

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO DO DNA DOS PAPILOMAVÍRUS EM AMOSTRAS
DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E SARCOIDE EM
EQUINOS

ANA MARIA DIAS DA COSTA

BOTUCATU - SP
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO DO DNA DOS PAPILOMAVÍRUS EM AMOSTRAS
DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E SARCOIDE EM
EQUINOS

ANA MARIA DIAS DA COSTA

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 – SP

2025

C837d Costa, Ana Maria Dias da
Detecção do DNA dos papilomavírus em amostras de carcinoma de células escamosas e sarcoide em equinos / Ana Maria Dias da Costa. -- , 2025
44 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
Orientador: José Paes de Oliveira-Filho

1. Cavalo. 2. Diagnóstico. 3. EcPV 1. 4. Neoplasias. 5. PCR.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Nome do autor: Ana Maria Dias da Costa

Título: DETECÇÃO DO DNA DOS PAPILOMAVÍRUS EM AMOSTRAS DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E SARCOIDE EM EQUINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Thaís Gomes Rocha
Membro Titular
Departamento de Clínica e Cirurgia
Veterinária
FCAV – UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

Prof. Dr. Didier Quevedo Cagnini
Membro Titular
Departamento de Patologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu, São
Paulo.

Datada defesa: 03 de fevereiro de 2025

AGRADECIMENTOS

Antes tudo, venho a agradecer a Deus pelas oportunidades oferecidas, a força e a saúde para a realização de mais um trabalho.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Vandelina Dias da Costa e José Walter Dias da Costa, por todo apoio, paciência, compreensão e ensinamentos durante todos os anos de minha vida. Aos meus irmãos, Ana Paula Dias da Costa e José Walter Dias da Costa Júnior, que sempre estiveram ao meu lado, sendo desde cedo os meus alicerces.

Um agradecimento especial também a todos os amigos que surgiram ao longo dessa jornada, principalmente a vocês Thaís Fernanda Ribeiro, Lucas Gabriel Rocha e Kaíque de Moura Pires, que inúmeras vezes foram meus braços e minhas pernas nessa etapa, sendo responsáveis por momentos incríveis vividos por aqui. Não posso deixar de agradecer também ao senhor de Chapéu Preto, o Sr Marco Antônio (Marquinho), um paizão que ganhei aqui, por toda ajuda e suporte ao longo desses anos.

Ao professor José Paes de Oliveira-Filho, pelas oportunidades ofertadas, assim como todo o apoio fornecido. À equipe da Clínica de Grande Animais (GGA), do Laboratório de Biologia Molecular de Clínica Veterinária da Universidade Estadual Paulista (LBMCV-UNESP) e ao Serviço de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, nº 2021/10987-3; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, nº 305172/2021-2; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), Brasil, Código de Financiamento 001, órgãos responsáveis pelo financiamento e apoio da pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação do capsídeo de BPV. B- Micrografia eletrônica de contraste negativo de vírions do (HPV-1) (Adaptado de MACLACHLAN & DUBOVI, 2017) 5
- Figura 2 – Crescimento de células neoplásicas pela ação das oncogenes virais E6 e E7 (Adaptado de HOPPE-SEYLER et al., 2017) 7
- Figura 3 – Eventos na infecção de queratinócitos pelo papilomavírus. (1) Infecção primária – células do estrato basal. (2) Proliferação lenta das células infectadas. (3) Diferenciação celular associada a formação de um papiloma, com eliminação dos vírions com células esfoliadas do estrato córneo (Adaptado de MACLACHLAN & DUBOVI, 2017) 8

LISTA DE ABREVIações

BPV - *Bos taurus* papillomavirus

CCE - Carcinoma de células escamosas

EcPV - *Equus caballus* papillomavirus

FFPE - fixados em formalina e embebidos em parafina

Kb - Quilobases

Kg - Quilograma

LCR - Região de códon longo

Mg - Miligrama

min. - Minutos

ng - Nanograma

nm – Nanômetros

OaPV - *Ovine* papillomavirus

pb - Pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pRb – Proteína retinoblastoma

s - Segundos

μL - Microlitro

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Papilomavírus.....	5
2.2. <i>Bos taurus</i> papillomavirus.....	9
2.3. <i>Equus caballus</i> papillomavirus.....	9
2.4. Sarcoide.....	10
2.5. Carcinoma de Células Escamosas.....	11
3. REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO II	
Trabalho científico.....	20
CAPÍTULO III	
Conclusão Geral.....	34
Anexos.....	35

COSTA, A.M.D. **Detecção do DNA dos papilomavírus em amostras de carcinoma de células escamosas e sarcoide em equinos.** Botucatu, 2025. 44p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os *Equus caballus* papillomavirus (EcPV) têm sido associados a diversas neoplasias em equinos, como papilomatose clássica e genital, carcinomas de células escamosas (CCE) e placa aural. Uma vez que os EcPV 2, 4, 7 e 9 já foram associados a lesões neoplásicas genitais e penianas em equinos, e que o papilomavírus bovino (BPV) participa da etiologia do sarcoide equino, o objetivo deste estudo foi identificar a presença do BPV 1 e 2 e dos EcPV 1 ao 10 em amostras de CCE e sarcoides em equinos por PCR. Foram avaliadas 50 amostras de sarcoide e 26 amostras de CCE, entre amostras de tecido fresco congelado e fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE). Todas as amostras tiveram o diagnóstico confirmado por histopatologia. O DNA do BPV foi identificado em 60% (30/50), desses 57% (17/30) foram positivos para o DNA do BPV 1, enquanto 37% (11/30) positivos para o BPV 2, com codetecção ocorrendo em 6% (2/30) das amostras de sarcoide avaliadas. Enquanto o EcPV estava presente em 54% (14/26) dos CCE e em 4% (2/50) dos sarcoides avaliados, confirmadas por meio de sequenciamento. Apenas os EcPV 1 (14%, 2/14) e EcPV 2 (86%, 12/14) foram detectados nas amostras de CCE, enquanto apenas o EcPV 1 foi identificado nos sarcoides (100% 2/2). Os EcPV 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 não foram identificados em nenhuma amostra avaliada. Dessa forma, os resultados sugerem que além do EcPV 2, o tipo 1 pode ser um possível agente envolvido nos casos de CCE e sarcoide em equinos. O esclarecimento sobre os agentes envolvidos nas neoplasias é fundamental para o direcionamento de medidas preventivas assim como controle mais eficaz dessas enfermidades.

Palavras-chave: Cavalo; Diagnóstico; EcPV 1; Neoplasias; PCR.

COSTA, A.M.D. **Detection of papillomavirus DNA in samples of squamous cell carcinoma and sarcoid in horses.** Botucatu, 2025. 44p. Dissertação (Mestrado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus de Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

Equus caballus papillomavirus (EcPV) has been associated with several neoplasms in horses, such as classic and genital papillomatosis, SCC, and aural plaque. Since EcPV 2, 4, 7, and 9 are associated with genital and penile neoplastic lesions in horses and bovine papillomaviruses (BPV) are involved in the etiology of equine sarcoid, this study aimed to identify the presence of BPV and EcPV in samples of squamous cell carcinoma (SCC) and sarcoids in horses by PCR. Fifty sarcoid samples and 26 SCC samples were evaluated, allotted between fresh tissue and FFPE samples, all with confirmatory diagnoses performed via histopathology and tested for the presence of BPV by PCR. BPV 1 and 2 DNA was identified in 60% (30/50) of these, 57% (17/30) were positive for BPV 1 DNA, while 37% (11/30) were positive for BPV 2, with co-detection occurring in 6% (2/30) of sarcoid samples. While EcPV were present in 54% (14/26) of SCC and 4% (2/50) of sarcoids evaluated, confirmed by sequencing. Only EcPV 1 (14%, 2/14) and EcPV 2 (86%, 12/14) were detected in SCC samples, while only EcPV 1 was identified in sarcoids (100% 2/2). EcPV 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 were not identified in any sample evaluated. Thus, the results suggest that in addition to EcPV 2, type 1 may be a possible agent involved in SCC and sarcoid cases in horses. Clarification of the agents involved in neoplasias is essential for directing preventive measures as well as more effective control of these diseases.

Keywords: Equine; Diagnosis; EcPV 1; Neoplasia; PCR.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) e o sarcoide são as principais neoplasias cutâneas descritas em equinos (CARVALHO et al., 2014; CHRISTEN et al., 2014; KNOTTENBELT et al., 2015; ZAHRA et al., 2019). Os CCE são tumores epiteliais malignos formados a partir da transformação neoplásica de queratinócitos (SCOTT & MILLER, 2011). As lesões podem ser encontradas em qualquer parte do corpo dos equinos, entretanto, são mais comuns em áreas de pele não pigmentada e em junções mucocutâneas, como na região ocular e genitália externa (SCOTT & MILLER 2011; SYKORA et al., 2012).

Já os sarcoides, considerados como tumores fibroblásticos benignos, apresentam altas taxas de recorrências e elevada capacidade infiltrativa, o que dificulta sua resposta a diferentes terapias (PLUMMER, 2005; HOLLIS, 2024). Presentes em qualquer região do corpo do equino, mas com maior frequência em região de cabeça, membros e região ventral do corpo (SCOTT & MILLER, 2011), os sarcoides podem ser classificados de acordo com sua aparência, como: oculto, verrucoso, nodular, fibroblástico, misto e maligno (KNOTTENBELT et al., 2015; ZAHRA et al., 2019),

Entretanto, mesmo sendo as principais neoplasias cutâneas identificadas em equinos (CARVALHO et al., 2014; CHRISTEN et al., 2014), alguns dos agentes envolvidos e os mecanismos relacionados ao desenvolvimento ainda não foram totalmente definidos (SYKORA & BRANDT, 2017). Os principais fatores relacionados ao surgimento dessas neoplasias são exposição solar relacionados aos casos de CCE, inflamações crônicas e a predisposição genética (SCOTT & MILLER, 2011). Além disso, o papilomavírus desempenha um papel considerável no surgimento dessas neoplasias (SYKORA et al., 2012; KNOTTENBELT et al., 2015; MUNDAY et al., 2021).

Dos papilomavírus, os *Equus caballus* papillomavirus (EcPV) 2 e 7 são relacionados aos casos de CCE em equinos, enquanto a infecção pelo *Bos taurus* papillomavirus (BPV) tipo 1, 2 e 13 são considerados os principais fatores desencadeantes do sarcoide na espécie (LUNARDI et al., 2013; CHRISTEN et al., 2014; KNOTTENBELT et al., 2015; ZAHRA et al., 2019; MUNDAY et al., 2021).

Para o diagnóstico etiológico dos casos, a realização da técnica de cadeia da polimerase (PCR), a imuno-histoquímica e a hibridização são técnicas importantes para identificação do DNA viral e determinação dos agentes associados a essas neoplasias (CALLAN et al., 2005; KELESIDIS et al., 2011; ZAKIA et al., 2015; LUFF et al., 2023).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os papilomavírus

Os papilomavírus (PVs) fazem parte da família Papillomaviridae, que contém um genoma de DNA viral circular, fita dupla e associado a histonas. São vírus não envelopados, com 55 nm de diâmetro e 6,8 a 8,4 kb de tamanho, compostos de 72 capsômeros hexavalentes em arranjos pentaméricos (Figura 1). O genoma codifica cerca de 8 a 10 proteínas, duas, sendo a L1 e L2, formadoras do capsídeo (SCOTT & MILLER, 2011; TORRES & KOCH, 2013; RAMSAUER et al., 2019).

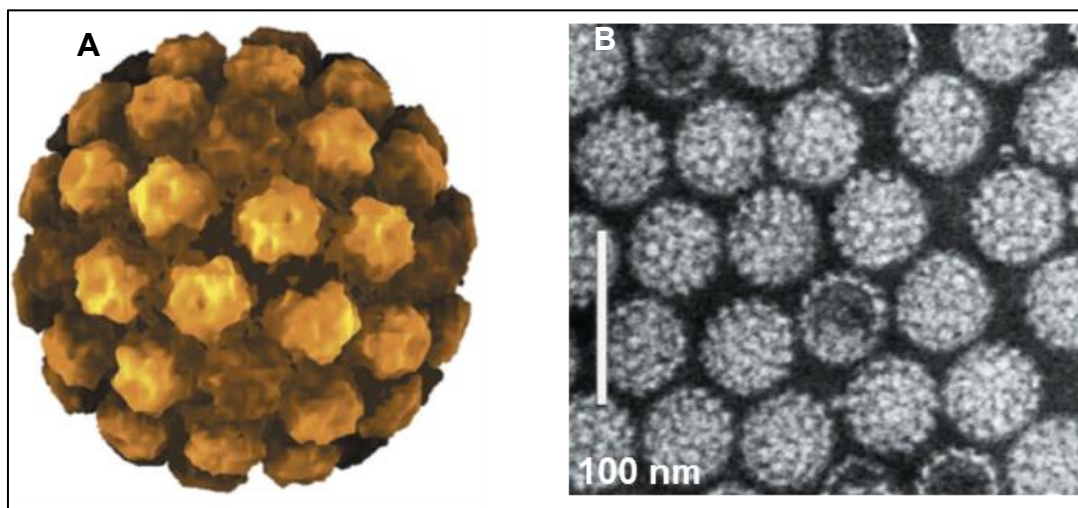


Figura 1. A – Representação do capsídeo de BPV. B – Micrografia eletrônica de contraste negativo de vírions do (HPV-1) (Adaptado de MACLACHLAN & DUBOVI, 2017).

As infecções pelos PVs podem resultar em casos assintomáticos ou manifestações clínicas observadas através da formação de papilomas ou verrugas na pele, desencadeada a partir da proliferação epitelial (SCOTT &

MILLER, 2011; TORRES & KOCH, 2013; ARALDI et al., 2017). Na maior parte dos casos, as lesões tumorais são benignas e podem se estabilizar ou regredir espontaneamente, como os casos da papilomatose viral equina (SCOTT & MILLER, 2011; DONG et al., 2017), contudo podem evoluir para neoplasias malignas (TORRES & KOCH, 2013; JONES, 2022; HOLLIS, 2024).

Os papilomavírus infectam principalmente queratinócitos basais induzindo hiperplasia epitelial, contudo podem também provocar a proliferação de fibroblastos, desencadeando a formação dos fibropapilomas (SCOTT & MILLER, 2011; PETERS-KENNEDY et al., 2020). São vírus que apresentam elevada especificidade com seus hospedeiros (MACLACHLAN & DUBOVI, 2017; RAMSAUER et al., 2019), com exceção apenas ao papilomavírus bovino (LUNARDI et al., 2013; CHRISTEN et al., 2014; YAMASHITA-KAWANISHI et al., 2021) e ovino (De FALCO et al., 2024), identificados em tecidos de sarcoide na espécie equina.

A associação entre a presença dos PVs e a ocorrência de neoplasias foi inicialmente descrita em coelhos em 1935, seguido da confirmação desses agentes virais em amostras de carcinomas cervicais em humanos em 1980 (MACLACHLAN & DUBOVI, 2017). Posteriormente, a capacidade oncogênica dos papilomavírus foi atribuída principalmente às oncogenes E6 e E7, as quais são responsáveis pelo controle da replicação e tradução viral (De VILLIERS et al., 2004; SCOTT & MILLER, 2011), atuando diretamente na inibição do reparo celular, fragmentação do DNA do hospedeiro, provocando instabilidade genômica; além de alterações no ciclo celular e alterações citogenéticas (ALFIERI et al., 2007; ARALDI et al., 2017; KAYNARCALIDAN & OGUZOGLU, 2021) (Figura 2).

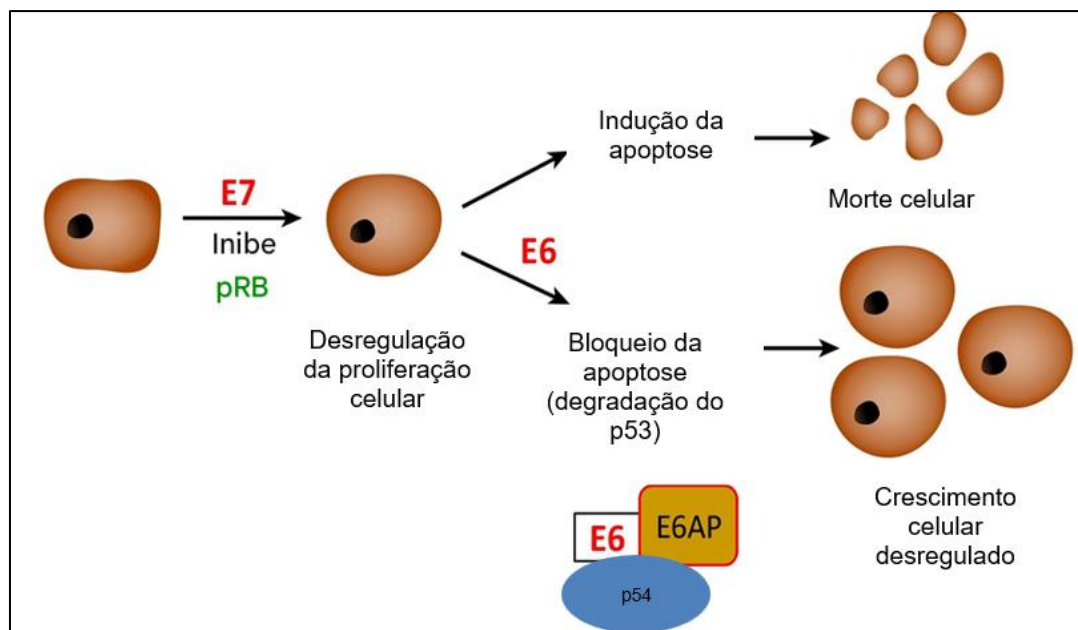


Figura 2. Mecanismo de ação das oncogenes virais E6 e E7 no desenvolvimento de células neoplásicas. A partir da ligação da oncogene E6 ao p53 (gene de supressão tumoral) ocorre a degradação dessa proteína, impedindo controle do ciclo celular e a inibição da apoptose celular. Enquanto a oncogene E7 é responsável pela ligação ao pRb (gene supressor tumoral), causando desregulação da proliferação celular (Adaptado de HOPPE-SEYLER et al., 2017).

A expressão da oncoproteína E7 do HPV sozinha leva à desregulação da proliferação celular pela inativação de pRb (e outros fatores), que pode ser neutralizada pela apoptose induzida por p53, eliminando assim células desreguladas pelo crescimento (caminho superior). A expressão concomitante de E6 induz a degradação proteolítica de p53 por meio da formação de um complexo trimérico E6/E6AP/p53. Consequentemente, a resposta apoptótica em direção a E7 é bloqueada, permitindo o crescimento de células sob o estímulo de crescimento anormal exercido por E7.

A organização do genoma viral difere entre os gêneros individuais de papilomavírus, mas de forma geral são divididas em três regiões específicas: região de genes iniciais, região de genes tardios e região de códon longo (MACLACHLAN & DUBOVI, 2017). Os genes iniciais (E) codificam proteínas ligadas a replicação viral (E1, E2 e E4) e as oncoproteínas (E5, E6 e E7). As proteínas E1, E2 e E4 atuam na replicação do material genético, enquanto a E4

também é descrita como responsável pela maturação viral e remodelação da matriz extracelular (ARALDI et al., 2017; KAYNARCALIDAN & OGUZOGLU, 2021).

A região de genes tardios (L) codifica as proteínas estruturais L1 e L2 do capsídeo viral (De VILLIERS et al., 2004; GHIM et al., 2009), tem 80% da sua composição pela proteína L1, o que a torna como escolha na identificação de novos genótipos (De VILLIERS et al., 2004; ARALDI et al., 2017); enquanto a L2 possui capacidade de induzir anticorpos neutralizantes facilitando a penetração do vírus na célula infectada (ALFIERI et al., 2007; MACLACHLAN & DUBOVI, 2017). Já a região de códon longo, atuam na regulação da replicação viral (De VILLIERS et al., 2004; TORRES & KOCH, 2013).

A infecção tem início após a entrada do PV através de microlesões na pele, sendo transportados ao retículo endoplasmático das células basais, onde iniciarão o processo de replicação (Figura 3). Durante a infecção produtiva, a transcrição das regiões codificadoras E e L é controlada por promotores separados e ocorre na mesma fita de DNA. Primeiro, os genes E são transcritos produzindo as proteínas envolvidas na replicação do vírus e regulação celular. As proteínas estruturais, que estão envolvidas na montagem do capsídeo, são transcritas da outra metade do genoma viral apenas quando as células epiteliais diferenciadas se aproximam da superfície do epitélio. Os papilomavírus não causam lise celular, os vírions são liberados somente após as células terem sido descamadas e degradadas na superfície epitelial (TORRES & KOCH, 2013; MACLACHLAN & DUBOVI, 2017; JONES, 2022).

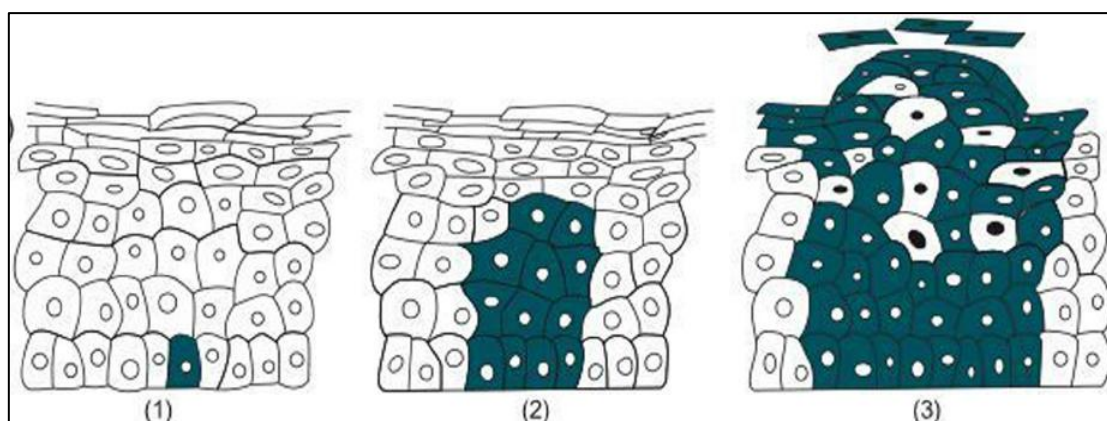


Figura 3. Eventos na infecção de queratinócitos pelo papilomavírus. (1) Infecção primária – células do estrado germinativo (basal). (2) Proliferação lenta das

células infectadas. (3) Diferenciação celular associada a formação de um papiloma, com eliminação dos vírions com células esfoliadas do estrato basal. (Adaptado de MACLACHLAN & DUBOVI, 2017).

Na avaliação histológica, a infecção latente não apresenta alterações, contudo, no processo de replicação, essas células podem estar aumentadas e com a presença de coilocitose, alteração que consiste em células com núcleos picnóticos, contornados por extensos halos claros com volume geralmente superior ao citoplasma característicos das lesões de PV nas células afetadas (XAVIER et al., 2005; MACLACHLAN & DUBOVI, 2017). Outras formas de identificação do vírus são a detecção de proteínas do papilomavírus utilizando imuno-histoquímica, técnicas moleculares como amplificação por PCR, hibridização in situ e sequenciamento de próxima geração (CLAUS et al., 2009; LANGE et al., 2013; ZAKIA et al., 2015; LINDER et al., 2018; BROMBERGER et al., 2023).

2.2. *Bos taurus* papillomavirus

O *Bos taurus* papillomavirus (BPV), pertencentes a família Papillomaviridae, são agrupados em quatro tipo de gêneros: *Deltapapillomavirus* (BPV 1, 2, 13 e 14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV 5 e 8), *Xipapillomavirus* (BPV 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12 e 15) e *Dioxipapilomavírus* (BPV 7) (ARALDI et al., 2017; HASPELAGH et al., 2018). Desses gêneros, o *Deltapapillomavirus* e *Epsilonpapillomavirus* são associadas a formação de papilomas e fibropapilomas, enquanto o *Xipapillomavirus*, por conta de suas características epiteliotrópicas, é relacionado ao desenvolvimento de papilomas (CLAUS et al., 2009; SCOTT & MILLER, 2011; ARALDI et al., 2017).

O BPV são vírus apresentam elevada especificidade com seu hospedeiro (SCOTT & MILLER, 2011), contudo, a exceção é feita aos casos do BPV na espécie equina, no qual foram identificados como os principais agentes relacionados ao desenvolvimento neoplásico do sarcoide na espécie (KNOTTENBELT et al., 2015; MUNDAY et al., 2021). A transmissão é descrita principalmente por meio da inoculação do agente viral na pele dos animais por fômites, contato direto entre os animais e vetores mecânicos (MACLACHLAN & DUBOVI, 2017; HASPELAGH et al., 2018).

Nos bovinos, os papilomas são mais descritos em animais jovens,

contudo bovinos de todas as idades podem ser afetados (CLAUS et al., 2009; MACLACHLAN & DUBOVI, 2017). Os papilomas cutâneos são neoplasias benignas proliferativas caracterizadas pela formação hiperplásica do epitélio (SCOTT & MILLER, 2011), que são classificados em papilomas típicos, pedunculados, atípicos ou planos, e filamentosos (ARALDI et al., 2017).

Podem persistir por 1 a 6 meses antes que haja a regressão espontânea mediadas pelo sistema imune do hospedeiro. Raramente as infecções se tornam persistentes ou cursam com grandes complicações, geralmente esses casos são associados ao desenvolvimento maligno da lesão, afecções secundárias ou por complicações mediadas à localização das lesões (CLAUS et al., 2009; MACLACHLAN & DUBOVI, 2017).

2.3 *Equus caballus* papillomavirus

Até o momento, foram descritos 16 tipos de papilomavírus que infectam equinos e muares, sendo dez tipos de papilomavírus equino (EcPV 1 ao EcPV 10) (LI et al., 2019; PETERS-KENNEDY et al., 2019; De PAOLIS et al., 2022; TURCO et al., 2023), três do papilomavírus da espécie *Equus asinus* (EaPV 1, EaPV 2 e EaPV 3) (LECIS et al., 2014; IKECHUKWU et al., 2024); e três tipos de papilomavírus bovino (BPV 1, BPV 2 e BPV 13) (MARTENS et al., 2001; LUNARDI et al., 2013; MUNDAY et al., 2021).

Nos equinos, os EcPVs estão associados a ocorrência de papilomatose genital e generalizada, placas auriculares, placas genitais e massas penianas (LANGE et al., 2011; LANGE et al., 2013; TANIWAKI et al., 2013; TORRES et al., 2013; DONG et al., 2017; LINDER et al., 2018; BROMBERGER et al., 2023). Também foram identificados em lesões proliferativas benignas em equinos jovens (POSTEY et al., 2007), em carcinomas de células escamosas (ALLOWAY et al., 2020; TUOMISTO et al., 2024), no sêmen de equinos com lesões penianas, em animais inférteis e assintomáticos (DE PAOLIS et al., 2022; TURCO et al., 2023). Além da infecção pelo BPV diretamente relacionada a etiologia do sarcoide (TAYLOR & HALDORSON, 2013; CHRISTEN et al., 2014; ALCÂNTARA et al., 2015; KNOTTENBELT et al., 2015; ZAHRA et al., 2019).

2.4 Sarcoide

Os sarcoides são neoplasias cutâneas frequentemente identificadas em

equinos (MACLACHLAN & DUBOVI, 2017; MUNDAY et al., 2021; HOIKHMAN et al., 2023). São tumores fibroblásticos benignos, de caráter invasivo e localmente agressivo com alta taxa de recorrência mesmo após instituição de medidas terapêuticas (PLUMMER, 2005; POSTEY et al., 2007; HOLLIS, 2024).

A ocorrência do sarcoide é frequentemente relacionada a histórico anterior de traumas com indícios da transmissão para outros animais ou expansão para outras áreas do corpo por meio de fricção, mordidas, fômites e insetos, principalmente moscas responsáveis por disseminar o DNA viral do BPV, relacionado ao desenvolvimento dos sarcoides (SCOTT & MILLER, 2011). São encontrados em qualquer região do corpo dos equinos de forma única ou múltipla, mas são mais frequentes em região de cabeça, abdômen, membros e em áreas de cicatrizes (SCOTT & MILLER, 2011; MACLACHLAN & DUBOVI, 2017; ZAHRA et al., 2019).

Os sarcoides podem ser classificados de acordo a sua apresentação clínica em: oculto, verrucoso, nodular, fibroblástico, misto e maligno (SCOTT & MILLER, 2011; HOIKHMAN et al., 2023). Os sarcoides do tipo verrucoso, apresentam intensa hiperplasia da epiderme com queratinização acentuada, podendo se assemelhar a papilomas equinos, no entanto, a regressão espontânea raramente é observada nos sarcoides (POSTEY et al., 2007). O tipo fibroblástico é circunscrito, semelhantes a tecido de granulação, devido a proliferação elevada de fibroblastos e colágeno (SCOTT & MILLER, 2011). Já o oculto, consiste em massas nodulares de variados tamanhos no tecido subcutâneo, formadas por intensa proliferação de fibroblastos e colágeno; enquanto o tipo misto, apresenta combinação entre todas as outras formas (TAYLOR & HALDORSON, 2013; ZAHRA et al., 2019).

Quanto a etiologia dos sarcoides, inúmeros fatores são atribuídos ao desenvolvimento neoplásico, contudo os BPV 1, 2 e 13 têm sido reconhecidos como o fator etiológico mais importante (LUNARDI et al., 2013; CHRISTEN et al., 2014; KNOTTENBELT et al., 2015; ZAHRA et al., 2019; HOLLIS, 2024).

Embora os BPVs sejam relacionados a maioria dos casos de sarcoide equino (SCASE et al., 2010; CHRISTEN et al., 2014; GAYNOR et al., 2015, HOIKHMAN et al., 2023), outros agentes podem estar envolvidos no desenvolvimento dessas lesões. Devido ao fato de que em trabalhos recentes, o EcPV 2 (MUNDAY et al., 2021) e o OaPV (1, 3 e 4) (De FALCO et al., 2024)

foram identificados em amostras de sarcoide na espécie equina.

2.5 Carcinomas de células escamosas

Das neoplasias de pele que acometem os equinos, o CCE é a segunda mais frequente (HIBI et al., 2019; HOLLIS 2024). É uma neoplasia localmente invasiva e de crescimento lento, identificadas principalmente em áreas de pele despigmentada e junções mucocutâneas, como região ocular e genitália externa (YAMASHITA-KAWANISHI et al., 2021; TURA et al., 2022; TUOMISTO et al., 2024). Contudo podem estar presentes em regiões de cavidade oral, plano nasal e tecido gástrico (MORRISON et al., 2019; ALLOWAY et al., 2020; PORCELLATO et al., 2020).

Nos estágios iniciais, os CCE podem se apresentar como placas esbranquiçadas que dão origem a pequenas úlceras granuladas que não cicatrizam. Essas úlceras progridem lentamente para a formação de massas proliferativas semelhantes a couve-flor (SYKORA & BRANDT, 2017; MORRISON et al., 2019). A metástase é comum, entretanto ocorre de forma lenta e em sua maioria como consequência aos diagnósticos tardios ou ausência da instituição de medidas de tratamento das lesões (SCOTT & MILLER, 2011; HOLLIS, 2024).

O CCE acomete qualquer espécie, com maior ocorrência em animais mais velhos, sendo identificado em equinos com idades de 10 a 20 anos (HOLLIS, 2024). A prevalência dos casos é relacionada com animais de pele e pelo despigmentados (TURA et al., 2022; TUOMISTO et al., 2024) e expostos a elevada incidência de luz solar. Contudo, lesões crônicas, predisposição genética e a presença do papilomavírus equino são fatores associados a etiologia do CCE (SCOTT & MILLER, 2011; TURA et al., 2022; HOLLIS, 2024).

Nos humanos, nos cães e nos gatos, os papilomavírus têm um papel etiológico reconhecido (CALLAN et al., 2005; VILLAGÓMEZ-ORTÍZ et al., 2016; VASCELLARI et al., 2019; MELO et al., 2020). Nos equinos, a infecção pelo EcPV 2 tem sido reconhecida como um dos principais fatores associados a ocorrência dos CCE em região gástrica (HIBI et al., 2019; ALLOWAY et al., 2020; PORCELLATO et al., 2020), genital (YAMASHITA-KAWANISHI et al., 2021; TURA et al., 2022) e ocular (TUOMISTO et al., 2024). Além do tipo 2, outros estudos evidenciaram a presença dos EcPV 4, 7 e 8 nessas lesões (PETERS-

KENNEDY et al., 2019; PETERS-KENNEDY et al., 2020; MUNDAY et al., 2024), demonstrando uma possível participação desses agentes no desenvolvimento dessa neoplasia.

3. REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, B. K.; ALFIERI, A. A.; HEADLEY, S. A.; RODRIGUES, W. B.; OTONEL, R. A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Caracterização molecular de DNA do papilomavírus Delta bovino (BPV 1, 2 e 13) em sarcoides equinos. *Pesqui. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 35, p. 431-436, 2015.

ALFIERI, A.; WOSIACKI, S. R.; ALFIERI, A. F. *Papillomaviridae*. In: FLÔRES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. cap.16, p. 397-412.

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. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 57, n. 3, p. 427-431, 2020.

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: asystematic review. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 40, n. 1, p. 1-21, 2017.

BROMBERGER, C. R.; COSTA, J. R.; HERMAN, M.; HERNANDEZ, J. M.; ALBERTINO, L. G.; ALVES, C. E. F.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P. Detection of *Equus caballus Papillomavirus* in equine aural plaque samples. *J. Equine Vet. Sci.*, New York, v. 128, p. 104877-104877, 2023.

CALLAN, M. B.; PREZIOSI, D.; MAULDIN, E. Multiple papillomavirus-associated epidermal hamartomas and squamous cell carcinomas in situ in a dog following chronic treatment with prednisone and cyclosporine. *Vet. Dermatol.*, Oxford, v. 16, n. 5, p. 338-345, 2005.

CARVALHO, F. K. L.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; ANDRADE, R. L. F. S.; NÓBREGA NETO, P. I.; MIRANDA NETO, E. G. Estudo retrospectivo das neoplasias em ruminantes e equídeos no semiárido do Nordeste brasileiro. *Pesqui. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 211-216, 2014.

CHRISTEN, G.; GERBER, V.; DOLF, G.; BURGER, D.; KOCH, C. Inheritance of equine sarcoid disease in Franches-Montagnes horses. *Vet. J.*, London, v. 199, n. 1, p. 68-71, 2014.

CLAUS, M. P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; SARTORI, D.; FUNGARO, M. H. P.; ALFIERI, A. A. Identification of the recently described new type of bovine papillomavirus (BPV-8) in a Brazilian beef cattle herd. *Pesqui. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 25-28, 2009.

DE PAOLIS, L.; DE CIUCIS, C. G.; PELETTI, S.; CAPPELLI, K.; MECOCCHI, S.; NERVO, T. *Equus caballus* papillomavirus Type-9 (EcPV9): first detection in asymptomatic Italian horses. *Viruses*, Basel, v.14, p. 2050, 2022.

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

DE FALCO, F.; CUTARELLI, A.; PELLICANÒ, R.; BRANDT, S.; ROPERTO, S. Molecular detection and quantification of Ovine Papillomavirus DNA in equine sarcoid. *Transbound. Emerg. Dis.*, Berlin, p.1-9, 2024.

DONG, J.; ZHU, W.; YAMASHITA, N.; CHAMBERG, J. K.; UCHIDA, K.; KUWANO, A.; GAYNOR, A. M.; ZHU, K. W.; DELA-CRUZ, F. N. J. R.; AFFOLTER, V. K.; PESAVENTO, P. A. Localization of bovine Papillomavirus nucleic acid in equine sarcoids. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 53, n. 3, p. 567-73, 2016.

GHIM, S. J.; RECTOR, A.; DELIUS, H.; SUNDBERG, J. P.; JENSON, A. B.; VAN RANST, M. Equine papillomavirus type1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV1 L1 major capsid protein. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, New York, v. 324, p. 1108-1115, 2004.

HASPELAGH, M.; VLAMINCK, L.; MARTENS, A. The possible role of *Stomoxys calcitrans* in equine sarcoid transmission. *Vet. J.*, London, v. 231, p. 8-12, 2018.

HAGA, T. Isolation of equine papillomavirus type1 from racing horse in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, Tokyo, v. 72, n. 12, p. 1957-1959, 2017.

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.*, Tokyo, v. 81, p. 1029-1033, 2019.

HOIKHMAN, R.; MOLINKOVÁ, D.; PILLÁROVÁ, D.; LINHART, P.; KOPECKÁ, A.; JAHN, P. The serological detection of Bovine papillomavirus's E5 oncoprotein antibodies in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v. 262, p. 110633, 2023.

HOLLIS, A. R. Squamous cell carcinomas in horses: an update of the etiopathogenesis and treatment options. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 421-430, 2024.

HOPPE-SEYLER, K.; BOSSLER, F.; BRAUN, J. A.; HERRMANN, A. L.; HOPPE-SEYLER, F. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. *Trends Microbiol.*, Cambridge, v. 26, n. 2, p. 158-168, 2017.

IKECHUKWU, C. K.; QIN, K.; ZHANG, H.; PAN, J.; ZHANG, W. Novel equid papillomavirus from domestic donkey. *Equine Vet. J.*, Newmarket, v. 56, n. 1, p. 171-177, 2024.

JONES, S. E. Papillomaviruses in equids: A decade of discovery and more to come. *Equine Vet. Educ.*, Newmarket, v. 34, n. 5, p. 236-240, 2022.

KAYNARCALIDAN, O.; OGUZOGLU, T.C. The oncogenic pathways of papillomaviruses. *Vet. Comp. Oncol.*, Oxford, v. 19, p. 7-16, 2021.

KELESIDIS, T.; AISH, L.; STELLER, M. A.; AISH, I. S.; SHEN, J.; FOUKAS, P.; PANAYIOTIDES, J.; PETRIKKOS, G.; KARAKITSOS, P.; TSIODRAS, S. Human papillomavirus (HPV) detection using in situ hybridization in histologic samples. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, v. 136, n. 1, p. 119-127, 2011.

KNOTTENBELT, D. C.; SNALUNE, K.; KANE, J. P. *Clinical equine oncology*. Edinburgh: Elsevier, 2015.

LANGE, C. E.; TOBLER, K.; ACKERMANN, M.; FAVROT, C. Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, 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. *J. Gen. Virol.*, London, v. 94, p. 1365-1372, 2013.

LECIS, R.; TORE, G.; SCAGLIARINI, A.; ANTUOFERMO, E.; DEDOLA, C.; CACCIOTTO, C.; DORE, G. M.; CORADDUZZA, E.; GALLINA, M.; BATTILANI, M.; ANFOSSI, A. G.; MUZZEDDU, M.; CHESSA, B.; PITTAU, S. R.; ALBERTI, A. *Equus asinus* papillomavirus (EaPV1) provides new insights into equine papillomavirus diversity. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v. 170, n. 3-4, p. 213-223, 2014.

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*, Basel, v. 11, p. 713, 2019.

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). *Vet. Dermatol.*, Oxford, v. 29, p. 72-e300, 2018.

LUFF, J.; WEINGART, S.; MAY, S.; MURPHY, B. A subset of equine oral squamous cell carcinomas is associated with *Equus caballus* papillomavirus 2 infection. *J. Comp. Pathol.*, London, v. 205, p. 1-6, 2023.

LUNARDI, M.; DE ALCÂNTARA, B. K.; OTONEL, R. A. A.; RODRIGUES, W. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 51, n. 7, p. 2167-2171, 2013.

MIRA, J.; HERMAN, M.; ZAKIA, L. S.; OLIVO, G.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P. Frequency of *Equus caballus* papillomavirus in equine aural plaques. *J. Vet. Diagn. Invest.*, Thousand Oaks, v. 30, n. 4, p. 565-568, 2018.

MACLACHLAN, J.; DUBOVI, E. J. *Fenner's veterinary virology*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2017.

MELO, B. A. C.; VILAR, L. G.; OLIVEIRA, N. R.; LIMA, P. O.; PINHEIRO, M. B.; DOMINGUETI, C. P.; PEREIRA, M. Human papillomavirus infection and oral squamous cell carcinoma - a systematic review. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, São Paulo, v. 87, n. 3, p. 346–352, 2020.

MORRISON, M. L.; GROOVER, E.; SCHUMACHER, J.; NEWTON, J.; PEREIRA, M. M. Lingual squamous cell carcinoma in two horses. *J. Equine Vet. Sci.*, New York, v. 79, p. 35-38, 2019.

MUNDAY, J. S.; ORBELL, G.; FAIRLEY, R. A.; HARDCASTLE, M.; VAATSTRA, B. Evidence from a series of 104 equine sarcoids suggests that most sarcoids in New Zealand are caused by bovine Papillomavirus type 2, although both BPV1 and BPV2 DNA are detectable in around 10% of sarcoids. *Animals*, Basel, v. 11, n. 11, p. 3093, 2021.

MUNDAY, J. S.; KNIGHT, C. G.; BODAAN, C. J.; CODACCIONI, C.; HARDCASTLE, M. R. *Equus caballus* papillomavirus type 7 is a rare cause of equine penile squamous cell carcinomas. *Vet. J.*, London, v. 306, p. 106155, 2024.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; BANDIAL, P. R.; CUNHA, P. H. J.; CRUZ, T. F.; ARAÚJO JÚNIOR, 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.*, Amsterdam, v. 135, p. 34-42, 2010.

PETERS-KENNEDY, J.; LANGE, C. E.; ORTVED, K. Progression of aural plaques to squamous cell carcinoma in a horse. *Vet. Dermatol.*, Oxford, v. 31, p. 397-e106, 2020.

PETERS-KENNEDY, J.; LANGE, C. E.; RINES, L.; HACKETT, R. P. *Equus caballus* papillomavirus 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse. *Equine Vet. J.*, Newmarket, v. 51, p. 470-474, 2019.

PLUMMER, C. E. Equine eyelid disease. *Clin. Tech. Equine Pract.*, Amsterdam, v. 4, p. 95-105, 2005.

PORCELLATO, I.; MODESTO, P.; CAPPELLI, K.; VARELLO, K.; PELETTO, S.; BRACHELENTE, C. *Equus caballus* papillomavirus type 2 (EcPV2) in co-occurring vulvar and gastric lesions of a pony. *Res. Vet. Sci.*, Oxford, v. 132, p. 167-171, 2020.

POSTEY, R. C.; APPELYARD, 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.*, Ottawa, v. 71, p. 28-33, 2007.

RAMSAUER, A.S.; KUBACKI, J.; FAVROT, C.; ACKERMANN, M.; FRAEFEL, C.; TOBLER, K. RNA-seq analysis in equine papillomavirus type 2-positive carcinomas identifies affected pathways and potential cancer markers as well as viral gene expression and splicing events. *J. Gen. Virol.*, London, v. 100, n. 6, p. 985-998, 2019.

RODRIGUES, G. G.; ALVES, D. S.; BROMBERGER, C. R.; NOMELINI, Q. S. S.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; DELFIOL, D. J. Z. Clinical and epidemiological aspects in equine aural plaques. *Vet. Res. Commun.*, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 1, 2024.

SCASE, T.; BRANDT, S.; KAINZBAUER, C.; SYKORA, S.; BIJMHOLT, S.; HUGHES, K. *Equus caballus* papillomavirus-2 (EcPV-2): an infectious cause for equine genital cancer?: EcPV-2 in equine genital lesions. *Equine Vet. J.*, Newmarket, v. 42, n. 8, p. 738-745, 2010.

SCHELLENBACHER, C.; SHAFTI-KERAMAT, S.; HUBER, B.; FINKD.; 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*, New York, v. 486, p. 284-290, 2015.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. *Equine dermatology*. 2nd ed. Maryland Heights: Saunders, 2011.

SOUSA, N. R.; ADORNO, V. B.; MARCONDES, J. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; CONCEIÇÃO, L. G.; AMORIM, R. L.; BORGES, A. S. Clinical and histopathological characteristics of the aural plaque in Mangalarga and Quarter Horses. *Pesqui. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 6, p. 279-284, 2008.

SYKORA, S.; BRANDT S. Papillomavirus infection and squamous cell carcinoma in horses. *Vet. J.*, London, v. 223, p. 48-54, 2017.

SYKORA, S.; SAMEK, L.; SCHÖNTHALER, K.; PALM, F.; BORZACCHIELLO, G.; AURICH, C.; BRANDT, S. EcPV-2 is transcriptionally active in equine SCC but only rarely detectable in swabs and semen from healthy horses. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v. 158, n. 2, p. 194-198, 2012.

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

TAYLOR, S.; HALDORSON, G. A review of equine sarcoid: equine cutaneous tumours. *Equine Vet. Educ.*, Hoboken, v. 25, n. 4, p. 210-216, 2013.

TORRES, S. M. F.; KOCH, S. N. Papillomavirus-associated diseases. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, Philadelphia, v. 29, p. 643-655, 2013.

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. *Vet. Dermatol.*, Oxford, v. 21, p. 503-509, 2010.

TUOMISTO, L.; VIRTANEN, J.; KEGLER, K.; LEVANOV, L.; SUKURA, A.; SIRONEN T. *Equus caballus* papillomavirus type 2 (EcPV2) associated benign penile lesions and squamous cell carcinomas. *Vet. Med. Sci.*, Tokyo, v. 10, n. 1, p. e1342, 2024.

TURCO, S.; GABBIANELLI, F.; MAVIAN, C. N.; PIETRUCCHI, D.; DE PAOLIS, L.; GIALLETTI, R. Genetic characterization of a novel *Equus caballus* Papillomavirus isolated from a thoroughbred mare. *Viruses*, Basel, v. 15, n. 3, p. 650, 2023.

VASCELLARI, M.; MAZZEI, M.; ZANARDELLO, C.; MELCHIOTTI, E.; ALBANESE, F.; FORZAN, M.; CROCE, M. F.; ALBERTI, A.; ABRAMO, F. *Felis catus* papillomavirus types 1, 2, 3, 4, and 5 in feline bowenoid in situ carcinoma: an in situ hybridization study. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 56, n. 6, p. 818-825, 2019.

VILLAGÓMEZ-ORTÍZ, V. J.; PAZ-DELGADILLO, D. E.; MARINO-MARTÍNEZ, I.; CESEÑAS-FALCÓN, L. Á.; SANDOVAL DE LA FUENTE, A.; REYES-ESCOBEDO, A. Prevalencia de infección por virus del papiloma humano en carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe. *Cir. Cir.*, México, v. 84, n. 5, p. 363–368, 2016.

YAMASHITA-KAWANISHI, N.; ITO, S.; CHAMBERS, J. K.; UCHIDA, K.; SATO, M.; CHANG, H. W.; KNIGHT, C.; VAN DER MEER, F.; HAGA, T. Vulvar squamous cell carcinoma associated with *Equus caballus* papillomavirus type 2 infection in a Japanese mare. *Tumour Virus Res.*, Amsterdam, v. 12, p. 200226, 2021.

XAVIER, S.; TORRES, P.; LANCELLOTTI, P. Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 510–519, 2005.

ZAHRA, S.; AHMED, H.; KORRITUM, A.; ELKHENANY, H.; KHALIFA, H. Equine sarcoids: Distribution sites, common types, and diagnosis. *Alex. J. Vet. Sci.*, Alexandria, v. 60, n. 1, p. 123, 2019.

ZAKIA, L. S.; BASSO, R. M.; OLIVO, G.; HERMAN, M.; ARAUJO JÚNIOR, 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.*, Belo Horizonte, v. 67, n. 4, p. 1193-1196, 2015.

CAPÍTULO II

Trabalho científico

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

Original Research:

Detection of EcPV and BPV DNA in samples of squamous cell carcinoma and sarcoid in horses.

ABSTRACT:

Equus caballus papillomavirus (EcPV) has been associated with several neoplasms in horses, such as classic and genital papillomatosis, squamous cell carcinoma (SCC), and aural plaque. Since EcPV 2, 4, 7, and 9 are associated with genital and penile neoplastic lesions in horses and bovine papillomaviruses (BPV) are involved in the etiology of equine sarcoid, this study aimed to identify the presence of EcPV in samples of squamous cell carcinoma (SCC) and sarcoids in horses by PCR. Fifty sarcoid samples and 26 SCC samples were evaluated, distributed between fresh tissue and FFPE samples, all with confirmatory diagnoses performed via histopathology and tested for the presence of BPV by PCR. BPV 1 and 2 DNA was identified in 60% (30/50), of these, 57% (17/30) were positive for BPV 1 DNA, while 37% (11/30) were positive for BPV 2, with co-detection occurring in 6% (2/30) of sarcoid samples. While EcPV were present in 54% (14/26) of SCC and 6% (2/50) of sarcoids evaluated, confirmed by sequencing. Only EcPV 1 (14%, 2/14) and EcPV 2 (86%, 12/14) were detected in SCC samples, while only EcPV 1 was identified in sarcoids (100% 2/2). EcPV 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 were not identified in any sample evaluated. Thus, the results suggest that in addition to EcPV 2, type 1 may be a possible agent involved in SCC and sarcoid cases in horses. Enlightenment of the agents involved is essential to direct preventive measures and more effective control of these diseases.

Keywords: horse, sarcoid, carcinoma, PCR, papillomavirus.

1. Introduction

Among the skin tumors that affect horses, squamous cell carcinomas (SCCs) and sarcoids are the most common [1,2]. Even though they are common neoplasms, the agents involved, and the mechanisms related to their development are not fully understood [1]. Among the related factors, sun exposure, chronic inflammation, genetic predisposition, and the presence of papillomavirus, which play considerable roles in the formation of these lesions, are the most described [3-5]. Infection by *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) 2 is the main factor related to the process of SCC formation in the gastric [6,7], genital [8,9] and ocular [10] regions. In addition, EcPV 7 is related to the formation of SCCs in the penile and oropharyngeal regions of horses [11]. The presence of BPV DNA in sample of sarcoid is considered the main factor contributing to neoplastic development in this species [2,12].

To date, 16 types of papillomaviruses that infect horses and mules have been described, including three types of *Bos taurus papillomavirus* (BPV 1, BPV 2, and BPV 13) [2, 12-13], three types of *Equus asinus papillomavirus* (EaPV1, EaPV2, and EaPV3) [14,15], and ten types of *Equus caballus papillomavirus* (EcPV1 to EcPV10) [16-19].

In horses, EcPV are associated with the occurrence of genital and generalized papillomatosis, aural plaque, genital plaques, and penile masses [20-26], benign proliferative lesions in young horses [27], squamous cell carcinomas [6,10], and in the semen of horses with penile lesions, infertile and asymptomatic [18,19]. Owing to the high prevalence of EcPV in several neoplasm and the fact that SCC and sarcoid are the two main neoplasms observed in horses, this study aimed to identify the presence of BPV 1 and 2, and EcPV 1 to 10 in SCC samples and sarcoid samples from fresh tissue (biopsies) and formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Committee approval

This study was approved on December 5, 2022, by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of FMVZ/Unesp (CEUA Protocol 0265/2022).

2.2. Sample selection and DNA extraction

To assess the presence of BPVs and EcPV, 50 sarcoid samples and 26 SCC samples were distributed between fresh tissue and FFPE samples (Table 1). The samples had their respective diagnoses confirmed by histopathological evaluation. The fresh tissue samples were collected from horses from the state of São Paulo and stored by the Molecular Biology Laboratory of the Veterinary Clinics of the São Paulo State University/Brazil (LBMCV-UNESP) and kept at -80 °C. The FFPE samples were provided by the Service of Veterinary Pathology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

For fresh tissue samples, DNA was extracted from 20 mg of each sample via the GenElute™-E Single Spin Tissue DNA Kit (Promega Corporation, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions. While each block of paraffin samples was cut into 10 “slices” with 5 µm thickness each, and DNA extraction was performed using the RetalialPrep™ FFPE gDNA Miniprep System Kit (Promega Corporation, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions. The microtome blade was changed and the equipment was cleaned to avoid DNA cross-contamination. The DNA purity and concentration were determined using the Nanodrop (Thermo Scientific) by calculating the A260:A280 and A260:A230 ratios and stored at – 20°C until PCR was performed.

2.3. PCR procedures

The primers used to detect de EcPV e BPV DNA were previously described (Table 2). The PCR mixture final volume 25µL contained 12.5 µL of the GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA), 0.7 µL of each of the forward and reverse primers corresponding for each viral type (Table 2), 8.6 µL of nuclease-free water and 2.5 µL of DNA from each sample. To verify the presence of amplifiable DNA, PCR using equine *β-actin* gene primers was also performed for all samples [28]. The PCR products were analyzed by 1.5%

agarose gel electrophoresis. Synthetic mini-genes previously described [26,27] were used as PCR positive controls for undetected EcPV.

3. Results

Bovine papillomavirus (BPV) DNA was identified in 60% (30/50) of the sarcoid samples evaluated. Of these, 57% (17/30) were positive for BPV 1 DNA, while 37% (11/30) were positive for BPV 2, with co-detection occurring in 6% (2/30) of the samples evaluated. Regarding the location of the lesions, there was no specificity of the viral type regarding the affected areas (Table 3). In CCE samples, BPV DNA was not detected.

EcPV were identified in 54% (14/26) of the SCC samples and in 4% (2/50) of the sarcoids evaluated in the present study. Among the positive samples, the presence of EcPV 1 (14%, 2/14) and EcPV 2 (86%, 12/14) DNA was detected in the SCC samples, whereas only EcPV 1 was detected in the positive sarcoid samples. EcPV 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 were not found in any of the samples evaluated.

According to the locations of the lesions (Table 4). EcPV 1 was identified in SCC samples from the ocular region (2/14), whereas EcPV 2 was identified in samples from the vulvar (4/14), ocular (4/14), penile (2/14), nasal plane (1/14), and anal (1/14) regions. For the sarcoid samples, EcPV 1 was identified only in lesions in the inguinal region (2/2).

The β -actin gene was amplified in all samples, confirming the presence of amplifiable DNA in these samples and all mini-genes used as positive controls were detected in all assays, showing that the PCR was adequately standardized.

4. Discussion

The papillomaviruses play an important role in the development of neoplasias in humans and animals [5,29]. In recent years, there has been a considerable increase in the number of papillomaviruses identified, as well as in pathologies related to the presence of viral DNA in horses [15-19,29,30]. SCC and sarcoid

are the two main cutaneous neoplasms in the equine species [1,2,9], both of which are related to the presence of papillomavirus [4,5,17,19].

Using molecular techniques, BPV DNA was identified in 86–100% of equine sarcoid samples evaluated [13,29,31]. However, unlike these values, the results obtained in this study, BPV were detected in only 60% (30/50) of sarcoid samples. Bovine papillomavirus (BPV) plays a significant role in the etiology and pathogenesis of equine sarcoid [2,13,29]. However, the presence of BPV viral DNA alone in the skin of hosts is not necessarily sufficient to induce the formation of neoplastic masses [31]. Other factors, alone or associated with BPV, are correlated with the development of this neoplasia, such as cases of previous traumatic injuries, immune status and genetic predisposition of the host [13,32,33], which could justify the percentage of cases found in this study.

However, other agents may be related to a possible association with equine sarcoid. In this study, EcPV 1 DNA was also identified in sarcoid samples from lesions in the inguinal region. The presence of BPV DNA is associated with its direct involvement in the etiology of sarcoids. Previously, only BPV 1 and 2 were related to sarcoids in horses; however, some studies identified the presence of BPV 13 [13], EcPV 2 [34] and OaPV 1, 3 and 4 [35] in these lesions.

Regarding the distribution of types of BPV, it is noted that there appear to be regional differences in their occurrence. In North America and New Zealand most sarcoids are caused by BPV 2, whereas in Europe, Japan and Australia appear to be caused mainly by BPV 1 [2,29]. Similar to these latest studies, sarcoid samples were positive mainly for BPV 1 DNA in the present study. One of the main justifications for this regional difference involves the predominance of BPV that infect cattle in each location, as cattle are frequently infected with several types of BPV [29,33]. What are the cases of the presence of BPV 13 in equine sarcoids in Brazil [13] that have not been detected in other countries. This variant was not evaluated in this research and will possibly be described in future work.

Among the SCC samples analyzed in this study, the presence of EcPV 2 was confirmed in 86% (12/14) of the samples, which is in agreement with studies in which it was possible to demonstrate the close relationship of this viral type with

the occurrence of SCC in horses [4,6-10,36,37]. Although EcPV 2 is well recognized in the etiology of SCC, in some studies, it has not been identified [11], which may be related to the multifactorial etiology of the neoplasia, as well as the possible involvement of other viral types in its development [38,39]. Posteriorly, few studies have investigated the occurrence of other viral types in SCC patients. In research carried out by Kainzbauer and collaborators [38], it was possible to identify the association of BPV 1 with EcPV 2 in an SCC of the ocular region of a pony, and more recently, the presence of EcPV 7 was confirmed in a penile squamous cell carcinoma by Munday and collaborators [14].

The presence of other viral types in SCC samples justifies the findings of this study, where only the presence of EcPV 1 was detected in two SCC samples from the ocular region. The absence of coinfection with EcPV 2 in these cases differs from that described by Kainzbauer and collaborators [38], which suggests a possible direct action of the virus in triggering neoplasia. The presence of EcPV 1 in these samples can be explained by the SCC development mechanism. In general, EcPV 1 is frequently related to cases of generalized and cutaneous papillomas in equines [40]; however, papillomatous lesions can trigger the formation of SCC, which would justify the presence of EcPV 1 in these samples [24,39].

EcPV 1 is frequently associated with cases of classical papillomatosis [41] and aural plaque in equine species [25,26,41,42]. To date, no other reports of EcPV-1 involvement with other neoplasms in this species have been published. The presence of EcPV1 in the SCC and sarcoid samples identified in this work reinforces the idea that other agents are associated with the etiology of this neoplasia [11,13,34,35,38], but further research is needed to elucidate this phenomenon better.

5. Conclusion

The results suggest that, in addition to EcPV 2, EcPV 1 may be a possible agent involved in cases of SCC and sarcoid in horses. EcPV 2 is frequent in samples of SCCs from the ocular, oral, and genital regions of horses. The presence of EcPV 1 in the SCC of the ocular region and sarcoids in the groin region suggests

that it may influence the formation of these neoplasms, but further research is needed to confirm this statement.

The detection of EcPV 3 to 10, was not observed in any of the samples evaluated. Clarification of the agents involved in neoplasms is essential for determining preventive measures, especially those related to the immunization of animals.

Conflict of interest statement

No competing interests have been declared.

Acknowledgments

This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil), grant numbers 21/10987-3, 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).

References

- [1] S. Sykora, S. Brandt, Papillomavirus infection and squamous cell carcinoma in horses, *Vet. J.* 223 (2017) 48 – 54. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.05.007>.
- [2] BK de Alcântara, AA Alfieri, AS Headley, WB Rodrigues, RAA Otonel, M. Lunardi, AF, Alfieri, Caracterização molecular de DNA do papilomavírus Delta bovino (BPV 1, 2 e 13) em sarcoides equinos, *Pesq. Vet. Bras.* 35 (2015) 431 – 6. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000500007>.
- [3] S. Sykora, L. Samek, K. Schönthaler, F. Palm, G. Borzacchiello, C. Aurich, S. Brandt, Ecpv-2 Is transcriptionally active in equine SCC but only rarely detectable in swabs and semen from healthy horses, *Vet. Microbiol.* 158 (2012) 194 – 198. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.006>.
- [4] CG Knight, M. Dunowska, JS Munday, J. Peters-Kennedy, BV Rosa, Comparison of the levels of Equus caballus papillomavirus type 2 (EcPV-2) DNA in equine squamous cell carcinomas and non-cancerous tissues using quantitative PCR, *Vet. Microbiol.* 166 (2013) 257 – 262. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.004>.

- [5] JS Munday, CG Knight, JA Luff, Papillomaviral skin diseases of humans, dogs, cats and horses: A comparative review. Part 2: Preneoplastic and neoplastic diseases, *Vet. J.* 288 (2022) 105898. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105897>.
- [6] E. Alloway, K. Linder, S. May, T. Rose, J. DeLay, S. Bender, A. Tucker, J. Luff A subset of equine gastric squamous cell carcinomas is associated with *Equus caballus* Papillomavirus-2 infection, *Vet. Pathol.* 57 (2020) 427 – 431. <https://doi.org/10.1177/0300985820908797>.
- [7] I. Porcellato, P. Modesto, K. Cappelli, K. Varello, S. Peletto, C. Brachelente, I. Martini, L. Mechelli, A. Ferrari, A. Ghelardi, E. Razzuoli, *Equus caballus* papillomavirus type 2 (EcPV2) in co-occurring vulvar and gastric lesions of a pony, *Res. Vet. Sci.* 132 (2020) 167 – 171. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.003>.
- [8] N. Yamashita-Kawanishi, S. Ito, JK Chambers, K. Uchida, M. Sato, HW Chang, C. Knight, F. van der Meer, T. Haga, Vulvar squamous cell carcinoma associated with *Equus caballus* papillomavirus type 2 infection in a Japanese mare. *Tumor Virus. Res.* 12 (2021) 200226. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200226>.
- [9] G. Tura, B. Brunetti, L. Ressel, A. Kapetanou, B. Bacci, EcPV2 IN-SITU hybridization and expression of cell cycle proteins P53 and CDKN2A in equine squamous cell carcinomas, *J. Comp. Pathol.* 191 (2022) 16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.11.037>
- [10] L. Tuomisto, J. Virtanen, K. Kegler, L. Levanov, A. Sukura, T. Sironen, M. Kareskoski, 2024. *Equus caballus* papillomavirus type 2 (EcPV2) associated benign penile lesions and squamous cell carcinomas. *Vet. Med. Sci.* e1342. <https://doi.org/10.1002/vms3.1342>.
- [11] JS Munday, CG Knight, CJ Bodaan, C. Codaccioni, MR Hardcastle, *Equus caballus* papillomavirus Type 7 is a rare cause of equine penile squamous cell carcinomas, *Vet. J.* 306 (2024) 106155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106155>.
- [12] A. Martens, A. de Moor, R. Ducatelle, PCR detection of bovine papilloma virus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids, *Vet. J.* 161 (2001) 280 – 286. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0524>.

- [13] M. Lunardi, BK de Alcântara, RAA Otonel, WB Rodrigues, AF Alfieri, AA Alfieri, Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 2167–2171. <https://doi.org/10.1128/jcm.00371-13>.
- [14] R. Lecis, G. Tore, A. Scagliarini, E. Antuofermo, C. Dedola, C. Cacciotto, GM Dore, E. Coradduzza, M. Gallina, M. Battilani, AG Anfossi, M. Muzzeddu, B. Chessa, SR Pittau, A. Alberti, *Equus asinus* papillomavirus (EaPV1) provides new insights into equine papillomavirus diversity, *Vet. Microbiol.* 170 (2014) 213 – 223. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.016>.
- [14] CK Ikechukwu, K. Qin, H. Zhang, J. Pan, W. Zhang, Novel equid papillomavirus from domestic donkey, *Equine Vet. J.* 56 (2024) 171 – 177. <https://doi.org/10.1111/evj.13957>.
- [16] C-X Li, W-S Chang, K. Mitsakos, J. Rodger, EC Holmes, BJ Hudson, Identification of a novel equine Papillomavirus in semen from a thoroughbred stallion with a penile lesion, *Viruses* 11 (2019) 713. <https://doi.org/10.3390/v11080713>.
- [17] J. Peters-Kennedy, CE Lange, SL Rine, RP Hackett, *Equus caballus* papillomavirus 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse, *Equine Vet. J.* 51 (2019) 470 – 474. <https://doi.org/10.1111/evj.13046>.
- [18] L. de Paolis, CG de Ciucis CG, S. Peletto, K. Cappelli, S. Mecocci, T. Nervo, L. Guardone, MI Crescio, D. Pietrucci, F. Fruscione, F. Gabbianelli, S. Turco, K. Varello, GG Donato, C. Maurella, P. Modesto, M.G. Maniaci, G. Chillemi, A. Ghelardi, E. Razzuoli, *Equus caballus* papillomavirus type-9 (EcPV9): First detection in asymptomatic Italian horses, *Viruses* 14 (2022) 2050. <https://doi.org/10.3390/v14092050>.
- [19] S. Turco, F. Gabbianelli, CN Mavian, D. Pietrucci, L. de Paolis, R. Gialletti, L. Mechelli, CG Ciucis, K. Cappelli, F. Dell'Anno, S. Mecocci, GG Donato, T. Nervo, F. Fruscione, MI Crescio, A. Ghelardi, G. Chillemi, E. Razzuoli, Genetic characterization of a novel *Equus caballus* Papillomavirus isolated from a thoroughbred mare, *Viruses* 15 (2023) 650. <https://doi.org/10.3390/v15030650>.
- [20] CE Lange, K. Tobler, M. Ackermann, C. Favrot, Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster, *Vet. Microbiol.* 149 (2011) 85 – 90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.019>.

- [21] CE Lange, E. Vetsch, M. Ackermann, C. Favrot, K. Tobler, Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses, *J. Gen. Virol.* 94 (2013) 1365 – 1372. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052092-0>.
- [22] SMF Torres, SN Koch, Papillomavirus-Associated Diseases, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 29 (2013) 643 – 655. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2013.08.003>.
- [22] SA Taniwaki, AJ Magro, AC Gorino, JP Oliveira-Filho, MRM Fontes, AS Borges, JP Araujo-Junior, Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques, *Vet. Microbiol.* 162 (2013) 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.025>.
- [24] KE Linder, P. Bizikova, J. Luff, D. Zhou, H. Yuan, B Breuhaus, E. Nelson, R. Mackay, Generalized papillomatosis in three horses associated with a novel equine papillomavirus (EcPV8), *Vet. Dermatol.* 29 (2018) 72-e30. <https://doi.org/10.1111/vde.12481>.
- [25] CR Bromberger, JR Costa, M. Herman, JM Hernandez, LG Albertino, CEF Alves, AS Borges, JP. Oliveira-Filho, Detection of *Equus caballus* Papillomavirus in Equine Aural Plaque Samples. *J. Equine Vet. Sci.* 128 (2023) 104877. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104877>.
- [26] GG Rodrigues, DS Alves, CR Bromberger, QSS Nomelini, AS Borges, JP Oliveira-Filho, DJZ Delfiol, Clinical and epidemiological aspects in equine aural plaques, *Vet. Res. Commun.* 49 (2024) 1. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10572-0>.
- [27] RC Postey, GD Appleyard, BA Kidney, Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sarcoids for the presence of Equine papillomavirus DNA and Papillomavirus antigen, *Can. J. Vet. Res.* 71 (2007) 28 – 33. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1635997/>.
- [28] JP Oliveira Filho, PR Badial, PHJ Cunha, TF Cruz, JP Araújo Jr, TJ Divers, NJ Winand, AS Borges, Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real-time PCR, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135 (2010) 34 – 42. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.027>
- [29] JS Munday, G. Orbell, RA Fairley, M. Hardcastle, B. Vaatstra, Evidence from a series of 104 equine sarcoids suggests that most sarcoids in New Zealand are caused by bovine Papillomavirus type 2, although both BPV1 and BPV2

- DNA are detectable in around 10% of sarcoids, *Animals (Basel)* 11 (2021) 3093. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8614326/>.
- [30] SE Jones, Papillomaviruses in equids: A decade of discovery and more to come?, *Equine Vet. Educ.* 34 (2022) 236 – 240. <https://doi.org/10.1111/eve.13506>.
- [31] L. Bogaert, A. Martens, M. Van Poucke, R. Ducatelle, H. Cock, J. Dewulf, C. Baere, L. Peelman, F. Gasthuys, High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Vet. Microbiol.* 129 (2008) 58 – 68. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.008>.
- [32] H. Broström, E. Fahlbrink, ML Dubath, S. Lazary, Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish halfbreds and some of their families, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 19 (1988) 215 – 223. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(88\)90109-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(88)90109-2).
- [33] RP Araldi, SMR Assaf, RF Carvalho, MACR Carvalho, JM Souza, RF Magnelli, Papillomaviruses: a systematic review, *Genet. Mol. Biol.* 40 (2017) 1 – 21. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0128>.
- [34] Ö. Kanat, VS Ataseven, S. Babaeski, F. Derelli, C. Kumaş, F. Dogan, Equine and bovine papillomaviruses from Turkish brood horses: a molecular identification and immunohistochemical study, *Vet. Arh.* 89 (2019) 601 – 611. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0507>.
- [35] F. De Falco, A. Cutarelli, R. Pellicanò, S. Brandt, S. Roperto, Molecular detection and quantification of Ovine Papillomavirus DNA in equine sarcoid, *Transbound. Emerg. Dis.* 2024 (2024) 1 – 9. <https://doi.org/10.1155/2024/6453158>.
- [36] J. Luff, S. Weingart, S. May, B. Murphy, A subset of equine oral squamous cell carcinomas is associated with *Equus caballus* papillomavirus 2 infection, *J. Comp. Pathol.* 205 (2023) 1 – 6. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10953808/>.
- [37] S-K Lee, J. Yoon, Y. Kim, I. Lee. Penile neoplasm associated with *Equus caballus* papillomavirus type 2 infection in a miniature Appaloosa, *Korean J. Vet. Res.* 64 (2024) e8. <https://doi.org/10.14405/kjvr.20240011>.
- [38] C. Kainzbauer, J. Rushton, R. Tober, T. Scase, B. Nell, S. Sykora, S. Brandt, Bovine papillomavirus type 1 and *Equus caballus* papillomavirus 2 in equine

- squamous cell carcinoma of the head and neck in a Connemara mare: EcPV-2 in SCC of the head and neck, *Equine Vet. J.* 44 (2012) 112 – 115. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00358.x>.
- [39] J Peters-Kennedy, CE Lange, K. Ortved, Progression of aural plaques to squamous cell carcinoma in a horse, *Vet. Dermatol.* 31 (2020) 397 – 400. <https://doi.org/10.1111/vde.12870>.
- [40] J. Dong, W. Zhu, N. Yamashita, JK Chambers, K. Uchida, A. Kuwano, T. Haga, Isolation of equine papillomavirus type 1 from racing horse in Japan, *J. Vet. Med. Sci.* 79 (2017) 1957 – 1959. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0322>.
- [41] J. Mira, M. Herman, LS Zakia, G. Olivo, JP Araújo Jr, AS Borges, JP Oliveira-Filho, Factors associated with equine aural plaque in Brazil, *Vet. Dermatol.* 27 (2016) 408-e104. <https://doi.org/10.1111/vde.12360>.
- [42] RC Postey, GD Appleyard, BA Kidney, Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sarcoids for the presence of Equine papillomavirus DNA and Papillomavirus antigen, *Can. J. Vet. Res.* 71 (2007) 28 – 33. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1635997/>.
- [43] LS Zakia, RM Basso, G. Olivo, M. Herman, JP Araujo Jr, AS Borges, JP Oliveira-Filho, Detection of papillomavirus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded equine aural plaque samples, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 67 (2015) 1193 – 1196. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8077>.

Table 1. Distribution of samples used in this study

Samples	Fresh Tissue	FFPE	Total
SCC	10	16	26
Sarcoid	5	45	50

Table 2. PCR and sequencing primer sets used in this study.

	Primers	Product (bp)	Melting	Authors
JPEcPV1	GTGGTGTCTGGCTCCTTATTT GGTATCCTTCTCCCTCTCATCT	186	56 °C	Mira et al. [41]
JPEcPV2	ATGGTAACAGCGAGCGTATG CGAGGTCTCTGGGTTGTAAATG	179	52 °C	Mira et al. [41]
JPEcPV3	TTGCGCCAGGTTTCCACATCTA TTGTTCTGGCCTTGTGCACGTT	116	60 °C	Zakia et al. [43]
JPEcPV4	ACAATGGTGTGGCTGGCAGCA TTGTTCTGGCCTTGTGCACGTT	187	60 °C	Zakia et al. [43]
JPEcPV5	GGCTCCGTAGACATTCTAAAG CTGTTACACCCACGCCTAAT	184	62 °C	Zakia et al. [43]
JPEcPV6	CTACCAGAGGAACGAGCTTTAC TAGCTCCAATCCTCCAAGATA	203	62 °C	Zakia et al. [43]
JPEcPV7	GGACGTATGGAGTGACTTTG TTCCATAGGGTCGGGTAG	202	60 °C	Mira et al. [41]
EcPV 8	CTCAATAGGAGGGCAAGACC AAACAGTCACGGTTCCTCAAG	392	55 °C	Peters-Kennedy et al. [17]
CB_EcPV9	CCGTGGAGTTTGAGGAAGAAA CCATTATATCCTCGCGTGGTG	202	60 °C	Bromberger et al., [25]
EcPV10	GTGTCACAGTAACCCCTG AAGCGTGTCTTCCCTCCAGTG	175	60 °C	Turco et al. [19]
JMBPV1	AGCTGTGATTTCCACAGAGC TGGAACCCCACTAACAGAGT	111	60 °C	Munday et al. [29]
JMBPV2	CTGTGCCTCCTAGTGGTTGG TACCAAGTCACTGTGGGGGA	198	60 °C	Munday et al. [29]
<i>β-actin</i>	CATTGTCCACCTTCCAGCAGATGT CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT	86	60 °C	Oliveira-Filho et al. [28]

Table 3. Distribution of positive sarcoid samples, according to lesion location.

Tissue	Nº of samples	Lesion location	BPV	ECPV
Fresh	2	Groin	-	EcPV 1
FFPE	1	Armpit/chest	BPV 1	-
FFPE	1	Chest/corner of the mouth	BPV 1	-
FFPE	1	Ear	BPV 1	-
FFPE	1	Ventral abdomen	BPV 1	-
FFPE	1	Axila/ear	BPV 1	-
FFPE	1	Face/chest/ear	BPV 1	-
FFPE	1	Limbs	BPV 1	-
FFPE	1	Neck	BPV 1	-
FFPE	1	Eyelid	BPV 1	-
FFPE	1	Chest/Limbs	BPV 1	-
FFPE	1	Fetlock	BPV 1	-
FFPE	1	Scapula	BPV 1	-
FFPE	2	Face	BPV 1	-
FFPE	3	NI	BPV 1	-
FFPE	1	Face/flank	BPV 2	-
FFPE	1	Neck/croup	BPV 2	-
FFPE	1	Inguinal	BPV 2	-
FFPE	1	Scapula/Limbs	BPV 2	-
FFPE	1	Neck/fetlock	BPV 2	-
FFPE	1	Croup	BPV 2	-
FFPE	1	Eyelid	BPV 2	-
FFPE	1	Limbs	BPV 2	-
FFPE	1	Chest	BPV 2	-
FFPE	2	NI	BPV 2	-
FFPE	1	Eyelid/ventral abdomen	BPV 1, 2	-
FFPE	1	Pastern	BPV 1, 2	-

NI - Not informed

Table 4. Distribution of positive SCC samples, according to lesion location.

Tissue	Nº of samples	Lesion location	BPV	ECPV
Fresh	2	Ocular	-	EcPV1
Fresh	2	Penile	-	EcPV 2
FFPE	4	Vulvar	-	EcPV 2
FFPE	4	Ocular	-	EcPV 2
FFPE	1	Perianal	-	EcPV 2
FFPE	1	Nasal plane	-	EcPV 2

CAPÍTULO III

Conclusão Geral

Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam a presença do BPV 1 e 2 em lesões de sarcoide equino, bem como a presença do EcPV 2 em amostras de CCE de região ocular, oral e genital da espécie. A identificação do DNA do EcPV 1 em CCE de região ocular e tecidos de sarcoide em região de virilha sugere que pode haver a influência desse tipo viral na formação dessas neoplasias, sendo necessário mais pesquisas para confirmação.

Os EcPV 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 não foram identificados em nenhuma das amostras avaliadas.

O esclarecimento a respeito dos principais agente envolvidos e fatores desencadeadores da carcinogênese são fundamentais para o direcionamento de medidas preventivas e de controle dos casos abordados, principalmente aquelas voltadas para a imunização dos animais.

ANEXOS

ANEXO I



ATESTADO

Atesto que o Projeto "DETECÇÃO DO DNA DOS EcPVs EM AMOSTRAS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E SARCOIDE EM EQUINOS " **Protocolo CEUA 0265/2022** , a ser conduzido por Ana Maria Dias da Costa, 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	01/03/2023 a 28/02/2025
Nome Comum / Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Não serão adquiridos animais

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 05/12/2022

JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu