contenção e, quando necessário foram sedados com xilazina 1 mg/kg pela via intravenosa. As biopsias foram realizadas com “punch” de 6 mm de diâmetro, sem limpar previamente a orelha nem usar antisséptico. As amostras foram colocadas em criotubos de 1,5 mL e colocadas em botijão de nitrogênio líquido. Posteriormente foram armazenadas em freezer a -80°C até a extração do DNA. No local biopsiado foram administrados repelentes tópicos. Os animais foram escolhidos segundo a disponibilidade dos proprietários (consentimento informado assinado), e foram avaliados e coletados por dois veterinários.

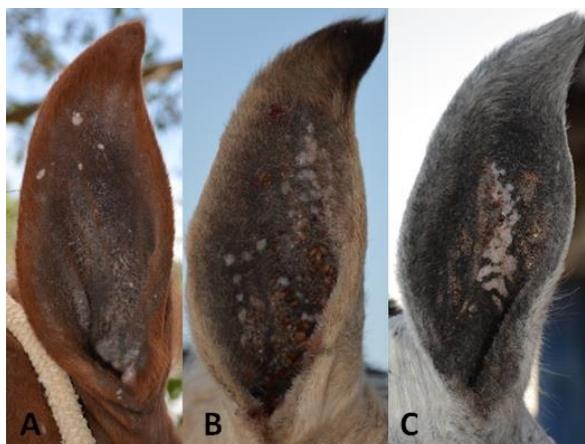
### 4.3. Características da lesão

Para a avaliação da distribuição das lesões foram estabelecidos quadrantes dentro da orelha (**figura 4**) e foram definidas três categorias: “um quadrante afetado”, “dois quadrantes afetados” e “três ou mais quadrantes afetados”. Para o tipo de lesão foram definidas três categorias: “de um a cinco pontos”, “multiponto” e “callescente” (**figura 5**).

**Figura 4.** Representação dos quadrantes nas orelhas; OE: orelha esquerda, OD: orelha direita; os números dos quadrantes estão indicados na figura.



**Figura 5.** Orelhas com lesões de placa aurial; categorias das lesões: A —um “inco pontos”, B —“multiponto”, C “coalescente”.



#### 4.4. Extração de DNA

O processo de extração foi realizado a partir de 20 mg de amostra de placa aurial utilizando o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich Co.). O tecido congelado foi macerado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido com ajuda de um pistilo. O produto macerado (em pó) foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL para completar a extração segundo recomendações do fabricante. A pureza e qualidade relativa do DNA extraído foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000-Thermo Scientific),

relação A260/280. O produto extraído foi armazenado em freezer -20°C até a realização da PCR.

#### 4.5. Técnica da PCR

A PCR foi padronizada para os vírus tipo 3, 4, 5 e 6 (TANIWAKI et al., 2013; ZAKIA et al., 2014). Também foram feitos gradientes de temperatura para os outros tipos virais descritos no equino (tipos 1, 2 e 7). Finalmente, a PCR foi realizada com um volume total de 25 µL com 2,5 µL de DNA, 12,5 µL de GoTaq™ Master Mix (Promega), 300 nM (0,75 µL de solução de trabalho de 10 µM/µL) de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*, **tabela 2**) e 8,5 µL de água livre de DNAase e RNAase. As condições do programa de ciclos da PCR foram: desnaturação inicial por 5 min a 95°C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30s, anelamento segundo o tipo viral por 1 min, 72°C por 1 min e finalmente 72°C por 7 min para completar a extensão.

**Tabela 1.** Sequências de *primers* com tamanho do produto amplificado e temperatura de anelamento de cada *primer*.

Nome do primer	Sequências (5'-3')*	Produto <sup>+</sup>	Temp. anelamento	GenBank™ID
JPEcPV1 For	GTGGTGTCTGGCTCCTTATTT	186 bp	56°C	NP620513
JPEcPV1 Rev	GGTATCCTTCTCCCTCTCATCT			
JPEcPV2 For	ATGGTAACAGCGAGCGTATG	179 bp	52°C	ADZ73319.1
JPEcPV2 Rev	CGAGGTCTCTGGGTTGTAATG			
JPEcPV3 For	TTGCGCCAGGTTTCCACATCTA	116 bp	60°C	GU384895
JPEcPV3 Rev	TTGTTCTGGCCTTGTGCACGTT			
JPEcPV4 For	ACAATGGTGTGTTGCTGGCACGA	187 bp	60°C	JF939718.1
JPEcPV4 Rev	ACCGTGCAAAGCTGCAGAATGA			
JPEcPV5 For	GGCTCCGTAGACATTCCTAAAG	184 bp	62°C	YP007349388
JPEcPV5 Rev	CTGTTACACCCACGCCTAAT			
JPEcPV6 For	CTACCAGAGGAACGAGCTTTAC	203 bp	62°C	YP007518497
JPEcPV6 Rev	TAGCTCCCAATCCTCCAAGATA			
JPEcPV7 E6 For	GGACGTATGGAGTGACTTTG	202 bp	50,2°C	YP007518498.1
JPEcPV7 E6 Rev	TTTCCATAGGGTCGGGTAG			
β –actina <i>forward</i>	CATTGTCCACCTCCAGCAGATGT	86 bp	60°C	OLIVEIRA-FILHO et al., 2010
β –actina <i>reverse</i>	CTAGAAGCATTTCGCGGTGGACGAT			

\*ZAKIA et al. (2014). <sup>+</sup>bp= pares de bases.

A sensibilidade analítica de cada PCR foi determinada com diluições 1:10 (desde sem diluição até 10<sup>-9</sup>) de amostras positivas para os EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6. As amostras negativas para todos os tipos de papilomavirus foram testadas com

primers para o gene da  $\beta$ -actina equina para confirmar a presença de DNA amplificável (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

#### 4.6. Eletroforese

Foram preparados géis de agarose a 1,5% com 3 gramas de Ultrapure® Agarose (Promega) mais 200 mL de tampão TBE e corante Syber Safe DNA Gel Stain®. As eletroforeses foram realizadas em cubas da Major Sciencies® e da Fisher®, com tempo entre 70 e 90 minutos, voltagem de 90 W e corrente de 120 amp. Além das amostras foram pipetados dois poços com marcador de peso molecular (*ladder*) e um com controle negativo. A visualização dos géis foi feita utilizando o aparelho ImageQuant300 e as imagens gravadas.

#### 4.7. Purificação dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR que apresentaram bandas de acordo com o tamanho esperado (segundo o desenho dos *primers*) foram purificados com os kits GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich Co.) para produto de PCR diretamente e NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Machery-Nagel Inc.) para produto de PCR extraído de gel (EcPV-1), segundo recomendações dos fabricantes. Os produtos purificados foram armazenados em freezer -20°C.

#### 4.8. Sequenciamento

Para o sequenciamento das amostras foram pipetados 5  $\mu$ L de cada *primer* (na concentração de 5  $\mu$ M/ $\mu$ L) em tubos separados com 10  $\mu$ L de produto de PCR purificado. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático 3500 ABI Genetic Analyzers® (Applied Biosystems), e as sequências obtidas foram analisadas com os softwares Mega 6® e Sequencher®, com os quais também foram comparadas com os genomas dos EcPV-1 (GenBank™ ID AF498323.1), EcPV-2 (GenBank™ ID NC\_012123.1), EcPV-3 (GenBank™ ID GU384895.1), EcPV-4 (GenBank™ ID JF939718.1), EcPV-5 (GenBank™ ID JQ031033.1), EcPV-6 (GenBank™ ID JQ965698.1) e EcPV-7 (GenBank™ ID JX035935.1) [Blast®]. Foram aceitas sequências com uma porcentagem de cobertura e identidade maior do que

80% e um E-value perto de zero. As informações obtidas foram organizadas em planilhas de Excel® numa distribuição analisável para o software estatístico.

#### **4.9. Análise dos dados**

Foi realizada a estatística descritiva para determinar a mediana da idade do grupo avaliado (PROC MEANS; SAS® 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Foi realizada a distribuição de frequências dos dados categóricos (tipos virais, tipo e distribuição da lesão, coinfeccções, sem coinfeccções, regiões e sexo) (PROC FREQ; SAS Institute). Foram executados testes de Chi quadrado e Fisher (PROC FREQ; SAS Institute) para determinar a associação entre a lesão (tipo e distribuição), o tipo viral detectado (só numa das orelhas) e a presença de coinfeccção.

## 5. RESULTADOS

Dos 108 cavalos amostrados no estudo 58,33% (63/108) eram fêmeas e 41,7% (45/108) machos, e a mediana da idade foi de cinco anos (mínimo um ano e máximo 22 anos). Das 108 biopsias, 97,22% (105/108) foram positivas para pelo menos um tipo viral. Nenhuma amostra foi positiva para os EcPV-2 e 7. A região brasileira com maior frequência de biopsias positivas foi a Sudeste com 25,71% (27/105) biopsias (**tabela 2**). No entanto, além da região Sudeste, 100% dos animais amostrados das regiões Nordeste e Norte também foram positivos. A distribuição dos animais coletados por região e a frequência de detecção dos outros tipos virais estão indicadas nas **tabelas 2 e 3**, respectivamente.

**Tabela 2.** Distribuição dos equinos amostrados e positivos em cada região.

REGIÃO	AMOSTRADOS	POSITIVOS
Centro-oeste	15,74% (17/108)	15,24% (16/105)
Norte	20,37% (22/108)	20,95% (22/105)
Nordeste	20,37% (22/108)	20,95% (22/105)
Sul	18,52% (20/108)	17,14% (18/105)
Sudeste	25% (27/108)	25,71% (27/105)

**Tabela 3.** Frequência de detecção segundo o tipo de papilomavirus.

TIPO VIRAL	FREQUÊNCIA
EcPV-1	35,24% (37/105)
EcPV-3	42,86% (45/105)
EcPV-4	86,67% (91/105)
EcPV-5	1,90% (2/105)
EcPV-6	18,10% (19/105)

A frequência de detecção por tipo viral em cada região se encontra na **tabela 4**, sendo o vírus tipo 4 o mais frequente nas regiões Centro-oeste, Nordeste, Sul e Sudeste.

**Tabela 4.** Frequência de detecção por tipo de papilomavirus no total das amostras em cada região.

REGIÃO	EcPV-1	EcPV-3	EcPV-4	EcPV-5	EcPV-6
Centro-oeste	1,90%(2/105)	4,76%(5/105)	15,24%(16/105)	-	-
Norte	12,38%(13/105)	20,95%(22/105)	20%(21/105)	-	2,86% (3/105)
Nordeste	17,14% (18/105)	8,57%(9/105)	19,05%(20/105)	-	0,95% (1/105)
Sul	-	5,71%(6/105)	9,52%(10/105)	-	7,62% (8/105)
Sudeste	3,81%(4/105)	2,86%(3/105)	22,86%(24/105)	1,90%(2/105)	6,67% (7/105)

Quando avaliada a existência de coinfeção dos diferentes vírus, 59,05% (62/105) das amostras foram positivas para mais de um tipo viral. A distribuição das coinfeções encontra-se na **tabela 5**. Os encontrados isoladamente foram o EcPV 3, 4 e 6, com frequências de 4,65% (2/43), 79,07% (34/43) e 16,28% (7/43), respectivamente.

**Tabela 5.** Distribuição das coinfeções dos papilomavirus.

<b>COINFEÇÃO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>
EcPV 1 + 3 + 4 + 6	3,23% (2/62)
EcPV 1 + 4 + 6	1,61% (1/62)
EcPV 3 + 4 + 6	3,23% (2/62)
EcPV 1 + 4 + 5	1,61% (1/62)
EcPV 1 + 3 + 4	27,42% (17/62)
EcPV 1 + 3 + 6	3,23% (2/62)
EcPV 3 + 4	27,42% (17/62)
EcPV 4 + 5	1,61% (1/62)
EcPV 4 + 6	4,84% (3/62)
EcPV 3 + 6	3,23% (2/62)
EcPV 1+ 4	20,97% (13/62)
EcPV 1+ 3	1,61% (1/62)

Todas as amostras controle foram negativas e o DNA da  $\beta$ -actina equina foi amplificado nas três amostras negativas para todos os tipos virais, confirmando assim a presença de DNA amplificável. A sensibilidade analítica para os EcPV 1, 3, 4, 5 e 6 foi:  $10^{-2}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$ , respectivamente, indicando até qual diluição é ainda possível detectar DNA viral amplificado segundo o tipo viral.

Nenhuma associação foi encontrada quando avaliada a lesão (tipo e distribuição) com o tipo de papilomavirus detectado e a presença de coinfeção. As distribuições de frequência das características da lesão, do tipo viral e da presença de coinfeção estão nas **tabelas 6 e 7**.

**Tabela 6.** Frequência das características da lesão (distribuição e tipo) segundo a presença de coinfeção.

	Distribuição da lesão			Tipo de lesão		
	Um quadrante	Dois quadrantes	Três ou mais quadrantes	Um a cinco pontos	-Multiponto	-Goalescente
Com coinfeção	20% (21/105)	19,05% (20/105)	20% (21/105)	32,38% (34/105)	8,57% (9/105)	18,09% (19/105)
Sem coinfeção	16,19% (17/105)	7,62% (8/105)	17,14% (18/105)	19,05% (20/105)	7,62% (8/105)	14,29% (15/105)

**Tabela 7.** Frequência das características da lesão (distribuição e tipo) segundo o tipo de papilomavirus.

	Distribuição da lesão			Tipo de lesão		
	Um quadrante	Dois quadrantes	Três ou mais quadrantes	Um a cinco pontos	-Multiponto	-Goalescente
EcPV-1	11,43% (12/105)	14,29% (15/105)	9,52% (10/105)	20,95% (22/105)	6,67% (7/105)	7,62% (8/105)
EcPV-3	18,10% (19/105)	12,38% (13/105)	12,38% (13/105)	26,67% (28/105)	5,71% (6/105)	21,90% (11/105)
EcPV-4	30,48% (32/105)	23,81% (25/105)	32,38% (34/105)	43,81% (46/105)	14,29 (15/105)	28,57% (30/105)
EcPV-5	-	-	1,90% (2/105)	-	-	1,90% (2/105)
EcPV-6	7,62% (8/105)	3,81% (4/105)	6,67% (7/105)	9,52% (10/105)	1,90% (2/105)	6,67% (7/105)

## 6. DISCUSSÃO

Atualmente existem vários estudos sobre a prevalência dos diferentes tipos de papilomavirus em humanos. Em contraste, são escassos estudos dessa natureza com papilomavirus de origem animal. São descritos estudos pontuais em bovinos (PANGTY et al., 2010; BRANDT et al., 2011; CARVALHO et al., 2012), em gatos positivos e negativos ao vírus de imunodeficiência felina (FIV) com a pele hígida e em gatos com tumor de células escamosas (SSC) [MUNDAY et al., 2008; MUNDAY e WITHMAN, 2009], em cães com pele hígida (LANGE et al., 2009) e em cavalos foi recentemente detectada a seroprevalência e genoprevalência de EcPV-2 (FISCHER et al., 2014).

Não estão disponíveis na literatura investigações sobre a prevalência dos EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 em lesões de placa aural envolvendo grande número de amostras em diferentes regiões de um mesmo país. Gorino et al. (2013) relataram num estudo com 45 cavalos do Brasil, uma prevalência de 60,8% (28/45) dos EcPVs 3 e 4. No presente estudo, envolvendo animais das cinco regiões do Brasil, quase a totalidade dos animais foram positivos (97,22%) quando avaliados os tipos virais 1, 3, 4, 5 e 6, demonstrando a alta ocorrência destes vírus no país. Além disso, relata-se pela primeira vez no Brasil a presença dos tipos 1, 5 e 6 em lesões de placa aural em equinos.

A região com maior frequência de animais amostrados e biopsias positivas foi a Sudeste. No entanto, tanto a região Sudeste quanto as regiões Norte e Nordeste apresentaram 100% dos animais positivos para pelo menos um tipo viral, demonstrando que o vírus está amplamente distribuído no país. Ademais, na região Sudeste se encontram todos os tipos virais presentes, provavelmente pela dinâmica do comércio do cavalo ou do manejo dos animais para reprodução e entretenimento na região. Os EcPVs 3 e 4 estão amplamente distribuídos em todas as regiões, sendo o tipo 3 mais frequente na região Norte e o tipo 4 na região Sudeste, Nordeste e Norte. Os EcPVs 1 e 6 foram detectados com maior frequência nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, respectivamente. Em contraste, o tipo 5 foi detectado somente na região Sudeste. Estas distribuições virais podem depender de múltiplos fatores e necessitam de estudos bem desenhados para

serem definidas. Talvez alguns desses fatores sejam: manejo, clima, raças ou estado imunológico dependente da criação dos animais.

Dentre a literatura consultada não foi observado nenhum estudo referido a EcPV-1 em varias amostras de lesões de placa aural de cavalos em diferentes regiões. Zakia et al. (2004) no Brasil, relataram a detecção de uma única amostra de placa aural positiva para EcPV-1 em coinfeção com outros vírus característicos desta doença. Este tipo viral está associado à papilomatose clássica em equinos, lesões das quais foi isolado e classificado filogeneticamente (GHIM et al, 2004). Sem outros estudos que confirmem a presença deste tipo viral na pele sadia, é difícil definir se este vírus esta participando no desenvolvimento da lesão ou se simplesmente se encontre na pele hígida, ou seja, assim como outros tipos de papilomavirus animais têm sido encontrados na pele hígida de animais na qual não estão causando nenhuma lesão (ANTONSSON et al., 2002; ANTONSSON et al., 2006; MUNDAY et al., 2008; MUNDAY e WITHMAN., 2009). De modo similar, o EcPV-5 foi detectado numa frequência muito baixa e sempre em coinfeção com o EcPV-4, o que pode indicar que talvez este tipo viral também não esteja participando do desenvolvimento da lesão ou provavelmente seja um vírus bem menos patogênico e frequente. Interessantemente, o EcPV-1 foi detectado com alta frequência, equivalente ao EcPV-3, dos quais este último é característico da placa aural. Porém são necessários outros estudos para definir o real impacto do EcPV-1 como agente primário de lesões de placa aural. Por outro lado foi confirmada a ausencia dos EcPVs 2 e 7 nestas lesões, de acordo ao descrito por LANGE et al. (2013), provavelmente porque esses tipo virais estão mais relacionados as lesões genitais.

O tipo viral mais frequentemente encontrado neste estudo foi o EcPV-4 [86,67% (91/105)], o qual já tinha sido descrito e sequenciado no Brasil (TANIWAKI et al., 2013). Esse resultado é similar com o relatado por Gorino et al. (2013), que encontraram o EcPV-4 em 37.78% (17/45) das amostras. Tal achado provavelmente reforce que o EcPV-4 seja o mais patogênico dos papilomavirus envolvidos na placa aural, de modo isolado ou em coinfeções.

Também não foi encontrado na literatura estudos que relatem altas frequências de coinfeções de papilomavirus na placa aural em equinos. No

Brasil, Gorino et al. (2013) relataram coinfeção em 15.56% (7/45) das amostras. No presente estudo foram detectadas 59,05% (62/105) das amostras positivas para dois ou mais tipos de papilomavirus equinos. No entanto, não está esclarecido na literatura o real impacto das coinfeções em lesões associadas ao papilomavirus, já que os estudos desenvolvidos até agora com papilomavirus humano (HPV) não tem conseguido definir a interação entre tipos virais na coinfeção (THOMAS et al., 2000; ROUSSEAU et al., 2001; LIAW et al., 2001; CHATURVEDI et al., 2005; MEJLHEDE et al., 2010; CHATURVEDI et al., 2011; ROSITCH et al., 2011; CAROZZI et al., 2012; CAMPOS et al., 2011; GOLDMAN et al., 2013) e em animais não se tem desenvolvido estudos com esse foco de determinar as interações nas coinfeções por vários tipos de papilomavirus numa mesma lesão (YAGUIU et al., 2008; VAN DYK et al., 2009; PANGTY et al., 2010; CARVALHO et al., 2012;).

Postula-se que a coinfeção possa ser um mutualismo, ou até mesmo uma disputa entre os tipos virais pelo hospedeiro (ROUSSEAU et al., 2001; MEJLHEDE et al., 2010). Caso exista disputa entre os tipos virais ocorrerá menor frequência de detecção de coinfeção. Ao contrario, nos casos de efeito sinérgico dos tipos virais haverá maior frequência de coinfeções (MEJLHEDE et al., 2010). Partindo desse pressuposto, a alta frequência de coinfeções no presente estudo indicaria sinergismo dos vírus dentro da mesma lesão, como os tipos 1, 3 e 4. Porém, num estudo transversal, é difícil determinar se os vírus iniciaram a infecção em conjunto ou se foram adquiridos em períodos distintos (MEJLHEDE et al., 2010). Nesse contexto, em humano, tem sido relatado que mulheres (LIAW et al., 2001; MEJLHEDE et al., 2010) e homens (ROSITCH et al., 2011) infetados com um tipo viral tem maior risco de se infectarem por outro tipo viral. Tal fato talvez possa ocorrer com cavalos infetados com EcPV-4, já que este foi o vírus mais frequentemente encontrado nas mono e coinfeções. Não obstante, alguns autores afirmaram que as coinfeções são ao acaso, com ou sem tipos filogeneticamente relacionados, e que cada tipo viral ocasiona a doença de modo independente (CHATURVEDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2011; CHATURVEDI et al., 2011). Ao contrário, tem se referido que as coinfeções são frequentes, e é

pouco provável que se apresentem por chance ou de maneira independente do tipo viral (THOMAS et al., 2000; CAROZZI et al., 2012; GOLDMAN et al., 2013).

O interesse pelas coinfeções dos papilomavirus na medicina humana foi motivado pela produção de vacinas que controlariam determinados tipos virais, mas poderiam aumentar ou diminuir a prevalência de outros tipos virais (para os quais não tem efeito a vacina) envolvidos numa mesma lesão, resultando em desequilíbrio da interação entre esses vírus em coinfeção (ROUSSEAU et al., 2001; CAROZZI et al., 2012). Apesar da existência de múltiplos estudos sobre infecções com múltiplos HPVs, é difícil determinar as interações destes vírus, posto que os modelos estatísticos são afetados por vários fatores como os mecanismos de transmissão viral, a imunidade do indivíduo e os métodos diagnósticos diferentes (CAROZZI et al., 2012). Aparentemente, estabelecer as características das coinfeções da placa aural em equinos seja mais prático, pois alguns dos fatores envolvidos nas análises com humanos não se encontram em animais, como a perda do controle das interações com outros indivíduos.

Em animais domésticos são encontrados relatos de coinfeções principalmente no caso do papilomavirus bovino (BPV). Carvalho et al. (2012) relataram 88,8% de coinfeção de diferentes BPV em 72 amostras de bovinos no Brasil. No mesmo país, Yagui et al. (2008), encontraram os tipos BPV 1, 2 e 4 em três fêmeas e seus bezerros, em quanto Pangty et al. (2010) detectaram coinfeções por BPV 1 e 2 em 6 dentre 8 animais amostrados. Em zebras, foi descrita a coinfeção de BPV 1 e 2 em 56% animais com sarcoides (VAN DYK et al., 2009). Ademais, existe um relato de caso incomum de um pônei com tumor de células escamosas, no qual foi detectado simultaneamente BPV-1 e EcPV-2 (KAINZBAUER et al., 2012).

Os tipos virais encontrados também sem coinfeção foram 3, 4 e 6, o que pode indicar que estes vírus tenham maior capacidade de infecção, o que lhes possibilita expressar efeito patogênico de modo individual. Não obstante, outros fatores podem influenciar na detecção dos vários tipos virais numa mesma lesão, como a quantidade de DNA (que pode variar ao longo da lesão), como também o estado imunológico do hospedeiro.

O gene da  $\beta$ -actina foi amplificado nas três amostras negativas para todos os tipos de papilomavirus equinos, o que demonstra a qualidade da extração do DNA, e confirma a negatividade dessas amostras. Quando avaliadas as fotografias dos animais negativos foi observado que as lesões eram compatíveis com placa aural, mas eram muito pequenas. Possivelmente o tamanho das lesões e a técnica da biopsia (talvez pouco tecido) tenham interferido na quantidade de DNA viral coletado nessas amostras. Estes resultados possibilitam observar que a técnica da PCR é uma ferramenta específica e sensível para o diagnóstico definitivo da presença de papilomavirus em lesões de placa aural.

Atualmente não é possível encontrar dados na literatura que descrevam associações dos tipos de PVs e a presença de coinfeção com as características da lesão de placa aural. Neste estudo não foram encontradas associações da lesão (distribuição e tipo), com os tipos de PVs e a presença de coinfeção. Porém, os EcPVs 1, 3, 4 e 6 foram mais frequentemente isolados de lesões individuais, seguidas de lesões coalescentes, não demonstrando um padrão claro do tipo viral com respeito às características da lesão. Todavia, o EcPV 4 foi o mais frequente em todos os tipos de lesões. Além disso, a distribuição da lesão dentro da orelha foi similar para todos os tipos virais, sendo o EcPV 4 o mais frequente.

Em humanos os HPVs se encontram classificados clinicamente em HPVs de alto risco e HPVs de baixo risco, dependendo do tipo de lesão que causam.. Dentre os HPVs de alto risco os tipos virais estão distribuídos segundo o tipo de câncer que produzem (DOORBAR et al., 2012). A partir dessas classificações existem estudos com grande tamanho de amostra que relatam a associação do tipo viral com o tipo e grau de câncer, além da associação com os achados na histopatologia (DE SANJOSE et al., 2010). Provavelmente há uma relação entre o tipo de vírus e as características da lesão de placa aural que não foi possível evidenciar neste estudo, talvez se possam incluir em novos estudos outros dados como as características histopatológicas e macroscópicas (elevação, crostra, plana, etc) da lesão, além de um tamanho de amostra maior que possibilite agrupar melhor os dados.

Por outro lado, a presença de coinfeção de HPVs se encontra relacionada com a duração e persistência de infecções oncogênicas grau dois ou mais

(CAMPOS et al., 2010), porém na literatura revisada não foram encontrados estudos sobre a associação entre a presença de coinfeção e as características das lesões. Neste estudo não foi evidente uma associação dessas variáveis e a presença de coinfeção foi similar nas diferentes distribuições da lesão, não demonstrando um padrão dos dados relacionado com a coinfeção. No caso do tipo de lesão com presença de coinfeção a mais frequente foi —uma cinco pontos”, o qual é interessante porque é esperado que o tipo de lesão mais frequente em coinfeção seja a —~~de~~escente”, supondo sinergismo dos tipos de PVs. Talvez seja mais provável uma disputa entre os tipos de PVs pelo hospedeiro o que impede as infecções avançar a uma taxa maior. Porém, como foi antes discutida, uma alta frequência de coinfeções pode indicar mais um mutualismo do que uma disputa, mas os dados deste projeto não permitem definir com exatidão qual é a interação dos papilomavirus numa mesma lesão.

## **7. CONCLUSÕES**

A alta frequência de biopsias positivas neste estudo revela a ampla distribuição do EcPV nas diferentes regiões do Brasil, além de detectar pioneiramente a presença dos EcPVs 1, 5 e 6 nas lesões de placa aural em equídeos do país. Além disso, o tipo viral mais frequente nas cinco regiões foi o EcPV-4 e foi confirmada também a ausência dos EcPV 2 e 7 nas lesões. Adicionalmente os EcPVs 3 e 4 estão presentes em todas as amostras.

Ao menos dois tipos virais foram encontrados na maioria das amostras, confirmando a ocorrência de coinfeções nestas lesões. Não foram encontradas associações da lesão (tipo e distribuição) com o tipo de PV e a presença de coinfeção. Em geral as variáveis tiveram frequências similares, sendo o EcPV-4 o vírus mais comumente detectado.

## 8. REFERÊNCIAS

ALFIERI, A; ALFIERI, A; WOSIACKI, S. Papillomaviridae. Em: Flores, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, cap. 15, p.397-412.

ANTONSSON, A; HANSSON, B.G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *Journal of Virology*, v. 76, n. 24, p.12537-12542, 2002.

ANTONSSON, A; MCMILLAN, N. A. J. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 3195-3200, 2006.

BERNARD, H. U. Genome Diversity and Evolution of Papillomaviruses. In: Domingo, E; Parish, C. R; Holland, J. J. *Origin and Evolution of Viruses*. San Diego: Elsevier, 2008, p. 417-429.

BERNARD, H. U. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent developments. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 18, p. 357-361, 2013.

BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, v. 32S, p. S1-S6, 2005.

BERNARD, H. U; BURK, R. D; CHEN, Z; VAN DOORSLAER, K; ZUR HAUSEN, H; DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, p. 70-79, 2010.

BIENKOWSKA-HABA, M; PATEL, H.D; SAPP, M. Target Cell Cyclophilins Facilitate Human Papillomavirus Type 16 Infection. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2009.

BINNINGER, C. E; PIPER, R. C. Hyperplastic dermatitis of equine ear. *Journal of the American Animal Medical Association*, v. 153, p. 69-75, 1968.

BOGAERT, L; MARTENS, A; DEPOORTER, P; GASTHUYS, F. Equine sarcoids - Part 3: association with bovine papillomavirus. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v. 78, p. 131-137, 2008.

BRANDT, S; APPRICH, V; HACKL, V; TOBER R; DANZER, M; KAINZBAUER, C; GABRIEL, C; STANEK, C; KOFLE, J. Prevalence of bovine papillomavirus and Treponema DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Veterinary Microbiology*, v. 148, p. 161-167, 2011.

BRAVO, I. G; DE SANJOSÉ, S; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in Microbiology*, v. 18, n. 10, p. 432-438, 2010.

BRAVO, I. G; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, câncer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine and Public Health*, p. 32-51, 2015.

BUCK, C. B; DAY. P.M; TRUS, B.L. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, v. 445, p. 169-174, 2013.

CAMPOS, N.G; RODRIGUEZ, A.C; CASTLE, P.E; HERRERO, R; HILDESHEIM, A; KATKI, H; KIM, J.J; WACHOLDER, S; MORALES, J; BURK, R.D; SCHIFFMAN, M. Persistence of Concurrent Infections with Multiple Human Papillomavirus Types: A Population-based Cohort Study. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, p. 823-827, 2011.

CAROZZI, F; RONCO, G; GILLIO-TOS, A; DE MARCO, L; DEL MISTRO, A; GIRLANDO, S; FRANCESCHI, S; PLUMMER, M; VACCARELLA, S. Concurrent infections with multiple human papillomavirus (HPV) types in the New Technologies for Cervical Cancer (NTCC) screening study. *European Journal of Cancer*, v. 48, p. 1633-1637, 2012.

CARVALHO, C. C. R; BATISTA, M. V. A; SILVA, M. A. R; BALBINO, V. Q; FREITAS, A. C. Detection of Bovine Papillomavirus Types, Co-Infection and a Putative New BPV11 Subtype in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 59, p. 41-447, 2012.

CERQUEIRA, C; LUI, Y; KÜLHING, L; CHAI, W; HAFEZI, W; VAN KUPPEVELT, T.H; KÜHN, J.E; FEIZI, T; SCHELHAAS, M. Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus Type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cellular Microbiology*, v. 15, n. 11, p. 1818-1836, 2013.

CHAMBERS, G; ELLSMORE, V.A; O'BRIEN, P.M; REID, S.W.J; LOVE, S; CAMPO, M.S; NASIR, L. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 1055-1062, 2003.

CHATURVEDI, A.K; KATKI, H.A; HILDESHEIM, A; RODRIGUEZ, A.C; QUINT, W; SCHIFFMAN, M; VAN DOORN, L.J; PORRAS, C; WACHOLDER, S; GONZALEZ, P; SHERMAN, M.E; HERRERO, R. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, p. 910-920, 2011.

CHATURVEDI, A.K; MYERS, L; HAMMONS, A.F; CLARK, R.A; DUNLAP, K; KISSINGER, P.J; HAGENSEE, M.E. Prevalence and Clustering Patterns of Human Papillomavirus Genotypes in Multiple Infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, v. 14, n. 10, p. 2439-2445, 2005.

CULP, T.D; BUDGEON, L.R; CHRISTENSEN, N.D. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology*, v. 347, p. 147-159, 2006a.

CULP, T.D; BUDGEON, L.R; MARINKOVICH, M.P; MENEGUZZI, G; CHRISTENSEN, L.R. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomavirus by binding virions and transferring them to adjacent cells. *Journal of Virology*, v. 80, n. 18, p. 8940-8950, 2006b.

CULP, T.D; CHRISTENSEN, N.D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*, v. 319, p. 152-161, 2004.

DAY, P. M; SCHELHAAS, M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Current Opinion in Virology*, v. 4, p. 24-31, 2014.

DE SANJOSE, S; QUINT, W.G.V; ALEMANY, L; GERAETS, D.T; KLAUSTERMEIER, J.E; LLOVERAS, B; TOUS, S; FELIX, A; BRAVO, L.E; SHIN, H.R; VALLEJOS, C.S; ALONSO DE RUIZ, P; LIMA, M.A; GUIMERA, N; CLAVERO, O; ALEJO, M; LLOMBART-BOSCH, A; CHENG-YANG, C; TATTI, S.A; KASAMATSU, E; ILJAZOVIC, E; ODIDA, M; PRADO, R; SEOUD, M; GRCE, M; USUBUTUN, A; JAIN, A; HERNANDEZ, G.A; LOMBARDI, L.E; BANJO, A; MENÉNDEZ, C; DOMINGO, E.J et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncology*, v.11, p.1048-1056, 2010.

DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 445, p. 2-10, 2013.

DE VILLIERS, E. M; FAUQUET, C; BROKER, T. R; BERNARD, H. U; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, p. 17-27, 2004.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, v. 32S, p. S7-S15, 2005.

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*, v. 30S, p. F55-F70, 2012.

DSIDUSZKO, A; OZBUN, M.A. Annexin A2 and S100A10 Regulate Human Papillomavirus Type 16 Entry and Intracellular Trafficking in Human Keratinocytes. *Journal of Virology*, v. 87, n. 13, p. 7502-7515, 2013.

FAIRLEY, R. A; HAINES, D. M. The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. *Veterinary Pathology*, v. 29, p. 70-81, 1992.

FISCHER, N.M; FAVROT, C; BIRKMANN, K; JACKSON, M; SCHWARZWALD, C.C; MÜLLER, M; TOBLER, K; GEISSELER, M; LANGE, C.E. Serum antibodies and DNA indicate a high prevalence of equine papillomavirus 2 (EcPV2) among horses in Switzerland. *Veterinary Dermatology*, v. 25, p. 210-e54, 2014.

GARCÍA-VALLVÉ, S; ALONSO, A; BRAVO, I. G. Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 11, 514-521, 2005.

GHIM, S.J; RECTOR, A; DELIUS, H; SUNDBERG, J.P; JENSON, A.B; VAN RUNST, M. Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 324, p. 1108-1115, 2004.

GIROGLOU, T; FLORIN, L; SCHÄFER, F; STREECK, R.E; SAPP, M. Human papillomavirus requires cell surface heparin sulfate. *Journal of Virology*, v. 75, n. 3, p. 1565-1570, 2001.

GOLDMAN, B; REBOLJA, M; RYGAARDB, C; PREISLERB, S; EJEGODB, D.M; LYNGBEA, E; BONDE, J. Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark. *Vaccine*, v. 31, p. 1604-1609, 2013.

GORINO, A. C; OLIVEIRA-FILHO, J. P; TANIWAKI, S. A; BASSO, R. M; ZAKIA, L. S; ARAUJO JR, 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, p. 903-904, 2013.

HORVATH, C.A.J; BOULET, G.A.V; RENOUX, V.M; DELVENNE, P.O; BOGERS, J.P.J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology Journal*, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2010.

HUANG, H.S; LAMBERT, P.F. Use of an in vivo Animal Model for Assessing the Role of Integrin  $\alpha 6\beta 4$  and Syndecan-1 in Early Steps in Papillomavirus Infection. *Virology*, v. 433, n. 2, p. 395-400, 2012.

JACKSON, H.A. Papillomatosis (Warts). In: Robinson, E. *Current Therapy in Equine Medicine*. St. Louis: Saunders, 2003. chap.4.13, p. 212.

KAINZBAUER, C; RUSHTON, J; TOBER, R; SCASE, T; NELL, B; SYKORA, S; BRANDT, S. Bovine papillomavirus type 1 and Equus caballus papillomavirus 2 in equine squamous cell carcinoma of the head and neck in a Connemara mare. *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 112-115, 2012.

KING, A. M. Q; ADAMS, M. J; CARSTENS, E. B; LEFKOWITZ, E. J. Family Papillomaviridae. In: \_\_\_\_\_. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012, p. 235-239.

KNIGHT, C.G; MUNDAY, J.S; ROSA, B.V; KIUPEL, M. Persistent, widespread papilloma formation on the penis of a horse: a novel presentation of equine papillomavirus type 2 infection. *Veterinary Dermatology*, v. 22, p. 570-574, 2011.

KNOTTENBELT, D.C; PASCOE, R.R. Sistema Tegumentar. Em: \_\_\_\_ *Afecções e Distúrbios do Cavallo*. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998, cap. 8, p. 280.

LANGE, C. E; TOBLER, K; ACKERMANN, M; FAVROT, C. Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. *Veterinary Microbiology*, v. 149, p. 85-90, 2011.

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*, v. 94, p. 1365-1372, 2013.

LANGE, C.E; TOBLER, K; FAVROT, C; MÜLLER, M; NÖTHLING, J.O; ACKERMANN, M. Detection of Antibodies against Epidermodysplasia Verruciformis-Associated Canine Papillomavirus 3 in Sera of Dogs from Europe and Africa by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, n. 1, p. 66-72, 2009.

LANGE, C.E; TOBLER, K; LEHNER, A; GREY, P; WELLE, M.M; SCHWARZWALD, C.C; FAVROT, C. EcPV2 DNA in Equine Papillomas and In Situ and Invasive Squamous Cell Carcinomas Supports Papillomavirus Etiology. *Veterinary Pathology*, v. 50, n. 4, p. 686-692, 2012.

LIAW, K.L; HILDESHEIM, A; BURK, R.D; GRAVITT, P; WACHOLDER, S; MANOS, M.M; SCOTT, D.R; SHERMAN, M.E; KURMAN, R.J; GLASS, A.G; ANDERSON, S.M; SCHIFFMAN, M. A Prospective Study of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA Detection by Polymerase Chain Reaction and Its Association with Acquisition and Persistence of Other HPV Types. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 183, p. 8-15, 2001.

MACLACHLAN, J.N; DUBOVI, E.J. Papillomaviridae and Polyomaviridae. In: \_\_\_\_\_. *Fenner's Veterinary Virology*. San Diego: Elsevier, 2011, chap. 11, p. 214-219.

MAGLENNON, G. A; DOORBAR, J. The biology of papillomavirus latency. *The Open Virology Journal*, v. 6, sup.2:M4, p.190-197, 2012.

MCBRIDE, A.A. Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. *Advances in Virus Research*, v. 72, p. 155-186, 2008.

MEJLHEDE, N; PEDERSEN, B.V; FRISCH, M; FOMSGAARD, A. Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy?. *APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 118, p. 346–352, 2010.

MENGUAL-CHULIÁ, B; GARCÍA-PÉREZ, R; GOTTSSCHLING, M; NINDL, INGO; BRAVO, I. G. Novel animal papillomavirus sequences and accurate phylogenetic placement. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 65, p. 883-891, 2012.

MUNDAY, J. S. Bovine and Human Papillomaviruses: a comparative review. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 6, p. 1063-1065, 2014.

MUNDAY, J.S; KIUPEL, M; FRENCH, A.F; HOWE, L. Amplification of papillomaviral DNA sequences from a high proportion of feline cutaneous in situ and invasive squamous cell carcinomas using a nested polymerase chain reaction. *Veterinary Dermatology*, v. 19, p. 259-263, 2008.

MUNDAY, J.S; WTIHMAN, A.I. Frequent detection of papillomavirus DNA in clinically normal skin of cats infected and noninfected with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 307-310, 2009.

NASIR, L; BRANDT, S. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Veterinary Microbiology*, v. 167, p. 159-167, 2013.

NASIR, L; CAMPO, M.S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary Dermatology*, v. 19, p. 243-254, 2008.

NICHOLLS, P. K; STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 73, p. 101-27, 2000.

OLIVEIRA-FILHO, J.P; BADIAL, P.R; CUNHA, P.H.J; CRUZ, T.F; ARAÚJO JR, J.P; DIVERS, T.J; WINAND, N.J; BORGES, A.S. Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.135, p.34–42, 2010.

PANGTY, K; SINGH, S; GOSWAMI, R; SAIKUMAR, G; SOMVANSHI, R. Detection of BPV-1 and -2 and Quantification of BPV-1 by Real-Time PCR in Cutaneous Warts in Cattle and Buffaloes. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, p. 185-196, 2010.

PAYNE, E; BOWLES, M.R; DON, A; HANCOCK, J.F; MCMILLAN, N.A.J. Human Papillomavirus Type 6b Virus-Like Particles Are Able To Activate the Ras-MAP Kinase Pathway and Induce Cell Proliferation. *Journal of Virology*, v. 75, n. 9, p. 4150-4157, 2001.

PEH, W. L; MIDDLETON, K; CHRISTENSEN, N; NICHOLLS, P; EGAWA, K; SOTLAR, K; BRANDSMA, J; PERCIVAL, A; LEWIS, J; LIU, W. J; DOORBAR, J. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *Journal of Virology*, v. 76, n. 20, p. 10401-10416, 2002.

POSTEY, R. C; APPLEYARD, G. D; KIDNEY, B.A. Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sacoids for the presence of equine papillomavirus

DNA and papillomavirus antigen. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 71, p. 28-33, 2007.

RECTOR, A; VAN RANST, M. Animal papillomaviruses. *Virology*, v. 445, p. 213-223, 2013.

REES, C.A. Disorders of the skin. In: Reed, S.M, Bayly, W.M, Sellon, D.C. *Equine Internal Medicine*, 2004. chap.11, p. 717.

RICHARDS, R.M; LOWY, D.R; SCHILLER, J.T; DAY, P.M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *PNAS*, v. 103, n. 5, p. 1522-1527, 2006.

ROSITCH, A.F; POOLE, C; HUDGENS, M.G; AGOT, K; NYAGAYA, E; MOSES, S; SNIJDERS, P.J.F; MEIJER, C.J; BAILEY, R.C; SMITH, J.S. Multiple Human Papillomavirus Infections and Type Competition in Men. *The Journal of Infectious Diseases*, p. 1-10, 2011.

ROUSSEAU, M.C; PEREIRA, J.S; PRADO, J.C.M; VILLA, L.L; ROHAN, T.E; FRANCO, E.L. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, p. 1508-1517, 2001.

SCASE, T; BRANDT, S; KAINZBAUER, C; SYKORA, S; BIJMHOLT, S; HUGHES, K; SHARPE, S; FOOTE, A. Equus caballus papillomavirus-2 (EcPV-2): An infectious cause for equine genital cancer?. *Equine Veterinary Journal*, v. 42, n. 8, p. 738-745, 2010.

SCHEFFER, K.D; GAWLITZA, A; SPODEN, G.A; ZHANG, X.A; LAMBERT, C; BERDITCHEVSKI, F; FLORIN, L. Tetraspanin CD151 Mediates Papillomavirus Type 16 Endocytosis. *Journal of Virology*, v. 87, n. 6, p. 3435-3446, 2013.

SCHELHAAS, M; SHAH, B; HOLZER, M; BLATTMANN, P; KÜLHING, L; DAY, P.M; SCHILLER, J.T; HELENIUS, A. Entry of Human Papillomavirus Type 16 by

Actin- Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 4, p. 1-21, 2012.

SCOTT, D. W; MILLER, W. H. Neoplasms, cysts, hamartomas and keratoses. In:\_\_\_\_. *Equine Dermatology*. Meryland Heights: Elsevier Saunders, 2003. chap.16, p. 468-472.

SELINKA, H.C; FLORIN, L; PATEL, H.D; FREITAG, K; SCHMIDTKE, M; MAKAROV, V.A; SAPP, M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparin sulfate-binding drug or antibodies induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *Journal of Virology*, v. 81, n. 20, p. 10970-10980, 2007.

SELINKA, H.C; GIROGLOU, T; NOWAK, T; CHRISTENSEN, N.D; SAPP, M. Further Evidence that Papillomavirus Capsids Exist in Two Distinct Conformations. *Journal of Virology*, v. 77, n. 24, p. 12961-12967, 2003.

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 equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 6, p. 279-284, 2008.

SPODEN, G; FREITAG, K; HUSMANN, M; BOLLER, K; SAPP, M; LAMBERT, C; FLORIN, L. Clathrin- and Caveolin-Independent Entry of Human Papillomavirus Type 16—Involvement of Tetraspanin- Enriched Microdomains (TEMs). *PLoS One*, v. 3, n. 10, p. 1-15, 2008.

TANIWAKI, S. A; MAGRO, A. J; GORINO, A. C; OLIVEIRA-FILHO, J. P; FONTES, M. R. M; BORGES, A. S; ARAUJO JR, J. P. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. *Veterinary Microbiology*, v. 162, p. 85-93, 2013.

THOMAS, K.K; HUGHES, J.P; KUYPERS, J.M; KIVIAT, N.B; LEE, S-K; ADAM, D.E; KOUTSKY, L.A. Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 182, p. 1097-1102, 2000.

TORRES, S.M.F; KOCH, S.N. Papillomavirus-Associated Diseases. *Veterinary Clinics Equine Practice*, v.29, p. 643-655, 2013.

TORRES, S.M.F; MALONE, E.D; WHITE, S.D; KOCH, S; WATSON, J.L. The efficacy of imiquimod 5% cream (Aldara?) in the treatment of aural plaque in horses: a pilot open-label clinical trial. *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 503-509, 2010.

VALENTINE, B. A. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 18, p. 123-126, 2006.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. *Virology*, v. 445, p. 11-20, 2013b.

VAN DOORSLAER, K; BERNARD, H. U; CHEN, Z; DE VILLIERS, E. M; ZUR HAUSEN, H; BURK, R. D. Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trends in Microbiology*, v. 19, n. 12, p. 49-50, 2011.

VAN DOORSLAER, K; TAN, Q; XIRASAGAR, S; BANDARU, S; GOPALAN, V; MOHAMOUD, Y; HUYEN, Y; MCBRIDE, A.A. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acid Research*, v. 41, n. D, p. D571-D578, 2013a.

VAN DYK, E; OOSTHUIZEN, M.C; BOSMAN, A.M; NEL, P.J; ZIMMERMAN, D; VENTER, E.H. Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. *Journal of Virology Methods*, v. 158, p. 141–151, 2009.

WANG, J.W; RODEN, R.B.S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, v. 445, p. 175-186, 2013.

WHITE, E. A; HOWLEY, P. M. Proteomic approaches to the study of papillomavirus-host interactions. *Virology*, v. 435, p. 57-69, 2013.

WOBESER, B. K; DAVIES, J. L; HILL, J. E; JACKSON, M. L; KIDNEY, B. A; MAYER, M. N; TOWNSEND, H. G. G; ALLEN, A. L. Epidemiology of equine

sarcoids in horses in western Canada. *Canadian Veterinary Journal*, v. 51, p. 1103-1108, 2010.

YAGUIU, A.; DAGLI, M.L.Z; BIRGEL JR, E.H; ALVES REIS B.C.A; FERRAZ, O.P; PITUCO, A.C. FREITAS, E.M; BEÇAK, W; STOCCO, R.C. Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: In situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genetic Molecular Research*, v. 7, p. 487-497, 2008.

YUAN, Z; GALLAGHER, A; GAULT, E.A; CAMPO, M.S; NASIR, L. Bovine papillomavirus infection in equine sarcoids and in bovine bladder cancers. *The Veterinary Journal*, v. 174, p. 599-604, 2007.

ZAKIA, L.S; BASSO, R.M; ARAUJO JR, J.P; BORGES, A.S; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Detecção dos EcPVs em amostras de placa aural equinas incluídas em parafina usando a PCR. Em: \_\_\_\_Anais da XV Conferência Anual ABRAVEQ, 2014, p.182.

## 9. TRABALHO CIENTÍFICO



**Author guidelines:** [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3164/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3164/homepage/ForAuthors.html)

### **Clinical prevalence and epidemiologic features of aural plaques**

Juliana Mira\*, Mariana Herman\*, Luiza S. Zakia\*, Giovane Olivo\*, João P. Araújo Jr†, Alexandre S. Borges\*, José P. Oliveira-Filho\*

\* UNESP – Univ. Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Department of Veterinary Clinical Science, School of Veterinary Medicine and Animal Science Botucatu, SP 18618970, Brazil.

† UNESP – Univ. Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Botucatu, SP 18618970, Brazil.

Correspondence: José P. Oliveira-Filho, Department of Veterinary Clinical Science, Botucatu, SP 18618970, Brazil. E-mail: [zefilho@fmvz.unesp.br](mailto:zefilho@fmvz.unesp.br)

**Conflict of interest:** No conflicts of interest have been declared.

**Sources of funding:** Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) process 2013/15995-8.

## **Abstract**

**Background** - Aural plaques are detected on the inner surface of one or both ears, and despite its low malignancy, these lesions sometimes cause discomfort and hypersensitivity in horses in addition to causing a loss in commercial value due to aesthetic issues. So far, there have been only two studies on the descriptive epidemiologic features and clinical prevalence of equine aural plaques.

**Hypothesis/Objectives** - The aim of this study was to determine the clinical prevalence and epidemiological features of aural plaques.

**Animals** - 891 horses with a median age of five years comprising both sexes and various breeds from different regions of Brazil were assessed for aural plaques.

**Methods** - Horses were evaluated only by general observation of the body and detailed observation of both ears. Information on the management system, characteristics of the lesion, presence of ticks and ear grooming was collected for 109 of the 891 horses. An assessment of the frequency distribution of the disease and its characteristics was performed. Association tests were executed to establish the relationship between the variables studied.

**Results** - In 85.1% (40/47) of the farms assessed, at least one horse presented aural plaques. In 14.8% (132/891) of the horses, characteristic lesions of aural plaque were detected. Significant associations between the 'coalescing' lesion and the 'semi-intensive' management system and ear grooming were observed.

**Conclusions** - The findings confirm the extensive distribution of the disease all over the country, with a higher number of cases being observed in the north-eastern and southern regions.

## Introduction

Aural plaques, or hyperplastic dermatitis, presents as well-demarcated, depigmented, hyperkeratotic plaques on the concave aspect of one or both ears.<sup>1-4</sup> The plaques can vary between less than one millimetre (mm) to 20 mm and could affect more than the 40% of the pinnae<sup>1</sup>. No sex or age tendency has been reported; however, the lesion is rarely described in horses younger than one year.<sup>4</sup> Horses may be asymptomatic or show some level of ear and head hypersensitivity, such as a reluctance to be touched on the ears or head.<sup>4</sup>

On histopathological evaluation, these lesions have features consistent with papilloma virus infection, such as koilocytosis, papillated epidermal hyperplasia and an increased number and size of keratohyalin granules.<sup>5</sup> In immunohistochemistry and electron microscopic studies, the presence of intranuclear, crystalline, hexagonal viral particles approximately 38-42 nm in diameter that are compatible with papillomavirus have been observed.<sup>5</sup>

The disease has already been described as being associated with *Equus caballus papillomavirus* types 3, 4, 5 and 6 (EcPV-3, EcPV-4, EcPV-5 and EcPV-6),<sup>2,7,8,9</sup> and characterization of the type of virus can be conducted by polymerase chain reaction (PCR) assays.<sup>2,3,7,8,9</sup>

Until now, aural plaques are not known to resolve spontaneously,<sup>2-4</sup> and biting insects may aggravate the symptoms (ear hypersensitivity and reluctance to allow the ears to be touched)<sup>4</sup> or may participate in the transmission. However, this has not been confirmed scientifically.<sup>1,5,6,10</sup> At the moment, the treatment that has proven most efficacious is imiquimod (Aldara®) 5%<sup>11</sup>, a synthetic imidazoquinoline amine-based immune response modifier, with potent antiviral and antitumour effects.<sup>12,13</sup>

Despite descriptive epidemiologic features and clinical prevalence studies, equine aural plaques have not been well defined in Brazil or in other countries worldwide.<sup>11</sup> Until now, only a single study has been published in Brazil, but it was

performed only in one state and reported a prevalence of 57% for Mangalarga horses and 35% for Quarter Horses.<sup>14</sup> Additionally, another study in North America, reported a prevalence of aural plaques in 20-24% of horses.<sup>1</sup> Therefore, the aim of this study was to address the clinical prevalence and some epidemiologic features of aural plaques in Brazil, which can give information about the current state of this disease in the country and allow the identification of some factors associated with the progression of the lesions. This information may facilitate the design of prevention programmes that improve equine health and enable the treatment of the disease.

## **Materials and methods**

### *Animals*

All procedures were previously approved by the Institutional Ethical Committee (120/2013-CEUA). A total of 891 horses with a median age of five years (minimum of one year and a maximum of 22 years) were evaluated, comprising both sexes and various breeds from different regions of Brazil (northern, north-eastern, mid-western, southern and south-eastern). Individual information was collected for 109 of the 891 assessed horses and from 37 of the 47 evaluated farms due to logistics. Farms were chosen according to the availability of the owners, and the horses were assessed by two veterinarians.

### *Data collection*

Horses were evaluated by general observation of the body and detailed observation of both ears, and the information obtained was recorded on forms. General data included age, sex and the presence of lesions consistent with aural plaques. Data collected on the 109 horses with individual clinical records included the presence of ticks (yes or no), the type of management system or horse-keeping system (‘intensive’ or stabled, ‘semi-intensive’ or half-time stabled, and ‘extensive’ or free pasture), bilateral lesions (yes or no) and ear grooming (yes or no). For the assessment of the distribution of the lesions in the ears, four quadrants were

established, indicated on **figure 1**, and for the type of lesion, three categories were also defined (**figure 2**).

### *Statistical analysis*

All data were entered into Excel®. Descriptive statistics were produced to determine the median age of the evaluated group (PROC MEANS; SAS® 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A frequency distribution was made for categorical data, including the frequency of detection (prevalence) in the country by farm and by animal (cross-tabular freq). Chi square and Fisher tests (PROC FREQ; SAS Institute) were performed to determine the association between the lesion (type and distribution) and the type of management, ear grooming or tick presence (for the 109 horses), and between sex and presence of aural plaques (for the 891 horses). For variables with possible confounders, a stratified analysis of categorical data was performed by a Cochran-Mantel-Haenszel test (PROC FREQ; SAS Institute), and the odds ratio was also calculated. Statistical significance was assumed with a *P* value <0.05.

### **Results**

Forty-seven farms in the five regions of Brazil were assessed of which 85.1% (40) had at least one horse positive for aural plaque; the north-eastern and southern regions had the higher occurrences (**table 1**).

Of the examined horses, 36.4% (324) were males, and 63.63% (567) were females. The frequency of detection (prevalence) of aural plaques in the 891 horses evaluated was 14.81% (132), and the regions with the higher occurrence by horse according to the analysis were the north-eastern and southern regions (**table 1**). The breeds of the horses assessed with clinical records (aural plaque positive) are indicated in **table 2**; the Mangalarga Marchador and Mangalarga Paulista (combined) and the Quarter Horse were the breeds with the highest frequencies.

Bilateral lesions were detected in 45.87% (50/109) of the horses, and 65.14% (71/109) had ticks in the ears. In this group, the distribution and type of lesion were analysed in both ears (164 ears) (**table 3**).

No significant association was observed between the lesion (type and distribution) and the presence of ticks (in the 109 horses) or between sex and the presence of aural plaques (in the 891 horses). On the other hand, a significant association was detected between the lesions that were 'single to five points' or 'coalescing' and the type of management system ( $P = 0.027$ ,  $P = 0.051$ , respectively). Moreover, a significant association was found between ear grooming and 'coalescing' lesions ( $P = 0.047$ ).

A stratified analysis was performed to determine if there were confounders among the associations of ear grooming, management system and the type of lesion. The association between the type of lesion ('coalescing') and ear grooming were observed to vary with the type of management system ('semi-intensive') ( $P = 0.0013$ ). The odds ratio was 8.6 (95% CI 2-37.03) for 'semi-intensive' management where ear grooming is used; this suggests that farms with 'semi-intensive' management where ear grooming is performed have 8.6 more chances of having horses with 'coalescing' lesions.

## Discussion

Aural plaques have been described and identified as a clinical entity for a long time.<sup>1,5,10</sup> Although there has been research on aural plaques and especially on the type of viruses involved in the disease,<sup>2,8,9,15</sup> there has not been an attempt to describe the clinical prevalence and epidemiological characteristics in the various regions of a country.

PCR has been used to determine the prevalence of specific viral types in aural plaques, but this was done for clinically positive horses, so the prevalence of the disease in Brazil could not be determined.<sup>15</sup> Unlike for sarcoids, which are the most

common skin tumour in horses,<sup>14,16,17</sup> a lack of information exists about the real clinical prevalence of aural plaques.

In this study, the prevalence of aural plaques in horses is lower (14.81%, 132/891) than the 20-24% reported in the western and north-western United States and south-western Canada<sup>1</sup> and much lower than what was described in Sao Paulo State, where 57% (173/306) of the Mangalarga horses and 35% (96/275) of the Quarter Horses were positive for aural plaques.<sup>13</sup> The north-eastern and southern regions had higher prevalence, and Sao Paulo State is located in the southern region. This may be a reason for the higher prevalence in the study mentioned before because only one group of horses was assessed. Contrary to the prevalence by horse, the prevalence by farm is much higher (85.1%), which indicates the extensive distribution of the disease in the country. This demonstrates that aural plaques represent an important clinical problem in Brazil because although the mode of transmission is not yet clear, the presence of one positive horse may increase the risk of healthy horses developing the disease. These data are close to the 50-70% reported before in different ranches in Oregon, USA<sup>1</sup>.

In addition, clinical detection has been reported as being higher in Mangalarga horses than in Quarter Horses.<sup>13</sup> In this study, the frequency of detection by breed in the animals (891) was not possible, but in the 109 horses with clinical records, the Mangalarga Marchador and Mangalarga Paulista (combined) accounted for 45.95% of the horses assessed, whereas Quarter Horses accounted for 36.7%; these breeds may be more affected by this disease, but more, well-designed studies are necessary to establish this. However, the majority of studies<sup>1,9,18</sup> did not report any breed predisposition. Several studies have evaluated the relative risk for the development of sarcoid lesions among breeds,<sup>19,20</sup> and the Quarter Horse was found to be at a higher risk of developing this disease in contrast to other works where no breed predisposition was found.<sup>18</sup> This might indicate that development of diseases associated with papillomavirus may be influenced by more than one risk factor, and that is why controversy remains about breed predisposition.

In previous studies of sarcoids in Equidae, sex predisposition for the development of the disease was found in some studies.<sup>20,21</sup> This is different from the results of other studies of the same disease where no sex predisposition was found,<sup>17</sup> as in the previous study of aural plaques performed in Brazil<sup>13</sup>, which is in agreement with this work. These may be explained by the previously stated argument about confounders being involved in the progression of the disease.

Aural plaques can be present with punctuated or extensive plaques over the ear,<sup>13,22</sup> but an assessment of the distribution of the lesion on the ear has not been made so far. In this research, the most commonly observed distribution of the lesion in the ear was with three or more quadrants affected', and the most common type of lesion was single to five points'. The coalescing' lesion was expected to be found more frequently if the most common distribution was three or more quadrants', but coalescing' lesions were also present in one or two quadrants, so the data were divided, making a significant association more difficult to find. The frequency of bilateral lesions was close to that previously reported in Mangalarga horses (53% (91/173)) and Quarter Horses (33% (32/96)), and no association was found with the type of management, ear grooming or the presence of ticks.

So far, there have not been any studies of aural plaques related to the factors associated with the clinical presentation of the disease. In this work, the type of lesion was observed to be significantly associated with the type of management, and for the first time, it is also associated with ear grooming. By stratified analysis, the aforementioned association was found to vary with the management system, which can be a confounder because ear grooming is attached to the management system. This shows that more than one factor may be involved in the progression of the lesion and probably with the development of the disease, but additional studies with a higher sample size (more than 109) and larger epidemiologic design are necessary to establish the interactions participating in the presentation of the disease.

Similar lesions were not observed in other parts of the body, contrary to other studies where lesions similar to aural plaques in the perianal region of positive horses were reported,<sup>1,18</sup> which is similar to other papillomatoses that can affect different parts of the body.<sup>17,23</sup> One example of these are equine sarcoids, which are also caused by a type of papillomavirus and can be distributed on the head, limbs, neck and shoulders, axilla and chest, paragenital region<sup>17</sup> and abdomen.<sup>23-25</sup> The variability in the distribution of equine sarcoids over the body is suspected to be due to different uses of horses depending on the country or region<sup>17</sup>, which can also be involved in the prevalence and distribution of aural plaque lesions in the ears, but this has not been scientifically examined.

Currently, little is known about how the disease is transmitted between animals. There has been some speculation that transmission occurs by biting insects.<sup>1,5</sup> Early studies showed the presence of bovine papillomavirus type 1 in flies trapped in the proximity of sarcoid-affected horses.<sup>26</sup> The presence of ticks and the absence of flies on the ears has also been reported in both positive and negative horses assessed for aural plaque.<sup>13</sup> In the present study, an association between the lesion (type and distribution) and the presence of ticks was not observed; the association over the whole group of horses was not tested because clinical records were only created for 109 of them.

In summary, the study described herein is the largest study of the clinical prevalence and epidemiologic characteristics of equine aural plaques conducted in Brazil. It supports other studies performed in Brazil and also shows the real prevalence of the disease across the entire country. The prevalence was detected to vary in the different regions, perhaps because of the multiple factors involved, such as environmental conditions or management customs.

## **Conclusions**

The prevalence of aural plaques in Brazil is lower than others have reported when analysed by individual horses but not when assessed by farm where the prevalence is higher. This confirms the presence and the extensive distribution in

the country, where the north-eastern and southern regions are the ones with the higher number of cases, and the Quarter Horse and Mangalarga are the most frequent breeds. A predisposition to aural plaques based on sex was not found in this group of horses.

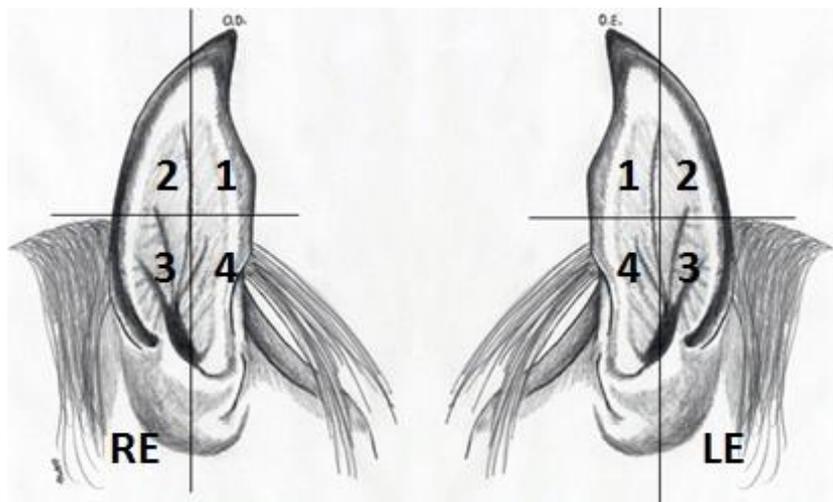
The most frequent distribution of the lesion was three or more ear quadrants affected, and the most common type of lesion was single to five points. No association was found between the lesion (type and distribution) and the presence of ticks, but further evaluation that includes other factors involved is needed to determine exactly how ectoparasites participate in the progression of the lesion.

There is significant association between the coalescing lesion and the semi-intensive management system and between this same type of lesion and ear grooming. Ear grooming was also detected to vary with the management system, which can be a confounder in the characteristics of the lesion and may be a confounder in the development of the disease, but more studies are necessary to determine the interaction of these factors and the presence of aural plaques in depth.

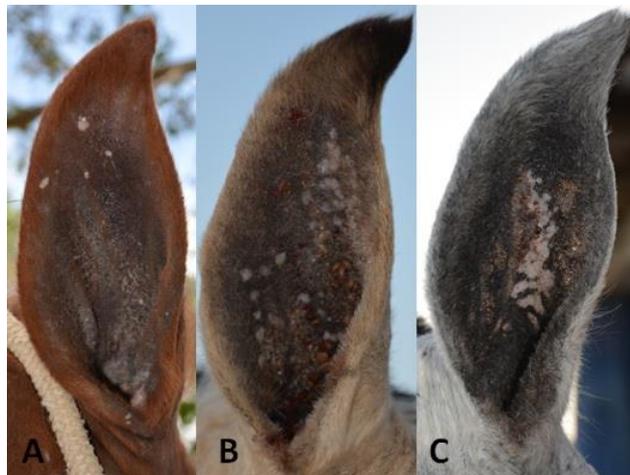
**Acknowledgements**

We acknowledge Fapesp - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo Sao Paulo (process 2013/15995-8) and the Graduate Scholarship Program for Foreign Students of the National Council of Scientific and Technological Development-Brazil (Programa Estudantes-Convênio Pós-graduação PEC-PG do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, 190237/2013-9).

**Figure 1.** Representation of ear quadrants; RE: right ear; LE: left ear; quadrant numbers indicated in the figure.



**Figure 2.** Ears with aural plaque lesions; type of lesion categories, A: 'one to five points'; B: 'multiple points' (more than five); and C: 'coalescing' are indicated.



**Table 1.** Frequency distribution aural plaque detection in the farms and horses by region

Region	Evaluated Farms	Positive Farms	Evaluated Animals	Positive Animals
Midwest	23.4% (11/47)	17.0% (8/47)	19.6% (175/891)	2.1% (19/891)
North	14.9% (7/47)	14.9% (7/47)	21.2% (189/891)	2.6% (23/891)
Northeast	27.7% (13/47)	19.1% (9/47)	39.1% (348/891)	3.9% (32/891)
South	10.6% (5/47)	10.6% (5/47)	14.3% (127/891)	3.5% (31/891)
Southeast	23.4% (11/47)	23.4% (11/47)	5.8% (52/891)	3.0% (27/891)

**Table 2.** Frequency distribution of breeds of horses (109) with individual clinical records

Breed	Frequency
Percheron	0.9% (1/109)
Campolina	1.8% (2/109)
Brazilian Creole Horse	2.8% (3/109)
Paint	4.6% (5/109)
Crossbreed	8.3% (9/109)
Mangalarga Paulista	20.2% (22/109)
Mangalarga Marchador	24.8% (27/109)
Quarter Horse	36.7% (40/109)

**Table 3.** Frequency distribution of the type and distribution of the lesions in the ear (includes both ears)

Area affected	Frequency	Type of lesion	Frequency
I	33.5% (55/164)	A	45.7% (75/164)
II	26.8% (44/164)	B	16.5% (27/164)
III	39.6% (65/164)	C	37.8% (62/164)

\* I: only one quadrant affected; II: two quadrants affected; and III: three or more quadrants affected. A: single to five points'; B: multiple points'; and C: coalescing'.

## References

1. Binninger CE, Piper RC. Hyperplastic dermatitis of equine ear. *J Am Anim Med Ass* 1968; 153: 69-75.
2. Postey RC, Appleyard GD, Kidney BA. Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sacoids for the presence of equine papillomavirus DNA and papillomavirus antigen. *Canadian J Vet Res* 2007; 71:28-33.
3. MacLachlan JN, Dubovi EJ. Papillomaviridae and Polyomaviridae. In: MacLachlan JN, Dubovi EJ, eds. *Fenner's Veterinary Virology*. 4th edition. San Diego, CA: Elsevier, 2011; 214-219.
4. Torres SMF, Koch SN. Papillomavirus-Associated Diseases. *Vet Clin Equine* 2013; 29: 643-655.
5. Fairley RA, Haines DM. The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. *Vet Pathol* 1992; 29: 70-81.
6. Fairley RA, Morley CM, Williams SD *et al*. Aural plaques in two imported horses in New Zeland. *New Zeland Veterinary Journal* 2014; 62: 232-233.
7. 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.
8. Taniwaki SA, Magro AJ, Gorino AC *et al*. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. *Vet Microbiol* 2013; 162: 85-93.
9. Lange CE, Vetsch E, Ackermann M *et al*. Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. *J General Virol* 2013; 94: 1365-1372.
10. Scott DW, Miller WH Jr. Cutaneous neoplasms. In: Scott DW, Miller WH Jr, eds. *Equine Dermatology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2003: 700.
11. 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* 2010; 21: 503-509.

12. Chuang CM, Monie A, Hung CF *et al.* Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination. *J Biomed Sci* 2010; 17: 1-11.
13. Desai T, Chen CL, Desai A *et al.* Basic Pharmacology of Topical Imiquimod, 5-Fluorouracil and Diclofenac for the Dermatologic Surgeon. *Dermatol Surg* 2012; 38: 97-103.
14. Sousa NR, Adorno VB, Marcondes JS *et al.* Clinical and histopathological characteristics of aural plaque in Mangalarga and Quarter Horses. *Pes Vet Bras* 2008; 28: 279-284.
15. Gorino AC, Oliveira-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.
16. Valentine BA. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest. *J Vet Diag Invest* 2006; 18: 123-126.
17. Wobeser BK, Davies JL, Hill JE *et al.* Epidemiology of equine sarcoides in horses in western Canada. *Can Vet J* 2010; 51: 1103-1108.
18. Johnson PJ. Dermatologic tumors (excluding sarcoids). *Vet Clinics Equine* 1998; 14: 625-658.
19. Angelos J, Oppenheim Y, Rebhun W *et al.* Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Animal Genetics* 1988; 18: 417-425.
20. Mohammed HO, Rebhun W, Antczak DF. Factors associated with the risk of developing sarcoid tumors in horses. *Equine Vet J* 1992; 24: 65-168.
21. Reid SW, Gettinby G, Fowler JN *et al.* Epidemiological observations on sarcoides in a population of donkeys (*Equus asinus*). *Vet Record* 1994; 134: 207-211.
22. Thomsett LR. Skin diseases of the horse. *Practice* 1979; 3: 15-26.
23. Torrontegui BO, Reid SWJ. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet Edu* 1994; 6: 85-88.
24. Brostrom H. Equine sarcoides. A clinical and epidemiological study in relation to equine leucocyte antigens (ELA). *Acta Veterinaria Scandinavica* 1995; 36: 223-236.

25. Marais HJ, Bertschinger HJ, Schoeman JP et al. Prevalence and body distribution of sarcoides in South African Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*). *J South African Vet Ass* 2007; 78: 145-148.
26. Finlay M, Yuan ZQ, Burden F et al. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 in flies. *Virus Research* 2009; 144: 315-317.