

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO DOS *EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS* EM
AMOSTRAS DE PLACA AURAL EQUINA**

CRISTIANA RAACH BROMBERGER

**BOTUCATU – SÃO PAULO
JANEIRO DE 2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO DOS *EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS* EM
AMOSTRAS DE PLACA AURAL EQUINA**

CRISTIANA RAACH BROMBERGER

Dissertação apresentada junto ao
programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Assoc. Dr. José
Paes de Oliveira Filho

**BOTUCATU – SÃO PAULO
JANEIRO DE 2023**

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

Bromberger, Cristiana Raach.

Detecção dos *Equus Caballus papillomavirus* em amostras de placa aural equina / Cristiana Raach Bromberger. - Botucatu, 2023

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

Orientador: José Paes de Oliveira Filho
Capes: 50500007

1. Cavalos. 2. Papiloma. 3. Doenças por papilomavirus.
4. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Cavalo; PCR; Papilomatose; Papilomavirus.

Nome do autor: Cristiana Raach Bromberger

Título: DETECÇÃO DOS *EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS* EM
AMOSTRAS DE PLACA AURAL EQUINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes Oliveira Filho
Presidente e Membro Titular
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Membro Titular
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol
Membro Titular
Medicina Veterinária
UFU - Universidade Federal de Uberlândia

Data da defesa: 27 de janeiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Aldino e Iraci Raach, que me ampararam e fizeram todo o possível para garantir minha educação e sem os quais esta conquista não seria possível, são meu exemplo de caráter, fé e perseverança.

À minha mãe, Jane Iraci Rübenich Raach, por todo o amor, por todas as longas conversas ao telefone que ajudaram a diminuir a saudade de casa. Pela confiança, por todos os conselhos que foram essenciais para guiar minhas escolhas e por apoiar as minhas decisões.

À minha irmã, Carolina Raach Bromberger, que compartilhou comigo os melhores momentos desde minha infância, por ser amiga e companheira, a quem tenho um amor incondicional.

À minha sobrinha, Maria Antônia, por trazer alegria em seu sorriso, por ensinar a apreciar cada detalhe do dia a dia, por ser luz em minha vida e mostrar que não existe limites para o amor.

Ao meu orientador, José Paes de Oliveira Filho, pela paciência e dedicação em me auxiliar neste projeto, por compartilhar seus conhecimentos e contribuir para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos Professores, Alexandre Secorun Borges e Danilo Andrade, pelos ensinamentos, por compartilhar suas experiências e por estarem sempre dispostos a me auxiliar da melhor forma possível.

Aos amigos Lukas G. Albertino, João Pedro M. de Oliveira, Natielly Chimenes e Reiner Silveira pela companhia neste período, pelas conversas e risadas, são a prova do quanto a amizade nos fortalece, agradeço sempre por tê-los em minha vida.

À minha grande amiga, Claudia Urban Soares (*in memoriam*), pelo amor e carinho, por comemorar cada conquista minha. Sou eternamente grata por nossa amizade, por aprender contigo a valorizar a vida, por cada sorriso e cada momento que passamos juntas.

Às colegas Pós Graduandas e amigas, Roberta M. Basso e Raissa O. Leite pela amizade, pelos conselhos, pela paciência e por me auxiliarem neste e em outros projetos.

Aos colegas e amigos Fabrício, Monique e Marquinho pela parceria e ajuda neste projeto, principalmente durante a fase de coleta de amostras, por tornarem tudo mais simples e alegre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil), bolsas 21/10987-3 e 22/05142-7, por financiar essa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa 305172/2021-2 e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), Brasil (código financeiro 001), pela concessão da bolsa de estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica do ciclo de vida dos papilomavírus (ADAPTADO Jones, 2021)	8
Figura 2. Orelhas com lesões de placa aural dos tipos: A: “isolada”, B: “múltipla” e C: “coalescente”.	11
Figura 3. Marcação nuclear de cor rosa de células do anexo cutâneo epitelial. Note coloração positiva (rosa magenta) do núcleo das células epiteliais de glândula anexa cutânea. Coloração AEC, 20x.	12

LISTA DE ABREVIACÕES

AEC = 3-amino-9-etilcarbazol
BPV = *Bos taurus papillomavirus*
CCE = Carcinoma de células escamosas
EcPV = *Equus caballus papillomavirus*
HPV = *Human papillomavirus*
IV = Via endovenosa
kb = Quilobases
kg = Quilograma
LCR = Região de códon longo
mg = Miligrama
min. = minutos
ng = Nanograma
nm = Nanômetros
pb = Pares de bases
PCR = Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR = PCR quantitativo em tempo real
seg. = segundos
VLPs = Virus-likeparticles
μL = Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO I

1. Introdução.....	4
2. Revisão de literatura.....	5
2.1. Os papilomavírus	5
2.2. Organização genômica	6
2.3. Ciclo de vida	7
2.4. Papilomavírus na espécie equina	8
2.5. Papilomatose em equinos.....	9
2.6. Placa Aural.....	10
3. Referências.....	14

CAPÍTULO II

Trabalho científico	20
----------------------------------	-----------

CAPÍTULO III

1. Conclusão Geral.....	34
ANEXOS	35

BROMBERGER, C.R. **DETECÇÃO DOS *EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS* EM AMOSTRAS DE PLACA AURAL EQUINA.** Botucatu, 2023. 44p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A placa aural é uma doença cosmopolita, caracterizada por lesões nodulares na pele que raramente regridem espontaneamente. Foram descritos nove *Equus caballus papillomavirus* (EcPVs), desses, apenas os EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 foram associados à placa aural no Brasil, ocorrendo de forma isolada ou em coinfecção. Os EcPVs 8 e 9 foram os últimos papilomavírus equinos identificados, por isso há poucas descrições sobre suas características de manifestação clínica e sua associação à placa aural não foi avaliada. O objetivo desse estudo foi verificar a presença do DNA dos EcPV 8 e 9, por PCR, em amostras de placa aural de equinos de diferentes regiões do Brasil. No total, 137 amostras foram utilizadas, das quais 108 foram previamente avaliadas quanto a presença do DNA dos EcPVs 1 – 7 (Mira et al., 2018). As demais amostras, foram coletadas para este estudo (n = 29), e avaliadas quanto a presença dos EcPVs 1 - 9. Foram utilizados primers previamente descritos para as PCRs dos EcPVs 1 – 8, enquanto para o EcPV 9, foram sintetizados primers específicos. Para os EcPVs não detectados em nossas amostras, foram sintetizados mini-genes e utilizados como controle positivo nas reações de PCR. À histopatologia, hiperqueratose, hipomelanose e hiperplasia epidérmica foram os principais achados. O DNA dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 não foi detectado nas amostras avaliadas. Das amostras testadas para os EcPVs 1 – 9, foram identificados os EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6, presentes de forma isolada ou em coinfecção, o EcPV 6 foi o tipo viral mais prevalente nas amostras. Não foi observada relação entre o tipo viral detectado e as características clínicas das lesões. Concluimos que os EcPVs 2, 7, 8 e 9 não tiveram associação com lesões de placa aural analisadas e, podem não estar relacionados à etiologia desta enfermidade no Brasil. A utilização de mini-genes foi fundamental para validar as técnicas de PCR e a sensibilidade dos primers utilizados.

Palavras-chave: Cavalo, EcPV, papilomatose, PCR.

BROMBERGER, C.R. **DETECTION OF *EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS* IN EQUINE AURAL PLAQUES SAMPLES.** Botucatu, 2023. 44p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Aural plaque is a cosmopolitan disease, characterized by nodular lesions on the skin that rarely regress spontaneously. Nine *Equus Caballus papillomavirus* (ECPVs), have been described, of these, only the EcPVs 1, 3, 4, 5 and 6 were associated with aural plaques in Brazil, occurring in isolation or in coinfection. The EcPVs 8 and 9 were the last papillomavirus identified, so there are few descriptions about clinical manifestation features and association with aural plaques were not evaluated. The aim of this study was to verify the DNA presence of EcPVs 8 and 9 by PCR in aural plaques samples of horses from different regions of Brazil. A total of 137 samples were used, of these samples, 108 were previously evaluated for the presence of EcPVs 1 – 7 (Mira et al., 2018). The other samples collected for this study (n = 29), and evaluated for the presence of EcPVs 1 – 9. Primers previously described were used for PCR of EcPVs 1 – 8, while for the EcPV 9, specific primers were synthesized. For the EcPVs not detected in our samples, mini-genes were used as a positive control in the PCR reactions. hyperkeratosis, hypomelanosis and epidemic hyperplasia were the main histopathological findings. The DNA of the EcPVs 2, 7, 8 e 9 was not identified in the analyzed samples. Of the samples tested for the EcPVs 1 – 9, the EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 were identified, in isolated form or in coinfection, the EcPV 6 was the most prevalent viral type in the samples. No relationship was observed between the viral type detected and the clinical lesions features. In conclusion, the EcPVs 2, 7, 8 e 9 was no association with the aural plaque samples analyzed and, therefore, are not associated with the etiology of this disease in Brazil. The use of mini-genes was essential to validate the PCR reactions and the primers sensitivity used in this work.

Keywords: Papillomavirus, horse, papillomatosis, PCR.

CAPÍTULO I

1. Introdução

A papilomatose é uma neoplasia benigna comum em equinos, causada pelo *Equus caballus* papillomavirus (EcPV), um vírus DNA de fita dupla, não envelopado, da família *Papillomaviridae*, que infecta as células basais da epiderme (Alfieri et al., 2007; Sousa et al., 2008). A placa aural é uma das manifestações da papilomatose nos equinos, caracterizada por lesões nodulares na pele que, embora sejam de baixa malignidade, podem causar sensibilidade e desconforto nos animais e levar a perda do valor comercial dos equinos acometidos (Sousa et al., 2008; Mira et al., 2016).

Não há predisposição por raça, sexo ou idade. As lesões acometem a superfície interna do pavilhão auricular, são placas hiperqueratóticas, elevadas e bem demarcadas, despigmentadas, isoladas ou múltiplas podendo coalescer (Scott & Muller, 2011; Torres & Koch, 2013). As placas aurais não regredem espontaneamente, o tratamento consiste na aplicação de Imiquimode (imidazoquinolina sintética a 5%), que atua como estimulante imunológico com efeitos antivirais (Mira et al., 2018).

Nove EcPVs já foram descritos, mas apenas os EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 foram amplificados das lesões de placa aural, ocorrendo de forma isolada ou em coinfecção (Mira et al., 2018; Li et al., 2019). A identificação do papilomavírus pode ser realizada por exames histopatológicos, imunoistoquímica, microscopia eletrônica, reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Fairley & Haines, 1992; Gorino et al., 2013; Zakia et al., 2015).

2. Revisão de literatura

2.1. Os papilomavírus

Os papilomavírus pertencem a família *Papillomaviridae*, apresentam DNA circular de fita dupla, não envelopados, com capsídeo icosaédrico (Taniwaki et al., 2013). Possuem cerca de 52 a 55 nanômetros (nm) de diâmetro, e genoma de aproximadamente 8 quilobases (kb) de comprimento (De Villiers et al., 2004; Torres & Koch, 2013; De Araldi et al., 2017). Possuem resistência às condições ambientais podendo sobreviver vários dias em temperaturas de 4 a 8°C, e até seis horas a 37°C, são sensíveis a temperaturas elevadas, detergentes e ao formaldeído (Torres & Koch, 2013).

Identificados em diversas espécies, os papilomavírus podem infectar animais domésticos e selvagens, seres humanos e aves (Alfieri et al., 2007; Taniwaki et al., 2013). São epiteliotróficos, com características específicas para o tipo tecidual infectado (Jones, 2021), e altamente espécie-específicos, com exceção do Papilomavírus Bovino (BPV), genótipos BPV1, BPV2 e BPV13, os quais são frequentemente identificados em lesões de sarcóide em equinos, sugerindo uma associação etiológica no desenvolvimento desta neoplasia em cavalos (Torres & Koch, 2013; Yamashita-Kawanishi et al., 2020; Jones, 2021).

Caracterizados por seu potencial oncogênico, os papilomavírus infectam células basais do epitélio e de mucosa, induzindo neoplasmas epiteliais proliferativos, comumente denominados papilomas ou verrugas (Alfieri et al., 2007; Scott & Muller, 2011; Peters-Kennedy et al., 2020). Após a infecção, o vírus pode ficar latente nos queratinócitos basais, tornando o indivíduo infectado assintomático, até sua replicação e manifestação clínica (Scott & Muller, 2011).

As lesões tumorais são benignas e podem persistir sem proliferar ou regredir espontaneamente, no entanto, eventualmente, podem evoluir para tumores malignos, ocasionando alterações morfológicas e funcionais nas células (Alfieri et al., 2007; Scott & Muller, 2011; Jones, 2021).

2.2. Organização genômica

O genoma viral é dividido em três regiões: a região de genes iniciais (E), região de genes tardios (L) e a região de códon longo (LCR). A região de genes iniciais (E), é expressa desde a camada basal até a superfície do tecido, codifica proteínas que atuam na replicação viral (E1, E2 e E4) e oncoproteínas (E5, E6 e E7). As proteínas E1 e E2 atuam na replicação do material genético viral, enquanto a proteína E4 está associada também à maturação viral e remodelação da matriz extracelular (Araldi et al., 2017; Kaynarcalidan & Oguzoglu, 2020).

As oncoproteínas atuam em diversas vias tumorigênicas, são essenciais para persistência do vírus nas células infectadas (Araldi et al., 2017). As principais oncoproteínas identificadas nos Papilomavírus são as E6 e E7 (Kaynarcalidan & Oguzoglu, 2020). A E6 induz alterações na transformação celular, capaz de inibir as vias de reparo celular, além de promover alterações citogenéticas e perda do contato intercelular. Já a E7 promove quebras no DNA da célula infectada levando a instabilidade genômica e desregulação do ciclo celular (Alfieri et al., 2007; Araldi et al., 2017; Kaynarcalidan & Oguzoglu, 2020).

Estudos identificaram a oncoproteína E5 em Papilomavírus Humano (HPV), do gênero *Alphapapillomavirus* (Araldi et al., 2017). Embora seus mecanismos oncogênicos não estejam completamente elucidados, sabe-se que essa proteína atua em diversas vias tumorigênicas, auxiliando na expressão e nas funções de E6 e E7 e contribuindo para a progressão tumoral (Alfieri et al., 2007; Araldi et al., 2017).

A região de genes tardios (L), inserido nas camadas mais superficiais do epitélio (granular e cornificada), expressa proteínas estruturais (L1 e L2). A proteína L1 compõe 80% do capsídeo viral (Alfieri et al., 2007), sendo a proteína mais conservada do genoma viral (De Villiers et al., 2004; Alfieri et al., 2007; Araldi et al., 2017), por isso é utilizada para identificar novos genótipos dos papilomavírus. Desta forma, diferenças superiores a 10% de homologia com a sequência de L1 definem um novo tipo de vírus, enquanto diferenças entre 2-10%, determinam um novo subtipo viral (Alfieri et al., 2007; Araldi et al., 2017). Como proteína secundária do capsídeo, a L2 possui capacidade de induzir anticorpos neutralizantes que contribuem para a penetração do vírus na célula infectada (Alfieri et al., 2007).

A região de códon longo (LCR) não codifica proteínas, mas possui elementos que atuam na regulação da replicação viral (De Villiers et al., 2004; Torres & Koch, 2013; Araldi et al., 2017).

2.3. Ciclo de vida

Na célula infectada o genoma viral pode ser encontrado em duas diferentes formas: a episomal, presente em lesões iniciais, em formato circular e em múltiplas cópias e a forma integrada, localizado apenas em células transformadas, neste caso o genoma viral está integrado ao cromossomo da célula infectada, contendo uma cópia por célula (De Villiers et al., 2004; Alfieri et al., 2007).

O vírus infecta inicialmente os queratinócitos basais, a partir de micro lesões na pele, onde há perda da barreira cutânea (Torres & Koch, 2013), em seguida, por endocitose, penetra nas células das camadas basal e suprabasal, onde ocorre a expressão dos genes iniciais (E). Após a penetração, o vírus perde seu capsídeo e insere seu DNA no núcleo celular, onde inicia a replicação viral. Este processo ocorre na região de diferenciação das camadas espinhosa e granular, onde além dos genes iniciais são expressas oncoproteínas, sendo possível observar histologicamente alterações citopáticas e a presença de inclusões virais (Alfieri et al., 2007; Torres & Koch, 2013).

Os genes estruturais (L1 e L2), são então expressos e o DNA transferido para as células da camada escamosa, a partir das quais os novos vírus são liberados via descamação celular normal do epitélio (Alfieri et al., 2007; Jones, 2021) (Figura 1). O resultado da infecção depende de diversos fatores que incluem o status imune do animal, fatores genéticos e condições ambientais que influenciam diretamente no período de latência do vírus e na gravidade das lesões (Alfieri et al., 2007; Torres & Koch, 2013).

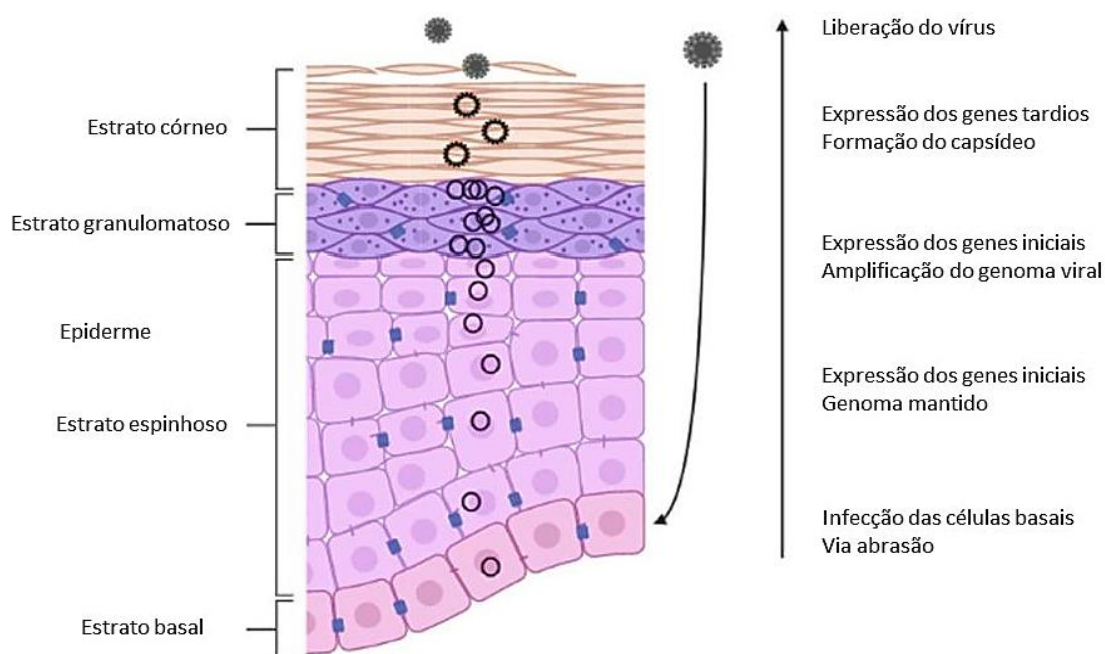


FIGURA 1. Representação gráfica do ciclo de vida dos papilomavírus (ADAPTADO Jones, 2021).

2.4. Papilomavírus na espécie equina

A papilomatose equina, causada pelo *Equus caballus papillomavirus* (EcPV), é uma neoplasia benigna comum nesta espécie (Sousa et al., 2008). Não há predileção por raça ou sexo, no entanto, animais jovens podem ser mais acometidos por alguns EcPVs (Torres & Koch, 2013). Existem nove EcPVs descritos (Peters-Kennedy et al., 2019; Li et al., 2019), responsáveis por diferentes manifestações clínicas que podem ocorrer na forma de papilomatose clássica, genital, generalizada ou placa aural, que variam de acordo com o tipo viral envolvido, isso explica suas distintas formas de apresentação, distribuição das lesões e evolução clínica (Torres & Koch, 2013; Linder et al., 2018).

O primeiro EcPV foi caracterizado em 1986, por O'Banion e colaboradores, denominado como *Equus caballus papillomavirus* tipo 1 (EcPV 1). Entretanto, a sequência completa do DNA genômico do primeiro EcPV foi identificada anos depois por Ghim et al. (2004), em um papiloma cutâneo localizado na região do focinho. Posteriormente, Lange et al. (2011), detectou os EcPVs 2 e 3, em lesões de papilomas genitais e em placas aurais,

respectivamente. Em 2013, Taniwaki et al. (2013), identificaram o EcPV 4 em amostras de placas aurais. Neste mesmo período Lange e colaboradores (2013), detectaram os EcPVs 4, 5, 6 e 7, em placas genitais (EcPV 4), placas aurais (EcPV 5 e 6) e em neoplasias penianas (EcPV 7). O EcPV 8 foi identificado por Linder et al. (2018), associado a uma nova forma de manifestação clínica, denominada papilomatose generalizada e em seguida o EcPV 9 foi observado por Li et al. (2019), presente no sêmen de um equino com papilomatose genital e por De Paolis e colaboradores (2022), em swabs genitais coletados de equinos assintomáticos, sugerindo sua predisposição a infecções genitais.

Estudos prévios descrevem uma associação entre EcPV 2 com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, no entanto seu papel na etiologia dessa doença não está totalmente esclarecido (Hibi et al., 2019; Alloway et al., 2020; Greenwood et al., 2020). Os EcPVs 4 e 8 também já foram identificados em lesões de carcinoma de células escamosas, supondo que possam estar associados ao desenvolvimento dessa neoplasia (Peters-Kennedy et al., 2019; Peters-Kennedy et al., 2020).

O uso de vacinas imunoterapêuticas utilizando vírus inativado em formalina (Onen, 2020) ou subunidades virais, a partir da proteína L1 (Schellenbacher et al., 2015), tem sido descrito com bons resultados no tratamento de lesões causadas pelos EcPVs 1 e 2 em equinos. Estes autores propõem o uso das vacinas como importante ferramenta para prevenção e tratamento das papilomatoses nesta espécie.

2.5. Papilomatose em equinos

Os equinos podem apresentar papilomatose do tipo clássica, genital, generalizada ou placa aural (Scott & Miller, 2011). A papilomatose clássica está associada ao EcPV 1, acomete principalmente equinos jovens. As lesões ocorrem principalmente em focinho e lábios, podendo acometer pálpebras e órgãos genitais. Inicialmente as verrugas apresentam-se como pequenas pápulas que tendem a regredir espontaneamente, podendo persistir em animais imunocomprometidos (Scott & Muller, 2011; Torres & Koch, 2013; Dong et al., 2017).

A papilomatose genital está relacionada a infecções pelos EcPVs 2, 7 e 9 (Lange et al. 2013; Li et al., 2019; De Paolis et al., 2022). As lesões podem afetar a mucosa e a pele da genitália externa de equinos adultos, raramente regredem espontaneamente e podem evoluir para carcinoma de células escamosas (Scott & Muller, 2011; Lange et al., 2013; Hibi et al., 2019).

A papilomatose generalizada é uma nova manifestação clínica descrita por Linder et al. (2018), causada pelo EcPV 8. As lesões podem acometer as regiões da axila, inguinal, membros, região cervical, tórax e abdômen, além da face e as orelhas. Esta papilomatose ocorre de forma grave e persistente, com tendência a coalescer podendo evoluir para carcinoma de células escamosas (Linder et al., 2018; Peters-Kennedy et al., 2019).

2.6. Placa Aural

A associação da placa aural ao papilomavírus foi inicialmente descrita por Fairley & Haines (1992), os quais detectaram o vírus utilizando imunoistoquímica e microscopia eletrônica. Anos depois os EcPVs 3, 4 5 e 6 foram identificados em amostras de placas aurais utilizando técnicas de PCR (Lange et al., 2011; Lange et al., 2013; Taniwaki et al., 2013).

No Brasil, os primeiros estudos relacionados a placa aural foram realizados por Sousa e colaboradores (2008), que avaliaram a presença destas lesões em equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha no estado de São Paulo, encontrando prevalência de 57% e 35% dos animais, respectivamente. Ainda no estado de São Paulo, Gorino et al. (2013) identificaram o DNA dos EcPVs 3 e 4 em 62% amostras de placa aural (n = 45). Neste estudo o EcPV 3 e 4 foram detectados isoladamente em 9% e 38% das amostras, respectivamente, e a presença de coinfeção foi identificada em 15% das amostras.

A frequência e os aspectos epidemiológicos da placa aural no Brasil foram estudados por Mira et al. (2016), que encontraram lesões de placa aural em cerca de 15% dos 891 equinos avaliados, sendo que em 85% das propriedades avaliadas existiam pelo menos um animal acometido com a doença. Esses autores determinaram que o tipo de manejo semi-intensivo e a realização de tosquia das orelhas foram fatores importantes associados esta enfermidade.

Em 2018, Mira e colaboradores analisaram a distribuição dos EcPVs no país. A presença do vírus foi avaliada em 108 amostras de placa aurais provenientes de equinos de diferentes regiões brasileiras. O DNA de pelo menos um tipo viral foi amplificado em 97% das amostras, sendo identificados os EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6, ocorrendo de forma isolada ou em coinfeção. Os autores não observaram relação entre o EcPV identificado com as características das lesões, e os tipos virais foram bastante variáveis de acordo com as regiões analisadas.

As placas aurais são lesões planas hiperqueratóticas, despigmentadas de coloração esbranquiçada ou acinzentada, possuem formato circunscrito e seu tamanho pode variar de 1 – 3 centímetros de diâmetro (Sousa et al., 2008). Podem ocorrer de forma isolada, como pequenas pápulas, ou múltiplas, tendendo a coalescer (Mira et al., 2018) (Figura 2). Raramente regredem espontaneamente e embora tenham característica progressiva há apenas um relato de sua evolução para CCE, o caso ocorreu em um equino com lesões que placa aurais no pavilhão auricular onde foi detectado o EcPV 4, no entanto, o mecanismo que esse EcPV desempenha no desenvolvimento do CCE não foi estabelecido (Peters-Kennedy et al., 2020).

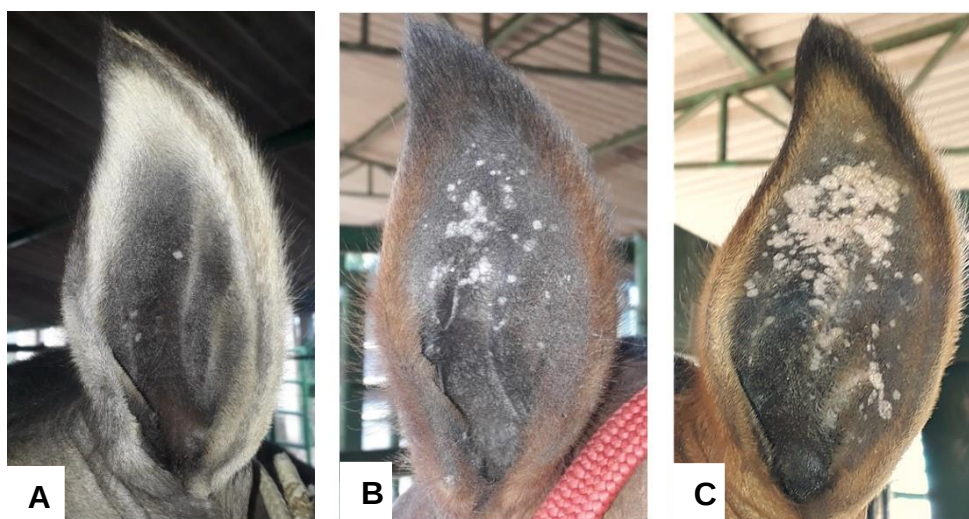


FIGURA 2. Orelhas com lesões de placa aurais dos tipos: A: “isolada”, B: “múltipla” e C: “coalescente”. (Fonte: Arquivo pessoal).

As lesões acometem uma ou ambas as superfícies internas dos pavilhões auriculares (Sousa et al., 2008), raramente podem ser observadas nas regiões

da virilha, coxa e ânus (Scott & Miller, 2011). Não há predisposição racial ou sexual e pode afetar equinos de todas as idades (Sousa et al., 2008; Scott & Miller, 2011).

Equinos com placa aural podem apresentar desconforto e hipersensibilidade na região das orelhas (Sousa et al., 2008; Scott & Miller, 2011; Zakia et al., 2016), além de ser esteticamente desfavorável e levar a perda do valor comercial dos equinos acometidos (Sousa et al., 2008).

A forma de transmissão das placas aurais não é conhecida, embora suspeita-se que simuliídeos (*Simulium* spp.) possam estar envolvidos em sua patogênese, por provocarem lesões cutâneas pela picada, atuando como vetores mecânicos do vírus (Sousa et al., 2008). Além disso, Peters-Kennedy et al. (2020) sugerem que traumas cutâneos e fômites contaminados possam facilitar o desenvolvimento das placas aurais.

A identificação dos EcPVs pode ser realizada por imunoistoquímica e microscopia eletrônica, que permitem identificar células com inclusões virais basofílicas intranucleares nas camadas espinhosa e granular, além de células paraqueratóticas da camada córnea (Fairley & Haines, 1992; Postey et al., 2007). Duas amostras de placa aural coletas neste estudo foram submetidas a imunohistoquímica utilizando o Clone K1H8 Monoclonal Mouse Anti-Human Papillomavirus (HPV) (Dako, Carpinteria, CA, USA), na diluição 1:50 (Peters-Kennedy et al., 2019). As amostras foram positivas para o antígeno utilizado permitindo a observação das partículas virais intranucleares (Figura 2) (dados não publicados).

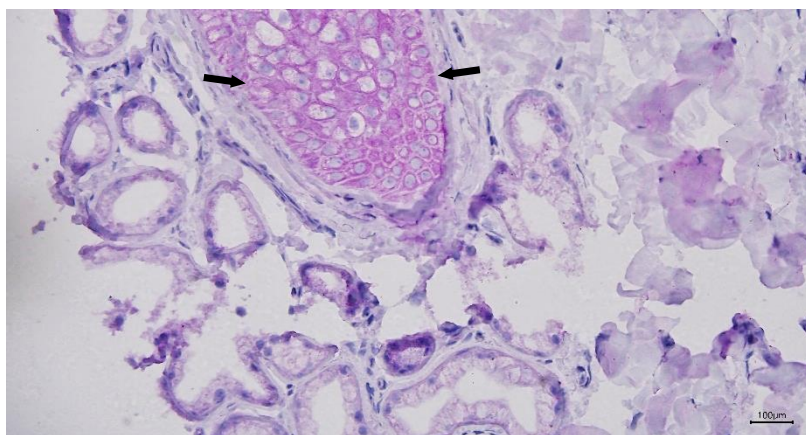


FIGURA 2. Marcação nuclear de cor rosa de células do anexo cutâneo epitelial. Note coloração positiva (rosa magenta) do núcleo das células epiteliais de glândula anexa cutânea. Coloração AEC, 20x.

A detecção do DNA viral pode ser realizada por PCR em amostras de placa aural frescas (Gorino et al., 2013; Lange et al., 2013; Taniwaki et al., 2013), ou fixadas em blocos de parafina (Zakia et al., 2015), e utilizando a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Zakia et al., 2019). À histopatologia, pode-se observar hiperplasia epidérmica, hipomelanose, ortoqueratose e paraqueratose, além de mitose de células basais no estrato espinhoso (Sousa et al., 2008; Torres & Koch, 2013).

Em razão da ausência de remissão espontânea das placas aurais, Zakia et al. (2016), avaliou os efeitos do Imiquimode® e obteve bons resultados no tratamento da placa aural. Este fármaco é destinado ao tratamento da papilomatose genital humana (Torres et al., 2010), atuando como um modulador da resposta imune com potente ação antiviral (Saunders, 2000). Embora possa ser considerado como fármaco de escolha para tratar placa aural equina (Torres et al., 2010; Zakia et al., 2016), seus efeitos colaterais devem ser avaliados antes de seu uso o que torna o tratamento das placas aurais um desafio para os médicos veterinários de equinos.

3. Referências

Alfieri A., Wosiacki S.R., Alfieri A.F. *Papillomaviridae*. In: Flôres, E.F. *Virologia Veterinária*. 1ed. Santa Maria: Ed. UFSM, v.1, p. 397-412, 2007.

Alloway E., Linder K., May S., Rose T., Delay J., Bender S., Tucker A., Luff J. **Subset of Equine Gastric Squamous Cell Carcinomas Is Associated With *Equus Caballus Papillomavirus*–2 Infection**. *Veterinary Pathology*. v.57, n.3, p.427-431, 2020. <https://doi.org/10.1177/0300985820908797>

Araldi R.P., Assaf S.M.R., Carvalho R.F., Carvalho M.A.C.R., Sousa J.M., Magnelli R.F., Módolo D.G., Roperto F.P., Stocco R.C., Beçak W. **Papillomaviruses: a systematic review**. *Genetics and Molecular Biology*. v.40, n.1, p.1-21, 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0128>

De Paolis L., de Ciucis, C.G., Peletto, S., Cappelli, K., Mecocci, S., Nervo, T., et al. ***Equus caballus* Papillomavirus Type-9 (EcPV9): First Detection in Asymptomatic Italian Horses**. *Viruses*, v.14, 2022 <https://doi.org/10.3390/v14092050>

De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., Zur H.H. **Classification of papillomaviruses**. *Virology*. v.324, p.17-27, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>

Dong J., Zhu W., Yamashita N., Chamberg J.K., Uchida K., Kuwano A., Haga T. **Isolation of equine papillomavirus type 1 from racing horse in Japan**. *J. Vet. Med. Sci*. v.72, n.12, p.1957-1959, 2017. <https://dx.doi.org/10.1292%2Fjvms.17-0322>

Fairley, R.A. & Haines, D.M. **The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques**. *Vet. Pathol.* v.29, p.79-81, 1992. <https://doi.org/10.1177%2F030098589202900110>

Ghim, S.J.; Rector, A.; Delius, H.; Sundberg, J.P.; Jenson, A.B.; Van Ranst, M. **Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV1 L1 major capsid protein.** Bioch. Biophys. Res. Commun. v.324, p.1108-1115, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.154>

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.014>

Greenwood, S.; Chow-Lockerbie, B.; Epp, T.; Knight, C.; Wachoski-Dark, G.; MacDonald-Dickinson, V.; Wobeser, B. **Prevalence and Prognostic Impact of Equus caballus Papillomavirus Type 2 Infection in Equine Squamous Cell Carcinomas in Western Canadian Horses.** Vet Pathol. v.57, p.623-631, 2020. <https://doi.org/10.1177%2F0300985820941266>

Hibi, H.; Hatama, S.; Obata, A.; Shibahara, T.; Kadota, K. **Laryngeal squamous cell carcinoma and papilloma associated with Equus caballus papillomavirus 2 in a horse.** J. Vet. Med. Sci. v.81, p.1029–1033, 2019. <https://dx.doi.org/10.1292%2Fjvms.18-0461>

Kaynarcalidan, O.; Oguzoglu, T.C. **The oncogenic pathways of papillomaviruses.** Vet Comp Oncol.v.19, p.7-16, 2021. <https://doi.org/10.1111/vco.12659>

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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.019>

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.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.052092-0>

Li, C; Chang, W.; Mitsakos, K.; Rodger, J.; Holmes, E.C.; Hudson, B.J.
Identification of a novel equine papillomavirus in semen from a thoroughbred stallion with a penile lesion. Viruses. v.11, p.713, 2019.
<https://dx.doi.org/10.3390%2Fv11080713>

Linder K.E., Bizikova P., Luff J., Zhou D., Yuan H., Breuhaus B., Nelson E., Mackay R.
Generalized papillomatosis in three horses associated with a novel equine papillomavirus (EcPV8). Veterinary Dermatology. v.29, p.72-e30, 2018.
<https://doi.org/10.1111/vde.12481>

Mira J., Herman M., Zakia L.S., Olivo G., Araújo Jr. J.P., Borges A.S., Oliveira-Filho J.P.
Frequency of *Equus caballus* papillomavirus in equine aural plaques. J. Vet. Diag. Invest. v.30, n.4, p.565-568, 2018.
<https://dx.doi.org/10.1177%2F1040638717753495>

Mira J., Herman M., Zakia L.S., Olivo G., Araújo Jr. J.P., Borges A.S., Oliveira-Filho J.P.
Factors associated with equine aural plaque in Brazil. Vet Dermatol. v.27, p.408–e104, 2016.
<https://doi.org/10.1111/vde.12360>

O'Banion M.K., Reichmann M.E., Sundberg J.P.
Coning and characterization of na equine cutaneous papillomavirus. Virology. v. 152, n.1, p.100-109, 1986.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90375-2)

Oliveira-Filho, J.P., Bandial, 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. Vet. Immunol. Immunopathol. v.135, p.34-42, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.027>

Onen E.A., **Molecular typing of equine papillomavirus and autovaccination to treat horses with cutaneous papillomatosis.** Australian Veterinary Journal. v.8, n.8, p. 405-410, 2020. <https://doi.org/10.1111/avj.12954>

Peters-Kennedy J., Lange C.E. & Ortved K. **Progression of aural plaques to squamous cell carcinoma in a horse.** Vet. Dermatol. v.31, p.397–e106, 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/vde.12870>

Peters-Kennedy J., Lange C.E., Rine S.L., Hackett R.P. ***Equus caballus* papillomavirus 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse.** Eq. Vet. J. V. v.51, p.470–474, 2019. <https://doi.org/10.1111/evj.13046>

Postey, R.C., Appleyard, G.D, Kidney, B.A. **Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sarcoids for the presence of equine papillomavirus DNA and papillomavirus antigen.** Can J Vet Res. v.71, p.28-33, 2007.

Saunders, D.N. **Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod.** J. Am. Acad. Dermatol. v.43, p6-11, 2000. <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.107808>

Schellenbacher C., Shafti-Keramat S., Huber B., Fink D., Brandt S., Kirnbauer R. **Establishment of an in vitro equine papillomavirus type 2(EcPV2) neutralization assay and a VLP-based vaccine for protection of equids against EcPV2-associated genital tumors.** Virology. v.486, p. 284-290, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.016>

Scott, D.W. & Miller, W.H. Neoplasms, Cysts, Hamartomas, and Keratoses. In: Equine Dermatology. Maryland Heights, Missouri: 2° ed. Saunders. p.468-473. 2011.

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 Mangalarga e Quarto de Milha.** Pesquisa Veterinária

Brasileira. v. 28, n. 6, p. 279-284, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000600004>

Taniwaki S.A., Magro A.J., Gorino A.C., Oliveira-Filho J.P., Fontes M.R., 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.025>

Torres S.M.F. & Koch S.N. **Papillomavirus-Associated Diseases.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. v.29, p.643–655, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2013.08.003>

Torres S.M.F., Malone E.D., White S.D., Koch S.N., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00877.x>

Zakia L.S., Basso R.M., Olivo G., Herman M., Araujo Jr. J.P., Borges A.S., Oliveira-Filho J.P. **Detection of papillomavirus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded equine aural plaque samples.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.67, n.4, p.1193-1196, 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8077>

Zakia L.S., Olivo G., Basso R.M., Mira J., Herman M., Araujo Jr. J.P., Borges A.S., Oliveira-Filho J.P. **Imiquimod treatment for *Equus caballus* papillomavirus infection in equine aural plaques.** Veterinary Dermatology. v.27, p.175–e44, 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12305>

Zakia L.S., Herman M., Basso R.M., Hernandez J.M., Araujo Jr. J.P., Borges A.S., Oliveira-Filho J.P. **Equine papillomavirus detection in aural plaques by qPCR.** Braz. J. Vet. Pathol. v.12, n.1, p. 1-4, 2019. <http://dx.doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4>

CAPÍTULO II

Trabalho científico

O trabalho a seguir foi redigido de acordo com as normas da revista (<<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-equine-veterinary-science>>).

Original Research:

Detection of *Equus caballus papillomavirus* in equine aural plaque samples

ABSTRACT:

Aural plaques have been linked to *Equus caballus* papillomavirus (EcPV). Nine types of EcPVs have already been described; however, only EcPVs 1, 3, 4, 5 and 6 have been observed in association with aural plaques. Accordingly, the objective of this study was to evaluate the presence of the EcPVs (1 – 9) in equine aural plaque samples. A total of 29 aural plaque samples were collected and assessed for the presence of these EcPVs by PCR. Additionally, 108 aural plaque samples used in previous research were evaluated for the presence of EcPVs 8 and 9. Previously described primers were used for PCR to detect EcPVs 1–8, and specific primers were designed for EcPV 9. Minigenes were synthesized and used as a positive control in the PCRs for the undetected EcPVs. EcPVs 2, 7, 8 and 9 were not detected in any of the evaluated samples, suggesting that these viral types are not involved in the etiology of equine aural plaque in Brazil. EcPV 6 was the most prevalent (81%), followed by EcPVs 3 (72%), 4 (63%) and 5 (47%), reinforcing the idea that these viruses play an important role in the etiology of equine aural plaque in Brazil.

Keywords: dermatopathy, horse, PCR, virus.

1. Introduction

Papillomatosis is a benign cutaneous neoplasm common in horses [1] that is associated with *Equus caballus papillomavirus* (EcPV), *Papillomaviridae*, an enveloped double-stranded DNA virus with an approximately 8-kb genome [2]. Nine types of EcPVs have already been described, each associated with different

clinical manifestations, including classic viral papillomatosis, genital papillomatosis, aural plaque or generalized forms [2,3].

The aural plaque affects the inner face of the pinna, unilaterally or bilaterally, but may also occur in other regions [4,5]. The lesions are circumscribed and depigmented hyperkeratotic plaques, occurring in isolation, as multiple lesions or as coalesced lesions [4]. Although aural plaque is a benign neoplasm, the plaques rarely regress spontaneously, causing discomfort to the animals and reducing the commercial value of affected horses due to the aesthetic aspect [1].

Histopathology shows epidermal hyperplasia, hyperkeratosis, areas of hypomelanosis and mitosis of basal cells of the epithelium [5]. EcPVs may be detected by immunohistochemistry, electron microscopy, PCR and qPCR [6-11]. Previous studies identified EcPVs 1, 3, 4, 5 and 6 in aural plaque samples, while EcPVs 2 and 7 were not associated with these lesions [9,12-14]. EcPVs 8 and 9 were associated with generalized and genital papillomatosis, respectively [15-18]; however, there are still no studies verifying the contribution of these viruses to the etiology of equine aural plaque. Therefore, the objective of this study was to evaluate the presence of EcPVs in aural plaque samples from horses in Brazil and to verify their contribution to some lesion patterns.

2. Materials and Methods

This study was approved on December 16, 2020, by the Institutional Animal Care and Use Committee (0193/2020 - CEUA—UNESP).

2.1. Included Horses and Sample Collection

In order to assess the presence of viral DNA from EcPVs 1–9, we selected 15 horses that showed aural plaque lesions, regardless of breed, sex or age. The lesions were evaluated according to the number and distribution in the pinna [4]. A total of 29 aural plaques were collected from the internal pinnae of the horses using a 6 mm disposable punch, without prior cleaning of the pinna. Prior to the biopsy procedures, the horses were sedated with 0.01 mg/kg detomidine. Then, the samples for PCR were stored at -80 °C, and the samples for histopathological

evaluation were fixed in 10% neutral buffered formalin until processing. Three aural plaque samples located outside the ear of one of these horses were also collected.

Additionally, 108 aural plaque samples (108 horses) that were previously collected and evaluated for the presence of DNA from EcPVs 1–7 in a study by our group [14] were included in this study and evaluated for the presence of EcPVs 8 and 9 by PCR.

2.2. Histopathology

The formalin-fixed aural plaque samples were routinely processed, embedded in paraffin wax, stained with hematoxylin and eosin and analyzed by optical microscopy according to a previous description [19].

2.3. Polymerase Chain Reaction

The DNA was purified from 32 aural plaque samples with a GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma–Aldrich®, St. Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. The 108 previously purified DNA samples [14], were stored at -80 °C. The DNA purity and concentration were determined by spectrophotometry (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE), with purity assessment based on an A260/280 ratio of 1.8.

PCR was performed using specific primers that have been previously described (EcPVs 1–8) [10,14,17] or were designed for this study (EcPV 9) (Table 1). The specificity of the all-PCR primers was evaluated in silico with the Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information, USA). EcPV 1–7 PCRs were performed as previously described [14]. EcPV 8 and 9 PCR mixtures (25 µL) contained 2.5 µL of template DNA, 0.3 µM each primer, 12.5 µL of PCR Master Mix (Promega, CA, USA), and 8.8 µL of nuclease-free water. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at X °C (according to each EcPV, Table 1) for 60 s and extension at 72 °C for 60 s, with a final extension at 72 °C for 4 min. To verify the presence of cellular DNA, PCR using equine β -actin gene primers was also performed for all samples [20].

The positive PCR products, regardless of which EcPV, were purified and subjected to Sanger sequencing. The obtained sequences and electropherograms were examined using Geneious® software (Biomatters©, Auckland, New Zealand), and the sequences were compared with the sequences of each EcPV deposited in GenBank™ (Table 1).

Additionally, synthetic mini-genes were made from sequences of EcPVs deposited in GenBank™ (Table 1) and used as PCR positive controls for undetected EcPVs (EcPVs 2, 7, 8 and 9). These sequences were inserted into plasmid DNA, diluted in 100 µL of nuclease-free water (final concentration of 50 ng/µL) and used as templates in the PCR. After amplification, the positive PCR products were purified, sequenced and analyzed as previously described. The analytical sensitivity of each mini-gene PCR was determined using 10-fold dilutions (from undiluted to 10⁻⁹).

2.4. Data Analysis

The chi-squared test and Fisher's exact test (PROC MEANS, SAS v.9.4, SAS Institute, Cary, NC) were performed to determine the frequency distribution of the viral types and the associations linking the type of EcPV detected and the presence of coinfection to the type and distribution of the lesion. Descriptive statistics were applied to determine the frequency of viral detection in the internal pinna unilaterally or bilaterally.

3. Results

Of the 15 horses sampled, aural plaques were present in both ears of 14 horses (n = 28), and three samples were collected from the periocular (n = 2) and preputial (n = 1) regions from a horse, resulting in a total of 32 samples. The aural plaques affected three or more quadrants in 86% (25 of 29) of the ears' internal pinna, and ears with coalescing aural plaque lesions were more frequent (76%, 22 of 29), followed by 14% (4 of 29) of the ears with one to five punctate lesions and by 10% (3 of 29) of the ears with more than five lesions [4]. The aural plaques found in the periocular and preputial regions were punctate lesions.

According to the histology results, the aural plaque samples, including the periocular and preputial samples, were primarily characterized by moderate-to-intense hyperplasia of dermal cells, cellular hyperkeratosis, hypomelanosis and orthokeratosis. The presence of mononuclear cell inflammation, hyperplasia of the sebaceous glands and vacuolization of spinosum and granulosum cells was also observed.

The β -actin gene was amplified in all aural plaque samples, confirming the presence of cellular DNA in these samples. In addition, all mini-genes used as positive controls (EcPVs 2, 7, 8 and 9) were readily detected in the assay, and amplified products were observed at dilutions of at least 10^{-5} , showing that the PCR was adequately standardized.

EcPVs 2, 7, 8 and 9 were not detected in any of the 32 samples collected for this study. EcPVs 6, 3 and 4 were the most detected viral types, followed by EcPV 5 and EcPV 1 (Table 2). When assessed just the aural plaque samples from the internal pinna, at least one viral type was detected in 97% (28 of 29) (Table 3). Coinfection was observed in 86% (25 of 29) of these samples. No significant association was found when assessing lesion characteristics (type and distribution), EcPV type, or coinfection presence. When EcPV infection status was compared between the ears of the same horse, it was observed that EcPV 6 was the most common EcPV type detected bilaterally (83.3% of horses, or 10/12), followed by EcPV 3 (81.8%, 9/11), EcPV 4 (72.7%, 8/11) and EcPVs 5 (50%, 4/8) and 1 (50%, 1/2).

EcPVs 3, 5 and 6 were identified in coinfections in periocular and preputial aural plaques collected from one of the horses. Notably, in addition to these viruses, EcPVs 1 and 4 were also identified in the ear lesions of this animal. EcPVs 8 and 9 were not detected in any of the 108 aural plaque samples used in the previous study [4].

4. Discussion

The clinical and histological characteristics of the lesions matched the descriptions in the literature and included depigmented and hyperkeratotic

plaques [1,2,5] presenting epidermal hyperplasia, hyperkeratosis, orthokeratosis, hypomelanosis and inflammatory infiltration in the histopathological analysis. Other alterations, such as koilocytosis, parakeratosis, cell mitosis and the presence of viral inclusions, may also be present in aural plaque lesions; however, they were not observed in the samples evaluated in this study.

Lesions affecting three or more quadrants of the pinna (86.2%, 25 of 29) and lesions of the coalescing type (75.9%, 22 of 29) were predominant ($P < 0.001$), corroborating the previous observation that aural plaques tend to coalesce and affect the entire inner face of the pinna [1,5]; however, these results differ from a study previously carried out by our group [4], in which we did not observe a single predominant distribution or type of aural plaque lesion in horses in Brazil.

Aural plaque lesions can rarely be found in other regions, i.e., the gluteal, vaginal and perineal regions [5], as was observed in a single horse in this study, which presented lesions in the periocular and preputial regions. Thus, it is important to consider aural plaque as a differential diagnosis for neoplasms that have characteristics similar to papillomas affecting any part of the body, especially in cases in which the animal's ears are also affected.

EcPVs 2, 7, 8 and 9 were not identified either in the samples unique to this study or in the previously analyzed samples [14]. These results are reliable because 1. the β -actin gene was amplified in all samples, 2. the specificity of the primers was confirmed in silico, and 3. all minigene PCRs amplified products of the expected sizes and sequences. EcPVs 2, 7, 8 and 9 have been associated with other types of papillomas in horses, with EcPV 8 being related to generalized lesions [15, 17] and EcPVs 2, 7 and 9 being associated with genital lesions [13, 16]. In addition, EcPV 9 and 2 coinfection was detected in genital samples from asymptomatic horses located in Italy, suggesting the predisposition of EcPV 9 to genital infections [18]. The lack of detection of these EcPVs in the samples may be related to the fact that the horses evaluated in this study did not present genital or generalized lesions. Furthermore, the DNA of these viruses was also not detected in aural plaques collected from the periocular and preputial regions, suggesting that the prevalence of these EcPVs in Brazil is very low or that these

EcPVs are absent and that they are not associated with the etiology of aural plaque.

Only EcPVs 1, 3, 4, 5 and 6 were detected in the 32 samples assessed in this study. The association of these viral types with aural plaque etiology has been reported in previous studies in Brazil [9, 14] and in other countries [12,13]. As previously observed [8,14], coinfections were detected in 86% (25 of 29) of auricular lesions; in addition, coinfections were also observed in the aural plaques of the periocular and preputial regions. There was no relationship between the EcPV detected and the clinical and/or histopathological characteristics of the lesions. It is known that environmental and immunological factors and the type of management carried out in animals may influence the development of aural plaque lesions [2,4,5]; however, an association between the viral type and the characteristics of aural plaque lesions was not observed in a study carried out in Brazil [14]. Furthermore, coinfections between EcPVs tend to occur randomly, and the way that they impact the development of aural plaque lesions is also unclear [2,14].

EcPV 1 was less commonly detected ($P<0.001$), being identified in only 9% (3/32) of the samples and always as part of a coinfection with another viral type, highlighting its apparent need for previous infection with another EcPV [8]. Therefore, considering the low frequency of this EcPV and its coinfection rate, it can be assumed that EcPV 1 does not act as a causative agent of aural plaque, occurring only concomitantly in these lesions [11,14], with its main role related to the development of classic papillomatosis in horses [5,19].

In the 32 samples collected for this study, EcPV 6 (81%) was the most prevalent virus detected, along with EcPV 3 (72%) and EcPV 4 (63%), followed by EcPV 5 (47%) ($P<0.001$); this observation contrasts with previously reported data [14] showing that EcPV 4 was the most prevalent (detected in more than 80% of samples), while EcPV 6 was observed in only 18% of samples. Furthermore, EcPVs 3 and 5 were more frequently detected than in the study previously carried out by our group in Brazil [14], especially EcPV 5, which was previously identified in only 2% (2/108) of aural plaque samples. EcPVs 3 and 4 were the only viruses detected in the context of monoinfection, corroborating

previous studies that also detected these viruses in isolation and suggesting their potential to establish primary infection [8,13,14].

5. Conclusion

The lack of detection of EcPVs 2, 7, 8 and 9 suggests that these viruses are not related to the etiology of aural plaques in Brazil. EcPVs 6, 3 and 4 were the most prevalent, reinforcing the concept that these EcPVs play an important role in the etiology of the disease in Brazil.

Authors' declaration of interests

No competing interests have been declared.

Financial disclosure

This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil), grant numbers 21/10987-3 and 22/05142-7, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant 305172/2021-2 and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), Brasil (finance code 001).

Authors' contributions:

Conceptualization: C.R.B., A.B. and J.O.-F.; Methodology, C.R.B., A.B. and J.O.F.; Formal Analysis, C.R.B., J.R.C., A.B. and J.O.-F.; Investigation, J.F., J.R.C., L.G.A., A.L.A., J.M.H., C.E.F.A., M.H. and J.O.F.; Writing—Original Draft Preparation, J.F. and J.O.F.; Writing—Review and Editing, J.F., J.R.C., L.G.A., A.L.A., J.M.H., C.E.F.A., M.H., A.B. and J.O.-F.; Supervision, J.O.-F.; Funding Acquisition, C.R.B., J.R.C. and J.O.-F.

References

- [1] Souza NR, Adorno VB, Marcondes JS, Oliveira-Filho JP, Conceição LG, Amorim RL, Borges AS. Clinical and histopathological characteristics of the aural plaque in Mangalarga and Quarter Horses. *Pesq Vet Bras* 2008;28:279-84. [doi:10.1590/S0100-736X2008000600004](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000600004).
- [2] Alfieri A, Wosiacki SR, Alfieri AF. Papillomaviridae. In: Flôres, E.F. *Virologia Veterinária*. 1ed. Santa Maria: Ed. UFSM 2007;1:397-412.
- [3] De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27. [doi:10.1016/j.virol.2004.03.033](https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033).
- [4] Mira J, Herman M, Zakia LS, Olivo G, Araújo Jr. JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP. Factors associated with equine aural plaque in Brazil. *Vet Dermatol* 2016;27:408–e104. [doi:10.1111/vde.12360](https://doi.org/10.1111/vde.12360).
- [5] Scott DW & Miller WH. Neoplasms, Cysts, Hamartomas, and Keratoses. In: *Equine Dermatology*. Maryland Heights, Missouri: 2° ed. Saunders 2011;2:468-73.
- [6] Fairley RA & Haines DM. The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. *Vet Pathol* 1992;29:79-81. [doi:10.1177/030098589202900110](https://doi.org/10.1177/030098589202900110).
- [7] Postey RC, Appleyard GD, Kidney BA. Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sarcoids for the presence of equine papillomavirus DNA and papillomavirus antigen. *Can J Vet Res* 2007;71:28-33.
- [8] Gorino AC, Oliveira-Filho JP, Taniwaki SA, Basso RM, Zakia LS, Araujo Jr. JP, Borges AS. Use of PCR to estimate the prevalence of *Equus caballus* papillomavirus in aural plaques in horses. *Vet J* 2013;197:903-04. [doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.014](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.014).
- [9] Taniwaki SA, Magro AJ, Gorino AC, Oliveira-Filho JP, Fontes MR, Borges AS, Araujo Jr. JP. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. *Vet Microbiol* 2013;162:85–93. [doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.025](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.025).
- [10] Zakia LS, Basso RM, Olivo G, Herman M, Araujo Jr. JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP. Detection of papillomavirus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded equine aural plaque samples. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015;67(4):1193-6. [doi:10.1590/1678-4162-8077](https://doi.org/10.1590/1678-4162-8077).
- [11] Zakia LS, Herman M, Basso RM, Hernadez JM, Araujo Jr. JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP. *Equine papillomavirus* detection in aural plaques by qPCR. *Braz J Vet Pathol* 2019;12(1):1-4. [doi:10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4](https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4).
- [12] Lange CE, Tobler K, Ackermann M, Favrot C. Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. *Vet Microbiol* 2011;149:85-90. [doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.019](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.019).
- [13] Lange CE, Vetsch E, Ackermann M, Favrot C, Tobler K. Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. *J Gen Virol* 2013;94:1365–72. [doi:10.1099/vir.0.052092-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.052092-0).
- [14] Mira J, Herman M, Zakia LS, Olivo G, Araújo Jr. JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP. Frequency of *Equus caballus* papillomavirus in equine aural plaques. *J Vet Diag Invest* 2018;30:565-8. [doi:10.1177/1040638717753495](https://doi.org/10.1177/1040638717753495).
- [15] Linder KE, Bizikova P, Luff J, Zhou D, Yuan H, Breuhaus B, Nelson E, Mackay R. Generalized papillomatosis in three horses associated with a novel

- equine papillomavirus (EcPV8). *Vet Dermatol* 2018;29:72-e30. doi:[10.1111/vde.12481](https://doi.org/10.1111/vde.12481).
- [16] Li C, Chang W, Mitsakos K, Rodger J, Holmes EC, Hudson BJ. Identification of a novel equine papillomavirus in semen from a thoroughbred stallion with a penile lesion. *Viruses* 2019;11:713-20. doi:[10.3390/v11080713](https://doi.org/10.3390/v11080713).
- [17] Peters-Kennedy J, Lange CE, Rine SL, Hackett RP. *Equus caballus papillomavirus* 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse. *Equine Vet J* 2019;51:470–4. doi:[10.1111/evj.13046](https://doi.org/10.1111/evj.13046).
- [18] De Paolis L, De Ciucis CG, Peletto S, Cappelli K, Mecocci S, Nervo T. et al. *Equus caballus Papillomavirus* Type-9 (EcPV9): First Detection in Asymptomatic Italian Horses. *Viruses* 2022;14:1-13. doi:[10.3390/v14092050](https://doi.org/10.3390/v14092050).
- [19] Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM & Grinwis GCM. Basics of equine dermatology. *Equine Vet Educ* 2015;28(9):520-9. doi:[10.1111/eve.12444](https://doi.org/10.1111/eve.12444).
- [20] Oliveira-Filho JP, Bandial PR, Cunha PHJ, Cruz TF, Araújo Jr.JP, Divers TJ, Winand NJ, Borges AS. Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real- time PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;135:34-42. doi:[10.1016/j.vetimm.2009.10.027](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.027).

Table 1. PCR and sequencing primer sets used in this study.

Primer sets	Primer sequences (5'-3')	Product (bp) ⁴	Melting	GenBank™ ID
JPEcPV1¹	GTGGTGTCTGGCTCCTTATTT GGTATCCTTCTCCCTCTCATCT	186	56 °C	NP620513
JPEcPV2¹	ATGGTAACAGCGAGCGTATG CGAGGTCTCTGGGTTGTAAATG	179	52 °C	ADZ73319.1
JPEcPV3²	TTGCGCCAGGTTTCCACATCTA TTGTTCTGGCCTTGTGCACGTT	116	60 °C	GU384895
JPEcPV4²	ACAATGGTGTGCTGGCACGA ACCGTGCAAAGCTGCAGAATGA	187	60 °C	JF939718.1
JPEcPV5²	GGCTCCGTAGACATTCCTAAAG CTGTTACACCCACGCCTAAT	184	62 °C	YP007349388
JPEcPV6²	CTACCAGAGGAACGAGCTTTAC TAGCTCCCAATCCTCCAAGATA	203	62 °C	YP007518497
JPEcPV7¹	GGACGTATGGAGTGACTTTG TTTCCATAGGGTCGGGTAG	202	60 °C	YP007518498.1
EcPV_Palo³	CTCAATAGGAGGGCAAGACC AAACAGTCACGGTCCCAAG	392	55 °C	MK029059.1
CB_EcPV9	CCGTGGAGTTTGAGGAAGAAA CCATTATATCCTCGCGTGGTG	202	60 °C	MN117918.1
β-actin⁴	CATTGTCCACCTTCCAGCAGATGT CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT	86	60 °C	AF035774

¹Mira et al. [14], ²Zakia et al. [10], ³Peters-Kennedy et al. [17], ⁴Oliveira-Filho et al. [19]. ⁴Base pairs.

Table 2. The frequency (%) of *Equus caballus* papillomavirus (EcPV) in 32 equine aural plaques.

EcPV 1	EcPV 2	EcPV 3	EcPV 4	EcPV 5	EcPV 6	EcPV 7	EcPV 8	EcPV 9
9% ^c (3/32)	—	72% ^a (23/32)	63% ^a (20/32)	47% ^b (15/32)	81% ^a (26/32)	—	—	—

Dash (-): viral type not detected. Different superscript letters reflect statistically significant differences (P<0.001).

Table 3. The frequency (%) of each distribution and type of lesion for *Equus caballus* papillomavirus (EcPV) detected in 28 aural plaque samples from the internal pinna.

EcPV	Frequency	Quadrant affected*			Type of lesion**		
		I	II	III	A	B	C
3	3.6 (1/28)	100 (1/1)	-	-	100 (1/1)	-	-
4	7.1 (2/28)	50 (1/2)	50 (1/2)	-	100 (2/2)	-	-
3 and 4	3.6 (1/28)	-	-	100 (1/1)	-	-	100 (1/1)
3 and 5	3.6 (1/28)	-	-	100 (1/1)	-	-	100 (1/1)
3 and 6	3.6 (1/28)	-	-	100 (1/1)	-	100 (1/1)	-
4 and 6	10.7 (3/28)	-	-	100 (3/3)	-	-	100 (3/3)
1, 3 and 6	3.6 (1/28)	-	-	100 (1/1)	-	-	100 (1/1)
3, 4 and 6	21.4 (6/28)	-	-	100 (6/6)	-	-	100 (6/6)
3, 5 and 6	10.7 (3/28)	-	-	100 (3/3)	-	-	100 (3/3)
4, 5 and 6	10.7 (3/28)	-	-	100 (3/3)	-	33.3 (1/3)	66.7 (2/3)
1, 3, 5 and 6	3.6 (1/28)	-	-	100 (1/1)	-	-	100 (1/1)
3, 4, 5 and 6	14.3 (4/28)	-	-	100 (4/4)	-	25 (1/4)	75 (3/4)
1, 3, 4, 5 and 6	3.6 (1/28)	-	-	100 (1/1)	-	-	100 (1/1)

*Quadrant affected: I = only 1 quadrant affected; II = 2 quadrants affected; III = 3 or more quadrants affected. **Type of lesion: A = ears with 1–5 punctate lesions; B = ears with >5 lesions; C = ears with coalescing aural plaque lesions. A dash (-) indicates an outcome that was not observed.

CAPÍTULO III

1. Conclusão Geral

Os EcPVs 2, 7, 8 e 9 foram previamente associados a outras manifestações clínicas de papilomatose em equinos, a ausência de detecção desses EcPVs nas amostras de placa aural coletadas em diferentes regiões do país, sugere que estes EcPVs não possuem relação com a etiologia da enfermidade no Brasil.

A detecção dos EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 confirma a associação destes vírus à etiologia da placa aural, sendo que a menor frequência de detecção do EcPV 1 supõe que este vírus não desempenha papel relevante no desenvolvimento das lesões auriculares. Embora nossos resultados tenham divergências quando comparados a frequência de detecção dos EcPVs 3, 4 e 6 em estudos anteriores, é importante ressaltar que a alta taxa de detecção desses EcPVs sugere que estes tipos virais tenham maior importância na etiologia da placa aural.

Devido à ausência de amostras de placa aural positivas para os EcPVs 2, 7, 8 e 9, a síntese de mini-genes foi essencial para padronizar as reações de PCR e seu uso como controles positivos nas reações permitiu validar os protocolos de termociclagem estabelecidos bem como para comprovar a sensibilidade dos primers utilizados.

ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "DETECÇÃO DO DNA DOS EcPVs EM AMOSTRAS DE PLACA AURAL DE EQUINOS DA RAÇA CRIOLA." **Protocolo CEUA 0193/2020**, a ser conduzido por Cristiana Raach Bromberger, responsável/orientador José Paes de Oliveira Filho, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/03/2021 a 28/02/2023
Nome Comum / Espécie / Linhagem	EQUINA / EQUUS CABALLUS /
Raça	Crioulo
Nº de animais machos	12
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	350kg
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	2 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Clínica de Grandes Animais da FMVZ/Unesp, Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 16/12/2020

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br