

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/01/2025.

**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 regredem 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. Concluímos 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.

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>

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).

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.