

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA PLACA AURAL EM EQUINOS
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

GABRYELE GOMIDY RODRIGUES

UBERLÂNDIA – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA PLACA AURAL EM EQUINOS
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção de título de mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do professor Dr. Diego José Zanzarini Delfiol.

UBERLÂNDIA

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R696 2023	<p>Rodrigues, Gabryele Gomidy, 1996- ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA PLACA AURAL EM EQUINOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS [recurso eletrônico] / Gabryele Gomidy Rodrigues. - 2023.</p> <p>Orientador: Diego José Zanzarini Delfiol. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.348 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Delfiol, Diego José Zanzarini , 1984-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

GABRYELE GOMIDY RODRIGUES

**ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA PLACA AURAL EM EQUINOS
NO ESTADO DE MINAS GERAIS.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Doutor Diego José Zanzarini Delfiol

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária – UFU – Uberlândia

Professor Doutor José Paes de Oliveira Filho

Membro titular

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Professor Doutor Alexandre Secorun Borges

Membro titular

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Professora Doutora Aline Santana da Hora

Membro suplente

Departamento de Investigação Etiológica

Faculdade de Medicina Veterinária – UFU – Uberlândia

Professor Doutor Campo Amor Vieira da Cunha Neto

Membro suplente

Medicina Veterinária Equina

Faculdade de Medicina Veterinária – UFJF – Juiz de Fora

Data da Defesa: 23 de maio de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que me permitiu ter saúde e todas as ferramentas necessárias para possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido Rafael Carvalho, que sempre acreditou no meu potencial, esteve ao meu lado em todos os momentos e me apoiou nas minhas decisões, sendo meu porto seguro.

Aos meus pais Elza e José, que sempre fizeram todo o possível para garantir minha educação e sem os quais esta conquista não seria possível. Vocês são meu exemplo de perseverança.

Aos meus irmãos Grazielle e Guilherme, por todo amor, companheirismo, incentivo, e por sempre vibrarem comigo as minhas conquistas.

Aos meus sogros Andreia e Clenio, por todas as orações e apoio durante esse período.

Ao meu orientador Diego José Zanzarini Delfiol, pela paciência, pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento deste trabalho e contribuição para minha vida pessoal e profissional.

A minha colega e amiga Gabriela Ribeiro, por viver comigo todo esse período, compartilhando emoções, frustrações e vitórias. Seus conselhos foram fundamentais para que eu chegasse aqui.

A minha colega Dara, sem a qual esse trabalho não teria começado, pela parceria e disposição de sempre me ajudar e acompanhar nos dias de campo, com muita alegria.

A minha colega Cristiana, pelo seu tempo, dedicação e por não medir esforços para me auxiliar, ensinar e compartilhar suas experiências comigo.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária da Unesp de Botucatu e ao professor José Paes de Oliveira Filho, por disponibilizar o espaço e todo o material para realização das análises.

A empresa Bom Negócio, que permitiu minha conciliação entre o trabalho e o mestrado, sempre me apoiando e incentivando meu crescimento.

A todos os proprietários dos animais avaliados que sempre foram extremamente receptivos, demonstrando muita alegria e disposição durante as avaliações e permitiram que esse trabalho fosse desenvolvido.

LISTA DE ABREVIACOES

bp = Pares de bases

BPV = *Bos taurus papillomavirus*

EaPV = *Equus asinus papilomavírus*

EcPV = *Equus caballus papillomavirus*

for = Forward

HPV = *Human papillomavirus*

IC = Intervalo de confiança

kg = Quilograma

kpb = Quilo pares de bases

LCR = Região de códon longo

mg = Miligrama

min = Minutos

MM = Mangalarga Marchador

ng = Nanograma

nm = Nanmetros

ORF = Sequência aberta de leitura ou open reading frame

PA = Placa aural

PCR = Reao em Cadeia da Polimerase

PV = Papilomavirus

QM = Quarto de Milha

rev = Reverse

seg = Segundos

μ L = Microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Organização do genoma do BPV: genoma circular de DNA de dupla fita dividido em região inicial (E), tardia (L) e controladora longa (LCR).....8
- Figura 2** – Representação dos quadrantes nas orelhas; RE: orelha direita, LE: orelha esquerda.....14
- Figura 3** – Coleta de material para biópsia de placa auricular em equino, utilizando “punch” de 6 mm de diâmetro.....15
- Figura 4** – Orelhas com lesões de placa auricular. Classificação A — um a cinco pontos, B — multiponto, C — coalescente.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de <i>primers</i> com tamanho do produto amplificado e temperatura de anelamento de cada <i>primer</i>	16
Tabela 2 – Resultado de presença de placa aural em relação as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.....	18
Tabela 3 – Presença ou ausência de PA nos animais em relação a idade, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=825).....	19
Tabela 4 – Características dos animais em relação a PA, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=825).....	20
Tabela 5 – Características dos animais em relação a raça (entre) e com PA positivo, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=309).....	21
Tabela 6 – Características dos animais em relação a raça (dentro) e com PA positivo, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=309).....	22
Tabela 7 – Frequência de detecção segundo o tipo de papilomavirus em relação as raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador.....	23
Tabela 8 – Frequência de papilomavirus identificados de forma isolada e distribuição das coinfeções dos papilomavirus em relação as raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador.....	24
Tabela 9 – Frequência das características da lesão segundo a presença de coinfeção.....	24
Tabela 10 – Frequência das características da lesão segundo o tipo de papilomavirus.....	24

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Papilomavírus	7
2.2 Característica genômica dos papilomavírus.....	8
2.3 Tipos de papilomavírus.....	9
2.3.1 Sarcóide	10
2.3.2 Carcinoma de células escamosas (CCE)	10
2.3.3 Papilomatose clássica	10
2.3.4 Papilomatose genital.....	11
2.3.5 Papilomatose generalizada	11
2.3.6 Papilomatose auricular	11
2.4 Diagnóstico da placa aural	12
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Animais e características dos grupos experimentais.....	14
4.2 Biópsia para realização de teste molecular	14
4.3 Extração de DNA.....	15
4.4 Realização da PCR.....	16
4.5 Controle positivo (mini-genes)	17
4.6 Cálculo do número de animais utilizados	17
4.7 Análise estatística.....	18
5 RESULTADOS	18
6 DISCUSSÃO.....	26
7 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS	32
ARTIGO CIENTÍFICO	37
ANEXOS	53

RESUMO

A placa aurial é uma doença dermatológica que acomete os pavilhões auriculares dos equinos, causando lesões puntiformes ou coalescentes caracterizadas por despigmentação e queratinização. A associação entre essas lesões, os tipos virais causadores da doença e as diferentes raças de equinos são pouco descritas. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência clínica de placas aurais em equinos das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) no estado de Minas Gerais, avaliando a associação dessa prevalência à alguns fatores de risco, e detectar a presença de DNA de *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) em biópsias de placas aurais. Foram avaliados clinicamente 400 equinos MM e 425 equinos QM, de diferentes idades, sexo, pelagens, funções e manejo. Foram realizadas biópsias das lesões de 30 equinos sendo 15 de cada raça, as quais foram processadas e submetidas a técnica de PCR, com utilização de primers previamente descritos para os EcPVs 1-9. Dos equinos MM e QM avaliados, 41,5% e 33,6% foram detectados com placa aurial, respectivamente. Os equinos da raça MM com idades de 1 a 5 anos mostraram maior frequência de PA que equinos da raça QM, além de maior sensibilidade ao toque e maior susceptibilidade de infecção na presença de ectoparasitas. Dentre as amostras, 90% se apresentaram positivas para pelo menos um tipo viral, sendo o papilomavírus mais frequente em ambas as raças o EcPV 4, presente em 60% dos animais (20% em QM e 40% em MM), seguido pelo EcPV6 53,3% (16,6% em QM e 36,7% em MM), EcPV5 13,3% (10% em QM e 3,3% em MM), EcPV3 13,3% (6,6% em QM e 6,6% em MM) e EcPV1 10% (3,3% em QM e 6,7% em MM). Em uma amostra, houve a detecção isolada do EcPV1, anteriormente descrito apenas em coinfeções. Quando avaliada a existência de coinfeção dos diferentes vírus, equinos da raça MM apresentaram maior índice de coinfeções comparados a equinos, com destaque para a associação dos EcPVs 4 e 6. Concluiu-se que a placa aurial está amplamente distribuída no estado de Minas Gerais, com maior prevalência do EcPV4, e equinos da raça MM apresentam maior susceptibilidade e frequência da doença comparado aos equinos da raça QM. A ausência de detecção dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 sugere que não estão associados com a placa aurial nesse estado do país.

Palavras-chave: Cavalo, EcPV, Mangalarga Marchador, Papilomatose, PCR, Quarto de Milha.

ABSTRACT

Aural plaque is a dermatological disease that affects the pinna of the equines, causing punctiform or coalescent injuries characterized by depigmentation and keratinization. The association between these injuries, the viral types that causes the disease and the different breeds of equines are poorly described. The objective of this study was to determine the clinical prevalence of aural plaques in equines of the Mangalarga Marchador (MM) and Quarter Horse (QH) breeds in the state of Minas Gerais, evaluating the association of this prevalence with some risk factors, and to detect the presence of *Equus caballus* papillomavirus (EcPV) DNA in aural plaque biopsies, correlating with ear injuries characteristics. 400 MM horses and 425 QH horses of different ages, gender, coats, functions and management were clinically evaluated. Biopsies of injuries from 30 equines were performed. 15 of each breed. They were processed and submitted to the PCR technique, using previously described primers for EcPVs 1-9. In about 41,5% and 33.6% of the MM and QH were detected aural plaques, respectively. MM horses aged from 1 to 5 year old, showed a higher frequency of AP than QH horses, besides a higher sensibility with touch and bigger sensibility to infection with existance of ectoparasites. Among the samples, 90% were positive for at least one viral type, with the most frequent papillomavirus in both breeds being EcPV 4, present in 60% of the animals (20% in QH and 40% in MM), followed by EcPV6 53.3% (16.6% in QH and 36.7% in MM), EcPV5 13.3% (10% in QH and 3.3% in MM), EcPV3 13.3% (6.6% in QH and 6.6% in MM) and EcPV1 10% (3.3% in QH and 6.7% in MM). In one sample, there was isolated detection of EcPV1, previously described only in co-infections. When evaluating the existence of co-infection of the different viruses, MM horses had a higher rate of co-infections compared to equines, with emphasis on the association of EcPVs 4 and 6. It is concluded that the aural plaque is widely distributed in the state of Minas Gerais, with a higher prevalence of EcPV4, and MM equines have a higher susceptibility and frequency of the disease compared to QH equines. The lack of detection of EcPVs 2, 7, 8 and 9 suggests that they are not associated with aural plaque in this state of the country.

Keywords: Horse, EcPV, Mangalarga Marchador, Papillomatous, PCR, Quarter Horse.

1 INTRODUÇÃO

A Placa Aural é uma enfermidade dermatológica infecciosa de origem viral, causada por um papilomavírus (ALFIERI et al., 2012). É provocada pelo *Equus caballus papilomavírus* (EcPV), que apresenta DNA de fita dupla da família Papovaviridae e infecta as camadas das células basais do epitélio. Sua presença é observada na face interna do pavilhão auricular de equinos, com características de demarcação evidente, despigmentação, superfície plana e frequentemente escamosa (BINNINGER, PIPER, 1968; KNOTTENBELT, 1998).

As placas podem variar de 1 a 20 mm, de forma uni ou bilateral, isoladamente ou de forma múltipla, com tendência a coalescer. Apesar de se tratar de uma enfermidade com carácter benigno, não apresenta regressão espontânea, pode causar sensibilidade nas orelhas (POSTEY et al., 2007). – o que dificulta o manejo dos animais –, além de reduzir o valor comercial, limitando a participação de equinos em algumas exposições, competições e leilões (SOUSA et al., 2008).

Ainda são desconhecidos os mecanismos pelos quais os vírus penetram na pele do pavilhão auricular e a forma de contágio entre os animais (FAIRLEY e HAINES, 1992). Acredita-se que a presença de artrópodes e simulídeos esteja relacionada à patogênese da placa aural, uma vez que promovem lesões cutâneas e podem atuar como vetores mecânicos do vírus (SCOTT, MILLER, 2003).

Segundo Scott e Miller (2011), a placa aural não apresenta predileção em relação ao sexo, raça ou idade, apesar das lesões serem raramente descritas em cavalos com menos de um ano de idade (TORRES e KOCH, 2013). Contudo, alguns autores apontam maior frequência dessa enfermidade em equinos da raça Mangalarga comparado a equinos da raça Quarto de Milha (SOUSA et al., 2008).

Em equinos, já foram detectados nove tipos virais responsáveis pela propagação das papilomatoses, além dos papilomavirus bovinos que também podem ser patogênicos aos equinos. Desses porém, apenas os EcPVs tipos 1, 3, 4, 5 e 6 foram isolados e relatados como possíveis responsáveis por causar a doença de placa aural, através do uso de técnicas moleculares como PCR, sendo o EcPV 1 apenas identificado em coinfeções, (LANGE et al., 2011; TANIWAKI et al., 2013; LANGE et al., 2013, LINDER et al., 2018; LI et al., 2019).

Ainda são poucos os dados disponíveis sobre a distribuição dos tipos virais, a presença de coinfeção e a relação com a apresentação clínica em diferentes regiões do Brasil (MIRA et al., 2016), e nenhum está diretamente ligado com o estado de Minas Gerais, que hoje

apresenta o maior número de cavalos registrados do país (IBGE, 2021), tornando necessária a busca por novas informações sobre a enfermidade na região.

Com isso, objetivou-se determinar a prevalência clínica de placas aurais em equinos das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha no estado de Minas Gerais, avaliando a associação dessa prevalência à alguns fatores de risco. Além disso, objetivou-se detectar a presença de DNA de *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) em biópsias de placas aurais de equinos, pois conhecer as cepas que estão circulando no estado pode auxiliar nas medidas de controle além de permitir realizar uma comparação entre o aspecto clínico das lesões e a cepa viral envolvida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus

O papilomavírus (PV), da família *Papillomaviridae*, se trata de um vírus DNA de fita dupla que podem ser encontrados na pele e mucosas de indivíduos doentes e saudáveis, uma vez que pertence a um grupo de vírus mundialmente difundido (ANTONSSON e MCMILLAN, 2006; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Em humanos, apesar das infecções causadas pelo papilomavírus serem subclínicas na maioria das vezes, pode haver a ocorrência clínica de verrugas auto limitantes até câncer invasivo. O surgimento de lesões clínicas depende de vários fatores como: imunidade do hospedeiro, tipo de epitélio, e qual o genótipo viral envolvido na infecção (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Os papilomavírus tem como célula alvo os queratinócitos, que não desempenham adequadamente a apresentação do antígeno, fazendo com que não haja uma grande resposta inflamatória. Essa característica é determinante para o entender o mecanismo de evasão do vírus pelo sistema imune do hospedeiro (GISSMANN, 1997). Acredita-se que casos de reinfecção podem acontecer em situações de imunossupressão do hospedeiro, uma vez que esses vírus apresentam capacidade de permanecer infectando as células basais do epitélio (MAGLENNON e DOORBAR, 2012). Além disso, Antonsson e Hansson (2002), identificaram variados tipos virais por swabs em pele saudável de humanos e animais, incluindo diferentes espécies de primatas, elefantes, alces, rena, corça, bisão, bovino e equino selvagem, demonstrando a possibilidade de os PV serem encontrados também em condições subclínicas.

As papilomatoses estão bastante distribuídas entre os seres humanos e os animais domésticos e silvestres, acometendo várias espécies de caninos, felinos, equídeos, ruminantes, roedores, aves, primatas, suínos e animais marinhos (BERNARD et al., 2010).

Segundo Bravo e Félez-Sánchez (2015), a maioria dos tipos de papilomavírus já relatados são provindos de humanos, com cerca de 200 PV listados como genomas de referência, encontrados no Episteme dos Papilomavirus. Foram identificados 112 tipos de PV não humanos, até o ano de 2013, dispostos no GenBank® em 32 gêneros diferentes (RECTOR e VAN RANST, 2013). Esses tipos de papilomavirus não humanos foram identificados de 54 espécies diferentes que incluem mamíferos, aves e répteis (BERNARD, 2005; BRAVO et al., 2010; RECTOR e VAN RANST, 2013).

Apesar de os PV serem altamente espécie/tecido-específicos (BERNARD, 2005) alguns vírus possuem a capacidade de infectar mais de uma espécie, como o papilomavirus bovino (BVP) (NASIR e BRANDT, 2013).

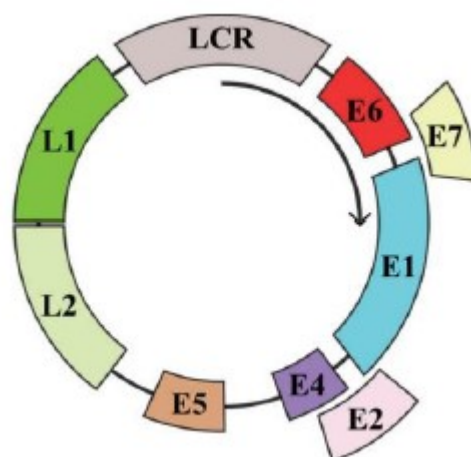
2.2 Característica genômica dos papilomavírus

O papilomavírus é um DNA vírus pequeno formado por dupla fita, de aproximadamente 8kpb, que apresenta características epiteliotróficas, não envelopado, capsídeos icosaédricos (LONGWORTH e LAIMINS, 2004), com 52 a 55 nm de diâmetro e ácido nucleico circular (TORRES e KOCH, 2013).

Os PV são considerados resistentes a condições ambientes, pois podem sobreviver no mesmo por até 63 dias, em circunstâncias de 4 a 8°C e por até seis horas a 37°C (SCOTT e MILLER, 2011), além de serem resistentes aos solventes lipídicos (éter e clorofórmio) (KING et al., 2012).

Embora apresente o genoma relativamente pequeno, os PV apresentam uma organização complexa (VAN DOORSLAER et al., 2013). Todas as sequências abertas de leitura, chamadas ORFs (open reading frame) estão localizados em uma única fita de DNA, indicando que apenas uma fita é usada como modelo para codificar proteínas virais. Essa fita codificadora é constituída das seguintes regiões: inicial (early-E), tardia (late-L) e região controladora longa (long control region-LCR), expressadas pela figura 1 (ALFIERI et al., 2007).

Figura 2 – Organização do genoma do BPV: genoma circular de DNA de dupla fita dividido em região inicial (E), tardia (L) e controladora longa (LCR).



Fonte: Araldi et al. 2017.

O segmento inicial (E) caracteriza 45% do genoma total, e é responsável pela codificação das proteínas para replicação e transcrição (ALFIERI et al., 2007; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). As primeiras proteínas E1 e E2 serão produzidas quando há

exposição da camada celular basal do epitélio através de microlesão, já que o vírus não possui capacidade de penetrar ativamente (NASIR e BRANDT, 2013). As proteínas E6 e E7 são produzidas também nessa fase, em casos de PV que sejam altamente associados a malignidade tumoral (LONGWORTH e LAIMINS, 2004). Logo, as proteínas E4 e E5 são produzidas para contribuir com a replicação viral (DOORBAR et al., 2012).

O segmento final (L) caracteriza 40% do genoma, e é responsável pela codificação das proteínas tardias (L1 e L2), que possibilitam a formação do capsídeo, maturação e liberação viral (LONGWORTH e LAIMINS, 2004). Essas proteínas L1 e L2, assim como E1 e E2, são comumente expressadas em todos os tipos de papilomavírus (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Entre os segmentos E e L, encontra-se a região controladora longa (LCR), que apresenta elementos impulsionadores e regiões regulatórias de replicação viral, mas não possui segmentos para codificação de proteínas (MCBRIDE, 2008; BERNARD, 2008; BERNARD, 2013; VAN DOORSLAER et al., 2013; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

O DNA viral pode ser encontrado de forma episomal ou integrada ao DNA do hospedeiro (MCBRIDE, 2008; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Segundo Parellada e Pereyra (2009), os vírus de maior malignidade se apresentam na forma integrada na maioria das vezes, o que sugere uma ligação entre o fator integrado com a gravidade da infecção.

2.3 Tipos de papilomavírus

Para a detecção e identificação molecular dos diferentes tipos de papilomavírus de equídeos, utiliza-se o gene L1 tardio, que se mostra mais conservado, avaliando a diversidade da sequência de seus nucleotídeos (DE PAOLIS et al., 2022).

Até hoje, foram isolados em equídeos, 14 tipos de papilomavirus de diferentes lesões e caracterizados por análise filogenética: *Bos taurus papillomavirus* 1 (BPV1), 2 (BPV2) (NASIR, 2013) e 13 (BPV13) (LUNARDI et al., 2013), *Equus asinus papillomavirus* 1–2 (EaPV1–2) (LECI, et al., 2014), e os *Equus caballus papillomavirus*, representados por nove tipos diferentes (EcPV1-9), que são os mais comumente encontrados em equinos (TORRES e KOCH, 2013; LANGE et al., 2011; LINDER et al., 2018; SCASE et al., 2010).

Esses diferentes tipos de papilomavírus podem afetar os equinos desenvolvendo neoplasias benignas ou neoplasias de aparência maligna. Normalmente, classifica-se as manifestações dos papilomas em equinos infectados de seis formas: sarcóide, carcinoma de células escamosas, papilomatose clássica, papilomatose genital, papilomatose auricular,

também conhecida como placa aural (SCOTT e MILLER, 2003), e mais recentemente, a papilomatose generalizada (LINDER et al., 2018).

2.3.1 Sarcóide

Em relação ao sarcóide, considerado o tumor mais comum em equinos, encontra-se relação da infecção por papilomavirus bovino tipo 1, 2 e 13 (BPV) (WOBESER et al., 2010; VALENTINE, 2006; NASIR, 2013; LUNARDI et al., 2013).

Esse tipo de PV possui alta capacidade de penetrar a derme, sem ocorrer a disseminação metastásica (SCOTT e MILLER, 2003). As lesões podem se desenvolver excessivamente de forma agressiva, ou permanecer inalterável por longo período (BOGAERT et al., 2008).

2.3.2 Carcinoma de células escamosas (CCE)

O carcinoma de células escamosas é uma doença oncológica maligna, com surgimento dos queratinócitos, considerada a mais comum em equinos. É caracterizada pela presença de lesões intraepiteliais precoces que progridem para um invasivo crescimento. Pode se desenvolver nas regiões da cabeça, pescoço, ocular e genital (SCOTT E MILLER, 2003).

Sua etiologia não é completamente descoberta, mas associa-se o desenvolvimento dessa doença com a presença do EcPV2, com destaque para os CCE desenvolvidos na região genital dos equinos (MIGLINCI et al., 2023).

2.3.3 Papilomatose clássica

A papilomatose clássica, também conhecida como papilomatose cutânea (SELLON, 2007), causada pelo vírus EcPV1, geralmente acomete animais com idade abaixo de três anos, apresentando características de lesões queratinizadas que surgem geralmente ao redor de lábios e extremidade do focinho (SCOTT e MILLER, 2011), e menos comumente nas pálpebras, região paragenital e porção distal dos membros (TORRES e KOCH, 2013).

As lesões podem alcançar até 20mm e numerosas projeções na medida que se desenvolvem, podendo apresentar de 10 a 100 lesões que podem coalescer (JACKSON, 2003; TORRES e KOCH, 2013).

Geralmente o animal desenvolve imunidade contra o vírus (SCOTT e MILLER, 2003) mas em caso de imunossupressão, pode haver persistência da lesão (JACKSON, 2003).

2.3.4 Papilomatose genital

A papilomatose genital, normalmente causada pelo vírus EcPV2 e EcPV7, apresenta características de células escamosas em processos penianos, podendo desenvolver carcinomas e neoplasias intraepiteliais (TORRES e KOCH, 2013). Recentemente, foi detectado um novo papilomavirus equino relacionado à classificação de papilomatose genital, denominado EcPV9, relatado primeiramente em sêmen de um garanhão com lesões penianas na Austrália, e posteriormente em cavalos italianos assintomáticos (LI et al., 2019; DE PAOLIS et al., 2022).

As lesões são comumente encontradas em mucosa oral, ocular e genital, caracterizadas por pápulas ou nódulos individuais, podendo ser individuais ou múltiplas (KNIGHT et al., 2011).

2.3.5 Papilomatose generalizada

Essa papilomatose foi descrita apenas duas vezes, a primeira em cavalos da raça Quarto de Milha e a segunda em cavalo sem raça definida, onde as lesões se apresentavam de forma disseminada, com dezenas a milhares de papilomas, nas regiões ventral do abdome, região inguinal e prepucial, pescoço, axilas e coxas, e menos distribuídas nas regiões da face, orelhas e membros distais (LINDER et al. 2018; PETERS-KENNEDY et al., 2019).

O papiloma envolvido nessa classificação é o EcPV8, que apresenta característica de placa epitelial, como ocorre com os papilomas genitais e placas auriculares, apresentando hiperqueratose de forma persistente e grave. Acredita-se que esse tipo de papilomatose esteja relacionado a imunodeficiência e/ou fatores de virulência viral, apesar de não haverem evidências clínicas de uma doença imunossupressora em ambos os casos relatados (LINDER et al. 2018). Apesar de descrita poucas vezes, não está claro se a infecção por EcPV8 é realmente rara ou apenas não reconhecida (PETERS-KENNEDY et al., 2019).

2.3.6 Papilomatose auricular

Já a papilomatose auricular, também conhecida como placa aural, está relacionada mais comumente com quatro papilomas equinos listados, EcPV-3, 4, 5 e 6 (LANGE et al., 2013; RECTOR e VAN RANST, 2013, GORINO et al., 2013). O novo papilomavirus equino EcPV8 também se relaciona com essa classificação de papilomatose, uma vez que apresenta lesões de forma generalizadas, que incluem o pavilhão auricular (PETERS-KENNEDY et al., 2019).

A placa aural é uma enfermidade que acomete dermatologicamente o pavilhão auricular de equinos, e apresenta lesões características bem demarcadas, com despigmentação esbranquiçada ou acinzentada, elevadas e com superfícies planas que, após remoção, revela uma base eritematosa e brilhante (BINNINGER e PIPER, 1968; KNOTTENBELT, 1998). Se trata de uma doença com caráter benigno, sem regressão espontânea, aparentemente indolor e não pruriginosa (SELLON, 2007). Podem ocorrer em uma ou ambas as faces interiores das orelhas, de forma isolada ou múltipla, com tamanhos variados de um a quatro milímetros ou maiores de vinte milímetros quando apresentam forma coalescente (SCOTT e MILLER, 2011). Segundo Jackson 2003, para ocorrência da doença não existe predileção por sexo, raça ou idade. Porém raramente é diagnosticada em animais com menos de um ano.

Ainda são desconhecidos os mecanismos pelos quais os vírus penetram na pele do pavilhão auricular e a forma de contágio entre os animais, mas acredita-se que a presença de artrópodes e simulídeos esteja relacionada à patogênese da enfermidade (SCOTT e MILLER, 2003). Além disso, trauma cutâneo, ambiente e higiene também foram apontados como fatores importantes para o desenvolvimento de placas aurais (PETERS-KENNEDY et al., 2020). Segundo Nasir e Brandt (2013), como o vírus não é capaz de penetrar ativamente, é necessário existir uma porta de entrada, para que o hospedeiro seja infectado. Uma microlesão que revele a camada celular basal do epitélio, é o suficiente para favorecer a multiplicação do genoma viral, uma vez que nessa camada as células estão em constante divisão.

Até o momento, não se têm casos descritos de regressão espontânea ao contrário à papilomatose (JACKSON, 2003; MACLACHLAN e DUBOVI, 2011). O tratamento com melhor eficácia relatada é baseado no imiquimod a 5%, via tópica (TORRES et al., 2010; ZAKIA et al., 2016).

2.4 Diagnóstico da placa aural

O diagnóstico comumente é embasado no aspecto clínico das lesões, as quais têm características típicas (SCOTT e MILLER, 2011). Mas essa forma de diagnóstico não permite a identificação e caracterização das variações provocadas pela infecção.

Uma vez que ainda não é possível o isolamento em cultivo convencional (KING et al., 2012; BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015), outras formas de diagnóstico foram estabelecidas para placa aural, como: microscopia eletrônica (FAIRLEY e HAINES, 1992), imuno-histoquímica (FAIRLEY e HAINES, 1992; POSTEY et al., 2007), e reação em cadeia da polimerase (PCR) (LANGE et al., 2011; ZAKIA et al., 2019).

Na microscopia eletrônica é possível observar as partículas virais no tecido afetado (FAIRLEY e HAINES, 1992), mas essa metodologia apresenta custo elevado, além de limitado a algumas instituições acadêmicas (TORRES e KOCH, 2013). Na imuno-histoquímica também é possível detectar proteína viral no interior do núcleo de células infectadas (FAIRLEY e HAINES, 1992; POSTEY et al., 2007).

Já a técnica de PCR tem sido mais utilizada devido sua alta sensibilidade, que através do uso de primers específicos, possibilita o isolamento e identificação dos responsáveis em potencial de causarem a doença de papilomatose em equinos (LANGE et al., 2011). Isso é permitido, uma vez que está disponível o genoma completo de todos os tipos de papilomavírus. (GORINO et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Determinar a prevalência clínica de placas aurais em equinos das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha no estado de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação de alguns fatores de risco à presença de placa aural.
- Detectar a presença de DNA de *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) em biópsias de placas aurais de equinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

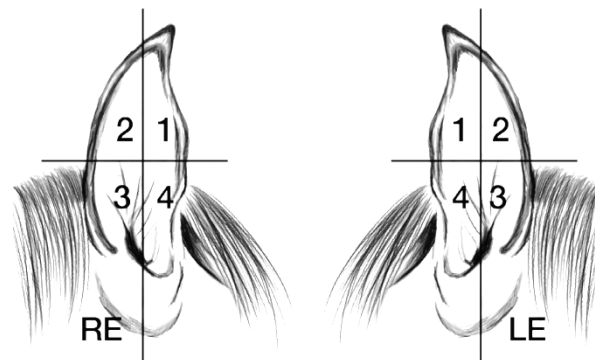
Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 23117.041869/2022-16.

4.1 Animais e características dos grupos experimentais

Foram examinados 825 equinos, machos e fêmeas, das raças Mangalarga Marchador (n=400) e Quarto de Milha (n=425). Os animais foram avaliados em 53 haras localizados no estado de Minas Gerais.

Cada equino teve uma ficha de identificação (anexo I), contendo informações referentes à raça, sexo, idade, bem como a presença ou não das lesões compatíveis com placa auricular, sua localização anatômica e classificação das lesões conforme descrito por Mira et al. (2018) em três tipos: tipo A, orelhas com um a cinco lesões puntiformes; tipo B, orelhas com mais de dez lesões puntiformes; ou tipo C, orelhas com lesões de placa auricular coalescente. As lesões foram fotografadas e desenhadas, com o objetivo de demonstrar o tamanho e a distribuição no pavilhão auricular (figura 2).

Figura 2 – Representação dos quadrantes nas orelhas; RE: orelha direita, LE: orelha esquerda.



Outros fatores foram avaliados como a presença ou não de ectoparasitas, tipo de manejo (intensivo, semi-intensivo e extensivo), realização de tosquia das orelhas, assim como a presença de sensibilidade auricular mediante palpação.

4.2 Biópsia para realização de teste molecular

Trinta animais que apresentaram lesões típicas de placa auricular, sendo quinze da raça Mangalarga Marchador e quinze da raça Quarto de Milha, foram submetidos à biópsia, sendo

colhido no máximo um animal de cada raça por haras. Para a realização da biópsia, os animais foram sedados com cloridrato de detomidina, 0,01mg/kg de peso vivo. Em seguida, as biópsias foram realizadas com “punch” de 6 mm de diâmetro. O local escolhido para a biópsia foi o centro da maior lesão presente no pavilhão auricular, visando pegar apenas tecido acometido (figura 3). Após a biópsia foi realizada a limpeza e assepsia do local da coleta com iodopovidona e aplicado repelente tóxico a base de permetrina, seguido de acompanhamento do animal até retorno total da sedação. Os fragmentos obtidos foram armazenados em tubo plástico de 1,5 ml e congelados a -20°C até o momento das análises, que foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária da Unesp, Campus de Botucatu – SP.

Figura 3 – Coleta de material para biópsia de placa aural em equino, utilizando “punch” de 6 mm de diâmetro.



4.3 Extração de DNA

O processo de extração de DNA foi realizado na amostra de placa aural com cerca de 20g, utilizando o Kit Gen Elute-E Single Spin Tissue DNA (Sigma-Aldrich), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram cortadas e maceradas com uso de agulha e bisturi estéril. Foi utilizado o kit Precellys Lysing para auxiliar na maceração do tecido.

Para ruptura de membrana e aminoácidos, foram utilizados kit Tissue Lysis Buffer + T Protease, com a finalidade de expor o máximo de DNA possível, seguidos de centrifugação e incubação. Após a eluição do material, avaliou-se a concentração e qualidade de DNA por espectrofotometria (Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™), utilizando

como referência A260/280 de 1,8. O produto extraído foi armazenado em freezer -20°C até a realização da PCR.

4.4 Realização da PCR

Para a realização da PCR dos EcPVs 1 - 9 foram utilizados primers previamente descritos (tabela 1) (ZAKIA et al., 2015; MIRA et al. 2018; PETERS-KENNEDY et al., 2019, BOMBERGER, 2023). A reação e condições de termociclagem utilizadas para os EcPVs 1 – 7, foram as mesmas descritas por Mira et al. (2018). As reações para os EcPVs 8 e 9, foram padronizadas para um volume final de 25µL, contendo 2,5µL do DNA, 12,5µL da enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega™), 0,6µL de cada um dos primers e 8,8µL de H₂O “nuclease-free”.

A programação de termociclagem foi a seguinte: 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos 55°C por 1 minuto para o EcPV 8 e 60°C para o EcPV 9, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 4 minutos Após a PCR, os tamanhos dos produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e fotodocumentados no ImageQuant® imager (GE Healthcare).

Para confirmar a presença de DNA celular nas amostras negativas para todos os EcPVs, foi realizada PCR usando primers para o gene β-actina em todas as amostras para confirmar a presença de DNA amplificável (OLIVEIRA-FILHO, et al. 2010).

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

Nome do primer	Sequências (5'-3')*	Produto*	Temp. anel.	GenBank™ ID
JPEcPV1 For JPEcPV1 Rev	GTGGTGTCTGGCTCCTTATTT GGTATCCTTCTCCCTCTCATCT	186 bp	56°C	NP620513
JPEcPV2 For JPEcPV2 Rev	ATGGTAACAGCGAGCGTATG CGAGGTCTCTGGGTTGTAATG	179 bp	52°C	ADZ73319.1
JPEcPV3 For JPEcPV3 Rev	TTGCGCCAGGTTTCCACATCTA TTGTTCTGGCCTTGTGCACGTT	116 bp	60°C	GU384895
JPEcPV4 For JPEcPV4 Rev	ACAATGGTGTTTGCTGGCACGA ACCGTGCAAAGCTGCAGAATGA	187 bp	60°C	JF939718.1
JPEcPV5 For JPEcPV5 Rev	GGCTCCGTAGACATTCCCTAAAG CTGTTACACCCACGCCTAAT	184 bp	62°C	YP007349388
JPEcPV6 For JPEcPV6 Rev	CTACCAGAGGAACGAGCTTTAC TAGCTCCCAATCCTCCAAGATA	203 bp	62°C	YP007518497
JPEcPV7 E6 For JPEcPV7 E6 Rev	GGACGTATGGAGTGACTTTG TTCCATAGGGTTCGGGTAG	202 bp	50,2°C	YP007518498.1

EcPV_Palo ³ For	CTCAATAGGAGGGCAAGACC	392 bp	55°C	MK029059.1
EcPV_Palo ³ Rev	AAACAGTCACGGTTCCTCAAG			
CB_EcPV9 For	CCGTGGAGTTTGAGGAAGAAA	202 bp	60°C	MN117918.1
CB_EcPV9 Rev	CCATTATATCCTCGCGTGGTG			
β -actina <i>forward</i>	CATTGTCCACCTTCCAGCAGATG	86 bp	60°C	AF035774
β -actina <i>reverse</i>	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACG AT			

*(Zakia et al., 2015; Mira et al. 2018; Peters-Kennedy et al., 2019, Bomberger, 2023)

* bp = pares de bases.

4.5 Controle positivo (mini-genes)

Para os EcPVs 2, 7, 8 e 9, que não haviam sido previamente detectados em amostras do laboratório, foram utilizados um conjunto de genes sintéticos (mini-genes), como controle positivo nas reações de PCR para validar o protocolo de PCR instituído e os primers utilizados.

Os mini-genes foram sintetizados a partir de sequências dos EcPVs depositadas no GenBankTM, utilizando Genone Biotechnologies (Soluções em Biotecnologia – Rio de Janeiro, Brasil). Estas sequências foram inseridas em DNA plasmídico e diluídas em 100 μ L de H₂O “nuclease-free” (concentração final de 50 ng/ μ L), e utilizados no mesmo volume que as amostras de DNA na reação de PCR. Todos os mini-genes, após amplificados, foram purificados utilizando Beads magnéticas e enviados para sequenciamento de Sanger. A sensibilidade analítica de cada mini-gene foi avaliada a partir de reações de PCR utilizando-os em uma curva de diluição de 10 vezes (de não diluído à 10⁻⁹), sendo detectados pelo menos até 10⁻³.

4.6 Cálculo do número de animais utilizados

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com a fórmula do site OpenEpi: Estatísticas epidemiológicas de código aberto para saúde (<https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm> acessado em 15/04/2022), usando a população total de cavalos registrados no estado de Minas Gerais das raças Mangalarga Marchador (241.520 animais) e Quarto de Milha (13.102 animais) disponibilizada em seus sites oficiais. Com base na fórmula $n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2(1-\alpha/2)^2 * (N-1) + p*(1-p)]$, o tamanho da amostra necessária para calcular o estudo foi de no mínimo 377 cavalos da raça Mangalarga Marchador e 374 cavalos da raça Quarto de Milha, com intervalo de confiança de 95% e utilizando frequência antecipada de 50%, conforme recomendado.

O número de 15 animais de cada raça e a colheita de no máximo um animal por raça por haras, foi definido por ser um número representativo das propriedades que foram visitadas e respeitando o orçamento que foi disponível para execução do projeto.

4.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados, inicialmente, em planilhas do programa Microsoft Excel® (Microsoft Office 365 Software, Redmond, WA, EUA). Para a análise estatística dos dados foi utilizado o ambiente R: A Language and Environment for Statistical Computing (2022). Para análise comparativa de presença de placa aural entre as raças, utilizou-se o teste binomial para duas proporções segundo Hollandeb e Wolfe (1973) e o teste de Qui-quadrado (X^2) para independência. Os dados obtidos em relação as demais variáveis analisadas, se deram pelo método estatístico de Qui-quadrado (X^2), e para verificar a existência de diferença da prevalência entre os animais das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, foi usado a comparação entre os intervalos de confiança. Os tipos virais detectados nas diferentes raças, foram analisados na forma descritiva.

5 RESULTADOS

Dos 400 cavalos da raça Mangalarga Marchador amostrados no estudo, 41,5% (166/400) possuíam placa aural, enquanto dos 425 cavalos Quarto de Milha avaliados 33,6% (143/425) foram positivos para a doença. O resultado comparativo entre as raças mostrou-se significativo (tabela 2). Ou seja, a presença de placa aural é estatisticamente maior em equinos da raça Mangalarga Marchador, comparada a raça Quarto de Milha. Para atingir o N necessário, foram visitados 53 haras e em todos havia pelo menos um animal com placa aural.

Tabela 2 – Resultado de presença de placa aural em relação as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.

Variáveis	Raça fa (p%)		p-valor ¹	p-valor ²
	QM	MM		
PA	SIM (n=309)	143 (46,3b)	166 (53,7a)	0,03
	NÃO (n=516)	282 (54,6a)	234 (45,4b)	<0,01

¹Letras distintas na mesma linha se diferem entre si pelo teste Binomial para duas proporções, ²p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Dentre os animais positivos para PA, 1,3% (4/309) possuíam até 1 ano de idade, 27,2% (84/309) estavam entre 1 a 3 anos de idade, 27,2% (84/309) entre 3 a 5 anos, 18,4%

(57/309) entre 5 a 8 anos, 12,6% (39/309) entre 8 a 10 anos, 10,4% (32/309) entre 10 a 15 anos, e 2,9% (9/309) com idade superior a 15 anos. A presença de PA nas idades inferior a 1 ano e superior a 15 anos, mostrou-se diferente estatisticamente comparada à outras idades, mostrando menor ocorrência da doença nessas idades (tabela 3).

Tabela 3 – Presença ou ausência de PA nos animais em relação a idade, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança, entre as idades (n=825).

Variáveis	PA fa (p%) [IC]		p-valor
	negativo	positivo	
ATÉ 1	46 (8,9bc) [6,6-11,7]	4 (1,3c) [0,3-3,3]	
1 A 3	97 (18,8a) [15,5-22,4]	84 (27,2a) [22,3-32,5]	
3 A 5	107 (20,7a) [17,3-24,5]	84 (27,2a) [22,3-32,5]	
5 A 8	126 (24,5a) [20,8-28,4]	57 (18,4ab) [14,3-23,2]	<0,01
8 A 10	58 (11,2b) [8,6-14,3]	39 (12,6b) [9,1-16,8]	
10 A 15	63 (12,2b) [9,5-15,3]	32 (10,4b) [7,2-14,3]	
>15	19 (3,7c) [2,2-5,7]	9 (2,9c) [1,3-5,5]	
total	n=516	n=309	

fa: frequência absoluta; p.: proporção; IC: intervalo de confiança. Letras distintas na coluna se diferem entre si pelo IC de Leemis e Trivedi (1996).

As idades de até 1 ano, 5 a 8 anos e 10 a 15 anos, mostraram significativa diferença estatística em relação a presença e ausência de PA (tabela 4), mostrando que nessas faixas etárias, a probabilidade de não ter placa auricular é maior. Dentre os animais positivos para PA (tabela 5), os equinos da raça MM mostraram maior prevalência da enfermidade entre as idades de 1 a 3 anos (63,1%) e de 3 a 5 anos (61,9%), quando comparados a equinos da raça QM com as mesmas faixa etária, sendo 36,9% e 38,1% respectivamente.

Neste estudo, observou-se que animais de pelagem alazão, castanho, rosilho e palomino apresentaram maior proporção de não manifestar a placa auricular quanto a manifestar, porém essa variável se mostrou estatisticamente independente (tabela 4). A ausência de PA também se mostrou mais evidente em relação a todas as funções avaliadas, com exceção de tração que não apresentou um número de animais significativo, mostrando que a função exercitada pelos animais avaliados não influencia na presença de placa auricular.

As variáveis relacionadas à presença de mosquitos, tosquia das orelhas, manejo e sexo não apresentaram relevância estatística que indique influência na presença de placa auricular, considerando o total de animais avaliados, desconsiderando as raças.

Tabela 4 – Características dos animais em relação a PA, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=825).

Variáveis	PA fa (p%) [IC]		p-valor
	negativo	positivo	
Ectoparasitas NÃO (n=576)	389 (67,5a) [63,5-71,3]	187 (32,5b) [28,6-36,5]	<0,01

	SIM (n=249)	127 (51,0a) [44,6-57,4]	122 (49,0a) [42,6-55,4]	
Mosquitos	NÃO (n=757)	476 (62,9) [59,3-66,3]	281 (37,1) [33,7-40,7]	0,51
	SIM (n=68)	40 (58,8) [46,2-70,6]	28 (41,2) [29,4-53,8]	
Tosquias das Orelhas	NÃO (n=625)	396 (63,4) [59,4-67,1]	229 (36,6) [32,8-40,5]	0,40
	SIM (n=200)	120 (60,0) [52,8-66,8]	80 (40,0) [33,1-47,1]	
Manejo	INTENSIVO (n=434)	278 (64,0) [59,3-68,6]	156 (36,0) [31,4-40,7]	0,31
	SEMI (n=147)	95 (64,6) [56,3-72,3]	52 (35,4) [27,7-43,7]	
	EXTENSIVO (n=244)	143 (58,6) [52,1-64,8]	101 (41,4) [35,1-47,8]	
Idade	ATÉ 1 (n=50)	46 (92,0a) [80,8-97,8]	4 (8,0b) [2,2-19,2]	<0,01
	1 A 3 (n=181)	97 (53,6a) [46,0-61,0]	84 (46,4a) [39,0-54,0]	
	3 A 5 (n=191)	107 (56,0a) [48,7-63,2]	84 (44,0a) [36,8-51,3]	
	5 A 8 (n=183)	126 (68,8a) [61,6-75,5]	57 (31,2b) [24,5-38,4]	
	8 A 10 (n=97)	58 (59,8a) [49,3-69,6]	39 (40,2a) [30,4-50,6]	
	10 A 15 (n=95)	63 (66,3a) [55,9-75,7]	32 (33,7b) [24,3-44,1]	
	>15 (n=28)	19 (67,9a) [47,6-84,1]	9 (32,1a) [15,9-52,3]	
Sexo	Masculino (n=323)	214 (66,3) [60,8-71,4]	109 (33,7) [28,6-39,2]	0,09
	Feminino (n=502)	302 (60,2) [55,7-64,5]	200 (39,8) [35,5-44,3]	
Função	Esporte (n=384)	259 (67,5a) [62,5-72,1]	125 (32,5b) [27,9-37,5]	0,04
	Lazer (n=125)	75 (60,0a) [50,9-68,7]	50 (40,0b) [31,3-49,1]	
	Pista (n=315)	181 (57,5a) [51,8-63,0]	134 (42,5b) [37,0-48,2]	
	Tração (n=1)	1 (100,0)	0 (0,0)	
Pelagem	Alazão (n=263)	160 (60,8) [54,6-66,8]	103 (39,2) [33,2-45,3]	0,25
	Castanho (n=188)	122 (64,9) [57,6-71,7]	66 (35,1) [28,3-42,4]	
	Baio (n=43)	27 (62,8) [46,7-77,0]	16 (37,2) [23,0-53,3]	
	Preto (n=39)	25 (64,1) [47,2-78,8]	14 (35,9) [21,2-52,8]	
	Tordilho (n=120)	63 (52,5) [43,2-61,7]	57 (47,5) [38,3-56,8]	
	Rosilho (n=79)	55 (69,6) [58,2-79,5]	24 (30,4) [20,5-41,7]	
	Zaino (n=33)	21 (63,6) [45,1-79,6]	12 (36,4) [20,4-54,9]	
	Palomino (n=30)	21 (70,0) [50,6-85,3]	9 (30,0) [14,7-49,4]	
	Pseudoalbino (n=4)	4 (100,0) [39,8-100,0]	0 (0,0) [0,0-60,2]	
	Pampa preto (n=13)	10 (76,9) [46,2-95,0]	3 (23,1) [5,0-53,8]	
	Pampa castanho (n=10)	6 (60,0) [26,2-87,8]	4 (40,0) [12,1-73,8]	
	Pampa todilho (n=2)	2 (100,0) [15,8-100,0]	0 (0,0) [0,0-84,2]	
	Pampa zaino (n=1)	0 (0,0)	1 (100,0)	

fa: frequência absoluta; p.: proporção; IC: intervalo de confiança para proporção exato de Leemis e Trivedi (1996). ¹p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Outra variável significativa é a ausência de ectoparasitas, uma vez que dentre os animais sem ectoparasitas nos pavilhões auriculares a presença de placa aural foi menor (tabela 4). Dos animais positivos para placa aural (tabela 5), os equinos da raça Mangalarga Marchador apresentaram maior prevalência de ectoparasitas (63,9%) comparados a raça Quarto de Milha (36,1%).

A quantidade de equinos da raça MM positivos para PA que tinham manejo do tipo extensivo (63,4%) foi maior do que animais da raça QM com esse mesmo manejo (36,6%). O mesmo acontece com os animais positivos para PA que apresentavam manejo de tosquia das orelhas, sendo 78,7% deles da raça MM e 21,3% da raça QM.

Tabela 5 – Características dos animais em relação a raça (entre) e com PA positivo, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=309).

Variáveis		Raça fa (p%) [IC]		p-valor
		QM	MM	
Uni/bilateral	Unilateral (n=191)	93 (48,7) [41,4-56,0]	98 (51,3) [44,0-58,6]	0,29
	Bilateral (n=118)	50 (42,4) [33,3-51,8]	68 (57,6) [48,2-66,7]	
Isolada/Múltipla	Isolada (n=197)	99 (50,2) [43,1-57,4]	98 (49,8) [42,6-56,9]	0,07
	Múltipla (n=112)	44 (39,3) [30,2-49,0]	68 (60,7) [51,0-69,8]	
Pruriginosa	Não (n=299)	139 (46,5) [40,7-52,3]	160 (53,5) [47,7-59,3]	0,75
	Sim (n=10)	4 (40,0) [12,1-73,8]	6 (60,0) [26,2-87,8]	
Sensibilidade	Não (n=277)	134 (48,4a) [42,3-54,4]	143 (51,6a) [45,6-57,6]	0,04
	Sim (n=32)	9 (28,1b) [13,7-46,7]	23 (71,9a) [53,2-86,2]	
Classificação	A (n=169)	86 (50,9) [43,1-58,6]	83 (49,1) [41,3-56,9]	0,21
	B (n=42)	17 (40,5) [25,6-56,7]	25 (59,5) [43,3-74,4]	
	C (n=98)	40 (40,8) [31,0-51,2]	58 (59,2) [48,8-69,0]	
Tratamento	Não (n=305)	142 (46,6) [40,8-52,3]	163 (53,4) [47,7-59,1]	0,63
	Sim (n=4)	1 (25,0) [0,6-80,6]	3 (75,0) [19,4-99,4]	
Ectoparasitas	Não (n=187)	99 (52,9) [45,5-60,3]	88 (47,1) [39,7-54,5]	<0,01
	Sim (n=122)	44 (36,1b) [27,6-45,2]	78 (63,9a) [54,7-72,4]	
Mosquito	Não (n=281)	127 (45,2) [39,3-51,2]	154 (54,8) [48,8-60,7]	0,24
	Sim (n=28)	16 (57,1) [37,2-75,5]	12 (42,9) [24,5-62,8]	
Tosquia das orelhas	Não (n=229)	126 (55,0) [48,3-61,6]	103 (45,0) [38,4-51,7]	<0,01
	Sim (n=80)	17 (21,3b) [12,9-31,8]	63 (78,7a) [68,2-87,1]	
Manejo	Intensivo (n=156)	75 (48,1) [40,0-56,2]	81 (51,9) [43,8-60,0]	0,02
	Semi (n=52)	31 (59,6) [45,1-73,0]	21 (40,4) [27,0-54,9]	
	Extensivo (n=101)	37 (36,6b) [27,3-46,8]	64 (63,4a) [53,2-72,7]	
Idade	ATÉ 1 (n=4)	3 (75,0) [19,4-99,4]	1 (25,0) [0,6-80,6]	0,04
	1 A 3 (n=84)	31 (36,9) [26,6-48,1]	53 (63,1) [51,9-73,4]	
	3 A 5 (n=84)	32 (38,1) [27,7-49,3]	52 (61,9) [50,7-72,3]	
	5 A 8 (n=57)	33 (57,9) [44,1-70,9]	24 (42,1) [29,1-55,9]	
	8 A 10 (n=39)	19 (48,7) [32,4-65,2]	20 (51,3) [34,8-67,6]	
	10 A 15 (n=32)	20 (62,5) [43,7-78,9]	12 (37,5) [21,1-56,3]	
	>15 (n=9)	5 (55,6) [21,2-86,3]	4 (44,4) [13,7-78,8]	

fa: frequência absoluta; p.: proporção; IC: intervalo de confiança para proporção exato de Leemis e Trivedi (1996). ¹p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Em relação as características da placa auricular, tem-se que os animais da raça MM apresentaram maior índice de sensibilidade ao toque, comparado aos equinos da raça QM (tabela 5). Foi relatado prurido em 10 equinos, sendo 4 da raça Quarto de Milha e 6 da raça Mangalarga Marchador, e em todos esses animais a detecção de prurido foi baseada nas informações relatadas pelos proprietários. Desses 10 animais com prurido, 7 apresentavam lesões bilaterais, múltiplas e coalescentes. Na tabela 6, observa-se que, neste estudo, em ambas as raças QM e MM, houve uma maior prevalência de PA nas formas unilateral, de forma isolada e não pruriginosa.

Na tabela 5, observa-se que a presença de ectoparasitas foi maior nos animais da raça MM comparado aos animais da raça QM. Além disso, nos animais positivos para PA da

raça QM, observou-se que a ausência de ectoparasitas foi estatisticamente maior que a presença desses na mesma raça (tabela 6). Essa diferença não foi observada nos animais da raça MM. Essas duas análises sugerem que equinos MM positivos para PA tendem a apresentar maior frequência de ectoparasitas nas orelhas.

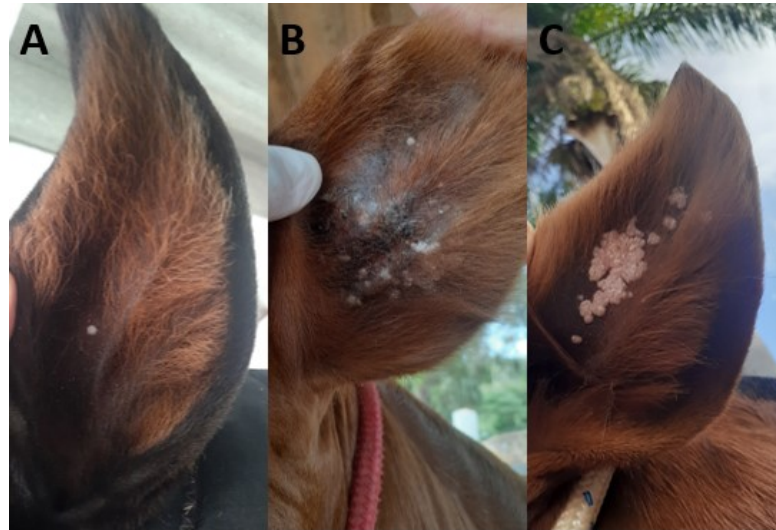
Tabela 6 – Características dos animais em relação a raça (dentro) e com PA positivo, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=309).

Variáveis		Raça fa (p%) [IC]		p-valor
		QM (n=143)	MM (n=166)	
Uni/bilateral	Unilateral	93 (65,0a) [56,6-72,8]	98 (59,0a) [51,1-66,6]	0,29
	Bilateral	50 (35,0b) [27,2-43,4]	68 (41,0b) [33,4-48,8]	
Isolada/Múltipla	Isolada	99 (69,2a) [61,0-76,7]	98 (59,0a) [51,1-66,6]	0,07
	Múltipla	44 (30,8b) [23,3-39,0]	68 (41,0b) [33,4-48,8]	
Pruriginosa	Não	139 (97,2a) [93,0-99,2]	160 (96,4a) [92,3-98,7]	0,75
	Sim	4 (2,8b) [0,8-7,0]	6 (3,6b) [1,3-7,7]	
Classificação	A	86 (60,1a) [51,6-68,2]	83 (50,0a) [42,1-57,8]	0,21
	B	17 (11,9c) [7,1-18,3]	25 (15,1b) [10,0-21,4]	
	C	40 (28,0b) [20,8-36,1]	58 (34,9a) [27,7-42,7]	
Ectoparasitas	Não	99 (69,2a) [61,0-76,7]	88 (53,0) [45,1-60,8]	<0,01
	Sim	44 (30,8b) [23,3-39,0]	78 (47,0) [39,2-54,9]	
Tosquia das orelhas	Não	126 (88,1a) [81,6-92,9]	103 (62,0a) [54,2-69,4]	<0,01
	Sim	17 (11,9b) [7,1-18,3]	63 (38,0b) [30,5-45,8]	
Manejo	Intensivo	75 (52,4a) [43,9-60,8]	81 (48,8a) [41,0-56,7]	0,02
	Semi	31 (21,7b) [15,2-29,3]	21 (12,6c) [8,0-18,7]	
	Extensivo	37 (25,9b) [18,9-33,9]	64 (38,6b) [31,1-46,4]	

fa: frequência absoluta; p.: proporção; IC: intervalo de confiança para proporção exato de Leemis e Trivedi (1996). ¹p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Observa-se que, em ambas as raças, houve uma maior detecção de placa aural com até cinco lesões puntiformes (Classificação A), seguida pelas placas com característica coalescente (Classificação C), e posteriormente as placas que apresentam mais de cinco lesões puntiformes (Classificação B), representando o tipo de placa aural menos encontrado entre os animais positivos (tabela 6). Contudo, na raça Mangalarga Marchador, a quantidade de placa aural com classificação A não apresentou diferença significativa da classificação C, já na raça Quarto de Milha observou-se essa diferença. Essas características foram representadas pela figura 4.

Figura 4 – Orelhas com lesões de placa aurál. Classificação A — um a cinco pontos, B — multiponto, C — coalescente.



Dos 309 animais positivos para lesões de placa aurál, apenas em quatro foram relatados uso de medicamentos para tratamento da doença, e em todos os casos foi utilizado tintura de iodo a 10% topicamente.

Das 30 biópsias coletadas, sendo 15 de equinos da raça QM e 15 da raça MM, 90% (27/30) foram positivas para pelo menos um tipo viral, sendo as três amostras negativas vindas de animais da raça Quarto de Milha. Nenhuma amostra foi positiva para os EcPV-2, 7, 8 e 9. Os EcPV's 4 e 6 foram os mais frequentemente encontrados em ambas as raças avaliadas, com maior evidência entre os animais da raça Mangalarga Marchador (tabela 7).

Tabela 7 – Frequência de detecção segundo o tipo de papilomavirus em relação as raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador.

Tipo viral	Raça	
	QM	MM
EcPV 1	6,6% (1/15)	13,3% (2/15)
EcPV 3	13,3% (2/15)	13,3% (2/15)
EcPV 4	40% (6/15)	80% (12/15)
EcPV 5	20% (3/15)	6,6% (1/15)
EcPV 6	33,3% (5/15)	73,3% (11/15)
Não detectado	20% (3/15)	0% (0/15)

Em cada raça existe a repetição de animais que apresentaram mais de um tipo de papilomavirus, não totalizando a soma da das colunas em 15 ou 100%.

Os papilomavírus encontrados isoladamente (12/27) foram o EcPV 1, 3, 4 e 6, com frequências de 8,3% (1/12), 8,3% (1/12), 66,6% (8/12) e 16,6% (2/12), respectivamente, com maior frequência nos equinos da raça Quarto de Milha (tabela 8). Quando avaliada a existência de coinfeção dos diferentes vírus, 55,5% (15/27) das amostras foram positivas para mais de

um tipo viral. A distribuição das coinfeccções encontra-se na tabela 8, onde é possível observar uma maior presença de coinfeccção entre os equinos da raça Mangalarga Marchador, com destaque para coinfeccção de EcPV4 e 6.

Tabela 8 – Frequência de papilomavírus identificados de forma isolada e distribuição das coinfeccções dos papilomavirus em relação as raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador.

	Raça			
	QM	MM	QM + MM	
Tipo viral isolado	EcPV 1	8,3% (1/12)	-	8,3% (1/12)
	EcPV 3	8,3% (1/12)	-	8,3% (1/12)
	EcPV 4	33,3% (4/12)	33,3% (4/12)	66,6% (8/12)
	EcPV 6	16,6% (2/12)	-	16,6% (2/12)
Coinfeccções	EcPV 1, 4, 5 e 6	-	6,6% (1/15)	6,6% (1/15)
	EcPV 3, 4 e 5	6,6% (1/15)	-	6,6% (1/15)
	EcPV 1 e 6	-	6,6% (1/15)	6,6% (1/15)
	EcPV 3 e 6	-	13,3% (2/15)	13,3% (2/15)
	EcPV 4 e 6	6,6% (1/15)	46,6% (7/15)	53,2% (8/15)
	EcPV 5 e 6	13,3% (2/15)	-	13,3% (2/15)

Foram investigadas associações entre as características da lesão dos animais biopsiados com a presença de coinfeccção (tabela 10) e o tipo viral encontrado (tabela 11). As características analisadas foram em relação a forma da lesão, se uni ou bilateral, se isolada ou múltipla, e quanto a sua classificação A, B ou C. Observa-se na tabela 10 e 11 que não foram encontradas nenhuma associação ao avaliar as características da lesão com a presença de coinfeccção e o tipo de papilomavirus.

Tabela 9 – Frequência das características da lesão dos animais biopsiados em relação a presença de coinfeccção.

	Com coinfeccção	Sem coinfeccção
Unilateral	53,3% (8/15)	50% (6/12)
Bilateral	46,7% (7/15)	50% (6/12)
Isolada	33,3% (5/15)	58,3% (7/12)
Múltipla	66,7% (10/15)	41,7% (5/12)
Classificação A	26,7% (4/15)	8,3% (1/12)
Classificação B	6,6% (1/15)	8,3% (1/12)
Classificação C	66,7% (10/15)	83,4% (10/12)

Tabela 10 – Frequência das características da lesão dos animais biopsiados em relação ao tipo de papilomavirus encontrado.

	Unilateral	Bilateral	Isolada	Múltipla	0 a 5 pontos	Multiponto	Coalescente
EcPV 1	33,3% (1/3)	66,6% (2/3)	33,3% (1/3)	66,6% (2/3)	33,3% (1/3)	- (0/3)	66,6% (2/3)

EcPV 3	75% (3/4)	25% (1/4)	50% (2/4)	50% (2/4)	25% (1/4)	50% (2/4)	25% (1/4)
EcPV 4	50% (9/18)	50% (9/18)	50% (9/18)	50% (9/18)	16,6% (3/18)	5,5% (1/18)	77,7% (14/18)
EcPV 5	50% (2/4)	50% (2/4)	50% (2/4)	50% (2/4)	75% (3/4)	- (0/4)	25% (1/4)
EcPV 6	50% (8/16)	50% (8/16)	31,2% (5/16)	68,8% (11/16)	18,8% (3/16)	6,2% (1/16)	75% (12/16)

Todas as amostras controle foram negativas e para confirmar a presença de DNA amplificável, as três amostras negativas para os EcPV's avaliados foram testadas para β -actina, sendo todas positivas.

6 DISCUSSÃO

A prevalência de placa aural nos equinos avaliados de 37,45% (309/825) no estado de Minas Gerais, demonstra que o vírus está amplamente distribuído no estado. Além da prevalência por equinos, importante destacar que 100% (53/53) dos haras visitados apresentaram pelo menos um animal positivo para placa aural. Mira et al. (2018), avaliando a prevalência de placa aural nas diferentes regiões do Brasil, observaram maior frequência da doença em equinos da região Sudeste (25,7%) comparada às demais regiões do país, e também uma alta predominância por haras (85%). Esses dados podem representar um importante problema clínico no estado, uma vez que a presença de um animal positivo para placa aural pode representar maior risco de animais saudáveis, daquele mesmo ambiente, desenvolverem a enfermidade, visto que o mecanismo de transmissão do vírus é desconhecida (FAIRLEY e HAINES 1992; SCOTT e MILLER, 2003) e, sabe-se que em outras formas de papilomatoses, o contato direto entre animais infectados pode transmitir a doença (JOHNSON, 1998).

Apesar de muitos autores considerarem que as lesões de placa aural não possuem predileção racial, neste estudo foi observado que equinos da raça Mangalarga Marchador apresentam maior prevalência da enfermidade comparado a equinos da raça Quarto de Milha. Resultado semelhante foi observado por Sousa et al. (2008), que apesar de não especificarem se os cavalos avaliados em seu estudo eram Mangalarga Marchador ou Paulista, identificaram uma prevalência de placa aural em 57% e 35% de equinos da raça Mangalarga e Quarto de Milha, respectivamente.

Na literatura não há relatos de que a placa aural apresenta predileção por sexo, função ou pelagem, o que confirma esse estudo. Já sobre a idade, a maioria dos autores identificaram que a enfermidade pode acometer cavalos de qualquer faixa etária, com menor ocorrência em equinos com menos de um ano (BINNIGER e PIPER, 1968; TORRES et al., 2010), o presente estudo corrobora essa afirmação, e um fato interessante e que no presente trabalho houve menor ocorrência em equinos acima de 15 anos. Quando comparado as raças avaliadas, a maior prevalência de placa aural em animais MM nas idades de 1 a 5 anos, ainda não havia sido descrita.

Pouco se sabe sobre a transmissão de placa aural entre os animais (MIRA et al., 2018). Parte dos autores acreditam que moscas picadoras estão relacionadas a transmissão e agravamento dos sintomas (KNOTTENBELT, 2009; TORRES et al., 2010). No presente estudo, a presença de mosquitos não apresentou relevância ou associação quanto a presença de PA. Porém, a menor prevalência da doença em animais que não apresentaram ectoparasitas nos

pavilhões auriculares, sugere a possibilidade de artrópodes transmitirem o PV, concordando com Sousa et al. (2008) e Scott e Miller (2003). Os equinos da raça MM, com placa aural, apresentaram maior prevalência de ectoparasitas comparados aos equinos QM, sugere que na presença desses artrópodes, os equinos MM são mais susceptíveis a contraírem a enfermidade do que equinos QM.

As placas aurais podem apresentar lesões puntiformes ou lesões caracterizadas como extensas placas distribuídas pela superfície interna do pavilhão auricular (THOMSETT, 1979). Neste estudo, as lesões foram observadas com maior frequência como tipo A, com até cinco lesões puntiformes, seguida pelas placas caracterizadas como tipo C, coalescente, em ambas as raças avaliadas, mostrando que a raça não apresenta influencia em relação ao tipo de lesão. Em um estudo com 891 animais de diferentes raças, também se observou maior prevalência de lesões de classificação A (MIRA et al., 2016).

Mira et al. (2016) encontraram associação entre o tipo de lesão com o sistema de manejo e limpeza das orelhas. Em seu estudo, animais que permaneciam em sistema intensivo e semiextensivo, assim como animais com maior frequência de limpeza das orelhas apresentavam maior frequência de placa aural. Em nosso estudo, não houve associação do tipo de sistema de manejo e tosquia das orelhas em relação a presença de PA no total dos animais, mas equinos da raça MM de sistema de manejo extensivo apresentaram maior frequência de PA quanto aos equinos QM do mesmo sistema. Entre os animais que tosquiavam as orelhas, também houve maior prevalência de PA em equinos MM em relação aos QM. Porém, essa variável pode ser influenciada pela função dos animais, uma vez que equinos da raça MM são mais submetidos a tosquia devido estarem relacionados com a função de pista, onde são avaliados também por postura e beleza.

Não houve nenhuma associação racial quanto a frequência de lesões uni ou bilaterais, nem quanto a frequência de lesões isoladas ou múltiplas. Esse achado difere de Sousa et al. (2008), que encontraram maior prevalência de lesões bilaterais em equinos da raça Mangalarga comparados a equinos da raça QM.

Cavalos com placas aurais podem ser assintomáticos ou podem apresentar sinais de prurido ou hipersensibilidade, como relutância ao tocar a região auricular (KNOTTENBELT, 2009; TORRES et al., 2010). Sousa et al. (2008) não encontraram sinais de prurido ou sensibilidade nos equinos Mangalarga e QM avaliados. Neste estudo, houve a presença de prurido, em poucos animais (3,2%), mostrando ser uma variável pouco comum. Em relação a

sensibilidade, apesar de também não apresentar alta frequência, os equinos da raça MM com PA apresentaram maior sensibilidade ao toque comparado aos equinos QM.

Em relação a análise molecular das cepas virais envolvidas na enfermidade, 90% (27/30) apresentaram pelo menos um tipo viral, sendo similar ao encontrado por Zakia et al. (2019) e Mira et al. (2018), cujas amostras positivas foram de 90,3% e 97,22%, respectivamente. Foram encontrados os tipos virais 1, 3, 4 e 6 de forma isolada, o que pode indicar maior capacidade de infecção desses vírus, possibilitando-os expressar patogenicidade de modo individual. Além disso, outros fatores podem influenciar na detecção de papilomavirus em uma mesma lesão, como a quantidade de DNA (que pode variar ao longo da lesão), como também o estado imunológico do animal (MIRA et al., 2018).

Isoladamente, houve maior prevalência do EcPV4 (66,6%, 8/12) em ambas as raças avaliadas, o que concorda com Mira et al. (2018), que encontraram maior frequência desse EcPV de forma isolada em equinos sem raça definida, comparado a outros tipos virais. Esse papilomavirus já tinha sido descrito e sequenciado no Brasil (TANIWAKI et al., 2013). Zakia et al. (2019), investigando a prevalência de EcPVs no Brasil, observaram que o EcPV4 apresenta maior prevalência em todas as regiões do país, incluindo o Sudeste onde se encontra Minas Gerais, confirmando a predominância desse papilomavirus em placas aurais de equinos neste território.

Equinos da raça Mangalarga Marchador apresentaram apenas o EcPV4 de forma isolada, enquanto os equinos da raça Quarto de Milha, além do EcPV4, apresentaram os EcPVs 1, 3 e 6 isoladamente. A relação desses tipos virais com essa determinada raça não há precedentes, podendo indicar uma susceptibilidade dos equinos da raça QM a determinados tipos de PV, sendo necessária maior investigação desses EcPVs nessa raça.

Importante destacar o isolamento do EcPV1 em amostra de placa aural. Esse papilomavírus já havia sido detectado em placas aurais anteriormente apenas em coinfeções com um ou mais tipos de papilomavírus (MIRA et al., 2018), sugerindo que não necessariamente ele participa do desenvolvimento das lesões auriculares, uma vez que está mais associada a papilomatose cutânea (GHIM et al., 2004). Contudo, neste estudo, foi encontrado esse tipo viral de forma isolada, sem associação com outros papilomavírus, confirmando sua patogenicidade como agente primário no desenvolvimento de lesões auriculares.

As coinfeções (55,5%, 15/27) foram mais frequentes comparadas aos tipos virais encontrados isoladamente (44,5%, 12/27). Equinos da raça MM (73,3%, 11/15) apresentaram maior índice de coinfeções comparados a equinos QM (26,7%, 4/15). Subentende-se que

coinfecção se trate de mutualismo ou disputa entre os tipos virais pelo hospedeiro (ROUSSEAU et al., 2001; MEJLHEDE et al., 2010). Haverá uma menor frequência de coinfecção em casos de disputa, enquanto a frequência de coinfecção aumenta nos casos em que há sinergismo entre os tipos virais (MEJLHEDE et al., 2010). Dessa forma, a alta frequência de coinfecção dos vírus EcPV4 e 6 na raça MM, indica um possível caso de sinergismo desses vírus dentro da mesma lesão.

Alguns autores afirmam que as coinfecções são casualidades e cada tipo viral ocasiona a doença de forma independente (CHATURVEDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2011). Contudo, outros sustentam que as coinfecções não são independentes do tipo viral e acontecem de forma frequente (THOMAS et al., 2000; GOLDMAN et al., 2013). Em humanos, relata-se que uma pessoa já infectada por um tipo viral apresenta maior chance de se infectar por outro tipo viral (ROSITCH et al., 2011), circunstância que pode ocorrer com animais infectados com EcPV4, visto que esse tipo viral é o mais constantemente encontrado em coinfecções ou de forma isolada, neste estudo e em outras literaturas (MIRA et al., 2018, ZAKIA et al., 2019).

Não há muitos relatos na literatura de frequência de coinfecções de papilomavírus em placa aural de equinos. Gorino et al. (2013) relataram coinfecção em 15,56% (7/45) das amostras para os EcPVs 3 e 4, enquanto Mira et al. (2018), detectaram 59,05% (62/105) das amostras positivas para dois ou mais tipos de papilomavirus equinos, incluindo a identificação dos EcPVs 1, 5 e 6 pela primeira vez no Brasil. Neste estudo, assim como em Mira et al. (2018), o EcPV5 foi encontrado apenas em coinfecções, tanto nos animais da raça QM quanto da raça MM, sugerindo que esse tipo viral apresenta baixa patogenicidade para gerar lesões de placa aural em equinos como agente primário.

Todas as coinfecções encontradas neste estudo, tanto da raça MM quando da raça QM, apontaram a presença do EcPV4 ou do EcPV6, mostrando que, entre os papilomavírus envolvidos em coinfecções na placa aural, estes são mais patogênicos. Este achado concorda com Mira et al. (2018), que encontraram esses EcPVs em 98,3% (61/62) dos casos de coinfecções em sua pesquisa.

A ausência dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 nas lesões de placa aural, era previsto, uma vez que os EcPVs 2, 7 e 9 estão mais relacionadas as lesões genitais, e o EcPV8 relacionado a lesões generalizadas (LANGE et al., 2013, LI et al., 2019; DE PAOLIS et al., 2022; LINDER et al., 2018). Apesar dos EcPVs 8 e 9 representarem uma infecção viral para a qual os dados ainda são limitados, sua ausência era esperada, uma vez que os animais avaliados não apresentaram outras lesões fora dos pavilhões auriculares. A ausência de detecção desses EcPVs nas amostras

coletadas, sugere que estes EcPVs não têm relação com a etiologia da enfermidade no estado de Minas Gerais.

Neste estudo não foram encontradas associações significativas ao avaliar as características da lesão com a presença de coinfeção e o tipo de papilomavirus, pois de forma geral, as frequências das variáveis foram similares. Poucos são os dados na literatura que descrevam essas associações. Mira et al. (2018) observaram que os EcPVs 1, 3, 4 e 6 foram mais frequentemente isolados de lesões individuais, seguidas de lesões coalescentes, enquanto nessa pesquisa, os EcPVs 1, 4 e 6 foram mais frequentes em lesões coalescentes, o EcPV 3 em lesões multiponto e o EcPV 5 em lesões individuais, não demonstrando um padrão claro do tipo viral com respeito às características da lesão. Em humanos, o tipo de lesão encontrada possibilita a classificação dos HPVs em alto e baixo risco (DOORBAR et al., 2012). Possivelmente existe alguma relação entre os aspectos da lesão e o tipo viral que não foi demonstrada nesse estudo, sendo necessária maior investigação com um tamanho maior de amostra e outras técnicas de análise.

Das 30 amostras coletadas para biópsia, três foram negativas para os tipos de papilomavirus testados, sendo todas de equinos da raça QM. Contudo, o gene β -actina foi amplificado nessas amostras, demonstrando a qualidade da extração do DNA e confirmando a negatividade dessas amostras para esses papilomavirus. Apesar das três amostras terem disso extraídas de lesões coalescentes, isso pode ter acontecido por baixa quantidade de DNA viral coletado, seja pelo local da extração ou a técnica utilizada. Estes achados permitem dizer que a técnica da PCR é uma ferramenta com alta especificidade e sensibilidade para diagnosticar a presença de papilomavirus em lesões de placa aural.

7 CONCLUSÕES

A alta prevalência de animais infectados com placa aural, tanto em relação ao número total de animais, quanto na detecção de animais acometidos por haras visitados, revela a ampla distribuição dessa enfermidade no estado de Minas Gerais.

Equinos da raça Mangalarga Marchador apresentaram maior frequência de placa aural – com destaque para animais com idade entre 1 a 5 anos, maior sensibilidade ao toque e maior susceptibilidade de infecção na presença de ectoparasitas, comparado a equinos da raça Quarto de Milha.

A detecção dos EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 nas amostras coletadas para biópsia, confirmam a associação desses tipos virais à etiologia da placa aural. A identificação do EcPV1 de forma isolada em lesão de placa aural é significativa, uma vez que esse tipo viral só havia sido encontrado em coinfeções, revelando agora seu desempenho como agente primário no desenvolvimento de lesões auriculares. A maior frequência do EcPV4 em ambas as raças avaliadas, demonstra a alta patogenicidade desse tipo viral para placa aural em equinos.

A ausência de detecção dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 nas amostras de lesões auriculares coletadas em diferentes regiões de Minas Gerais, sugere que estes EcPVs não estão associados com a papilomatose auricular nesse estado do país.

Não foram detectadas associações significativas entre as raças, as características da lesão, o tipo viral encontrado e presença de coinfeções. Contudo, equinos da raça MM (73,3%) apresentaram maior índice de coinfeções comparados a equinos QM (26,7%), com destaque para a associação dos EcPVs 4 e 6. Isso sugere uma maior susceptibilidade dessa raça à coinfeções desse tipo viral, sendo necessária maior investigação para confirmar tal pressuposto.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; WOSIACKI, S. Papillomaviridae. Em: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, cap. 15, p.397-412, 2007.
- ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p.12537-12542, 2002. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12537-12542.2002>
- ANTONSSON, A.; MCMILLAN, N. A. J. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3195-3200, 2006. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12537-12542.2002>
- 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>
- BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S1- S6, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>
- BERNARD, H. U. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent developments. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 357-361, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.011>
- BINNINGER, C. E.; PIPER, R. C. Hyperplastic dermatitis of equine ear. *Journal of the American Animal Medical Association*, v. 153, p. 69-75, 1968. In: TORRES, S.M.F; MALONE, E.D; WHITE, S.D; KOCH, S; WATSON, J.L. The efficacy of imiquimod 5% cream (Aldara?) in the treatment of aural plaque in horses: a pilot open-label clinical trial. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 503-509, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00877.x>
- BOGAERT, L.; MARTENS, A.; DEPOORTER, P.; GASTHUYS, F. Equine sarcoids - Part 3: association with bovine papillomavirus. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 78, p. 131-137, 2008.
- BOMBERGER, C. R. **Detecção dos Equus caballus papillomavirus em amostras de placa aural equina**. 2023. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/242541>>.
- BRAVO, I. G; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, câncer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine and Public Health**, p. 32-51, 2015. <https://doi.org/10.1093/emph/eov003>
- CAMPOS, N. G; RODRIGUEZ, A. C; CASTLE, P. E; HERRERO, R; HILDESHEIM, A; KATKI, H; KIM, J. J; WACHOLDER, S; MORALES, J; BURK, R.D; SCHIFFMAN, M. Persistence of Concurrent Infections with Multiple Human Papillomavirus Types: A Population- based Cohort Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 823-827, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq131>
- CHATURVEDI, A. K.; KATKI, H. A.; HILDESHEIM, A.; RODRIGUEZ, A. C.; QUINT, W.; SCHIFFMAN, M.; VAN DOORN, L. J.; PORRAS, C.; WACHOLDER, S.; GONZALEZ, P.; SHERMAN, M. E.; HERRERO, R. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 910-920, 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.00087-13>

- DE PAOLIS, L.; DE CIUCIS, C. G.; PELETTI, S.; CAPPELLI, K.; MECOCCHI, 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>
- DOORBAR, J; QUINT, W; BANKS, L; BRAVO, I.G; STOLER, M; BROKER, T.R; STANLEY, M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30S, p. F55-F70, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- FAIRLEY, R. A; HAINES, D. M. The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 70-81, 1992. <https://doi.org/10.1177%2F030098589202900110>
- GHIM, S.J; RECTOR, A; DELIUS, H; SUNDBERG, J.P; JENSON, A.B; VAN RUNST, M. Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 324, p. 1108-1115, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.154>
- GISSMANN, L. Respostas Imunológicas à Infecção Pelo Papilomavírus Humano. In: **Papilomavirus Humano HPV**. 1997. 1ed. p45-58.
- GOLDMAN, B; REBOLJA, M; RYGAARDB, C; PREISLERB, S; EJEGODB, D.M; LYNGBEA, E; BONDE, J. Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark. **Vaccine**, v. 31, p. 1604-1609, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.084>
- 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>
- HOLLANDEB, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric statistical methods**. John Wiley & sons, New York-Sydney-Tokyo-Mexico City 1973. <https://doi.org/10.1002/bimj.19750170808>
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2021. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br> . Acesso em: 08 de maio de 2023.
- JACKSON, H. A. **Papillomatosis** (Warts). In: Robinson, E. *Current Therapy in Equine Medicine*. St. Louis: Saunders, 2003. chap.4.13, p. 212.
- JOHNSON, P. J. Dermatologic tumors (excluding sarcoids). **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** 14(3):625-658, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30190-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30190-6)
- KNIGHT, C. G.; MUNDAY, J. S.; ROSA, B. V.; KIUPEL, M. Persistent, widespread papilloma formation on the penis of a horse: a novel presentation of equine papillomavirus type 2 infection. **Veterinary Dermatology**, v. 22, p. 570-574, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00987.x>
- KNOTTENBELT, D. C.; PASCOE, R. R. Sistema Tegumentar. Em: ___ **Afecções e Distúrbios do Cavalo**. São Paulo: Editora Manole Ltda, cap. 8, p. 280, 1998.
- KNOTTENBELT, D. C. Viral papillomatosis. In: KNOTTENBELT, D. C., editor. **Pascoe's principles & practice of equine dermatology**. Philadelphia: WB Saunders; p. 134, 2009.
- LANGE, C.E.; TOBLER, K.; ACKERMANN, M. *et al.* Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. **Vet Microbiol** 2011; 149: 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.019>

- LANGE, C.E.; VETSCH, E.; ACKERMANN, M. *et al.* Four novel papilomavírus sequences support a broad diversity among equine papilomaviruses. **J Gen Virol** 2013; 94: 1,365–1,372. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052092-0>
- LECI, R.; TORE, G.; SCAGLIARINI, A.; ANTUOFERMO, E.; DEDOLA, C.; CACCIOTTO, C.; DORE, GM; CORADDUZZA, E.; GALLINA, L.; BATTILANI, M.; e outros. O papilomavírus equino (EaPV1) fornece novos insights sobre a diversidade do papilomavírus equino. *Veterinario. Microbiol.* 170, 213–223. 2014.
- LEEMIS, L. M.; TRIVEDI, K. S. A comparison of approximate interval estimators for the bernoulli parameter. **The American Statistician**. Alexandria, v. 50, n. 1, p. 63-68, Feb.1996. <https://doi.org/10.2307/2685046>
- 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>
- LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, V.68, Nº2. p.362-372, 2004. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>
- LUNARDI, M.; DE ALCÂNTARA, B. K.; OTONEL, R. A.; RODRIGUES, W. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. DNA do papilomavírus bovino tipo 13 em sarcóides equinos. **J. Clin. Microbiol.** 51, 2167–2171, 2013. <https://doi.org/10.1128/JCM.00371-13>
- MAGLENNON, G. A; DOORBAR, J. The biology of papillomavirus latency. **The Open Virology Journal**, v. 6, sup.2:M4, p.190-197, 2012. <http://dx.doi.org/10.2174/1874357901206010190>
- MCBRIDE, A. A. Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. **Advances in Virus Research**, v. 72, p. 155-186, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00404-1)
- MEJLHEDE, N.; PEDERSEN, B. V.; FRISCH, M.; FOMSGAARD, A. Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy?. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 346–352, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.2602.x>
- MIGLINCI, L.; REICHER, P.; NELL, B.; KOCH, M.; JINDRA, C.; BRANDT, S. Detection of Equine Papillomaviruses and Gamma- Herpesviruses in Equine Squamous Cell Carcinoma. **Pathogens** v12, p179, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020179>
- MIRA J.; HERMAN, M.; ZAKIA, L. S.; OLIVO, G.; ARAUJO JR, J. P.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. P. Factors associated with equine aural plaque in Brazil. **Vet Dermatol**, 27:408–e104, 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12360>
- MIRA J.; HERMAN, M.; ZAKIA, L. S.; OLIVO, G.; ARAUJO JR, J. P.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. P. Frequency of Equus caballus papillomavirus in equine aural plaques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2018; 30(4):565-568. <https://dx.doi.org/10.1177%2F1040638717753495>
- NASIR, L.; BRANDT, S. Papillomavirus associated diseases of the horse. **Veterinary Microbiology**, 167. p.159–167. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.003>

- 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>
- PERELLADA, C. I.; PEREYRA, E. A. G. Papilomavíroses Humanas. In: **Tratado de Infectologia**. V1. 4ed. p681-698. 2009.
- 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.; APLEYARD, 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**, 71: 28–33, 2007.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R Vienna, Áustria: **Foundation for Statistical Computing**. 2022. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 26 abril 2023.
- RECTOR, A.; VAN RANST, M. Animal papillomaviruses. **Virology**, v. 445, p. 213- 223, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.007>
- ROSITCH, A. F.; POOLE, C.; HUDGENS, M. G.; AGOT, K.; NYAGAYA, E.; MOSES, S.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J.; BAILEY, R. C.; SMITH, J. S. Multiple Human Papillomavirus Infections and Type Competition in Men. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1-10, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir709>
- ROUSSEAU, M. C.; PEREIRA, J. S.; PRADO, J. C. M.; VILLA, L. L.; ROHAN, T. E.; FRANCO, E. L. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1508-1517, 2001. <https://doi.org/10.1086/324579>
- SCASE, T.; BRANDT, S.; KAINZBAUER, C.; SYKORA, S.; BIJMHOLT, S.; HUGHES, K.; SHARPE, S.; FOOTE, A. Equus caballus papillomavirus-2 (EcPV-2): An infectious cause for equine genital cancer?. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 8, p. 738-745, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00311.x>
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. eds. Equine Dermatology. 2nd ed. **Maryland Heights, MO: Elsevier**, 2011:317–327.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Neoplasms, cysts, hamartomas and keratoses. In: _____. **Equine Dermatology**. Maryland Heights: Elsevier Saunders, 2003. chap.16, p. 468-472.
- SELLON, D. C. Papillomavirus Infections. In: **Equine Infectious Disease**. 1ed. p226-232. 2007.
- SOUSA, N. R.; ADORNO, V. B.; MARCONDES, J. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; CONCEIÇÃO, L. G.; AMORIM, R. L.; BORGES, A. S. Características clínicas e histopatológicas da placa aural em equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha. **Pesq. Vet. Bras.** 28(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. M; BORGES, A. S; ARAUJO JR, J. P. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 85-93, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.025>
- THOMAS, K. K.; HUGHES, J. P.; KUYPERS, J. M.; KIVIAT, N. B.; LEE, S-K.; ADAM, D. E.; KOUTSKY, L. A. Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 1097- 1102, 2000. <https://doi.org/10.1086/315805>
- THOMSETT, L. R. **Skin diseases of the horse**. Practice 3:15-26, 1979.
- TORRES, S. M. F.; KOCH, S. N. Papillomavirus-Associated Diseases. **Veterinary Clinics 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.; 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>
- VALENTINE, B. A. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 123-126, 2006. <https://doi.org/10.1177/10406387060180012>
- VAN DOORSLAER, K.; TAN, Q.; XIRASAGAR, S.; BANDARU, S.; GOPALAN, V.; MOHAMOUD, Y.; HUYEN, Y.; MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. **Nucleic Acid Research**, v. 41, n. D, p. D571-D578, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks984>
- WOBESER, B. K; DAVIES, J. L; HILL, J. E; JACKSON, M. L; KIDNEY, B. A; MAYER, M. N; TOWNSEND, H. G. G; ALLEN, A. L. Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 1103-1108, 2010.
- 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. **Vet Dermatol.** v. 27, pag175–e44. 2016.
- ZAKIA, L. S.; HERMAN, M.; BASSO, R. M.; HERNADEZ, 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**, 12(1), 1 – 4, 2019. <http://dx.doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4>

ARTIGO CIENTÍFICO

(Artigo a ser submetido para revista Journal of Equine Veterinary Science)

ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA PLACA AURAL EM EQUINOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

RESUMO

A placa aural é uma doença dermatológica que acomete os pavilhões auriculares dos equinos, causando lesões puntiformes ou coalescentes caracterizadas por despigmentação e queratinização. A associação entre essas lesões, os tipos virais causadores da doença e as diferentes raças de equinos são pouco descritas. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência clínica de placas aurais em equinos das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) no estado de Minas Gerais, avaliando a associação dessa prevalência à alguns fatores de risco, e detectar a presença de DNA de *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) em biópsias de placas aurais. Foram avaliados clinicamente 400 equinos MM e 425 equinos QM, de diferentes idades, sexo, pelagens, funções e manejo. Foram realizadas biopsias das lesões de 30 equinos sendo 15 de cada raça, as quais foram processadas e submetidas a técnica de PCR, com utilização de primers previamente descritos para os EcPVs 1-9. Dos equinos MM e QM avaliados, 41,5% e 33,6% foram detectados com placa aural, respectivamente. Os equinos da raça MM com idades de 1 a 5 anos mostraram maior frequência de PA que equinos da raça QM, além de maior sensibilidade ao toque e maior susceptibilidade de infecção na presença de ectoparasitas. Dentre as amostras, 90% se apresentaram positivas para pelo menos um tipo viral, sendo o papilomavírus mais frequente em ambas as raças o EcPV 4, presente em 60% dos animais (20% em QM e 40% em MM), seguido pelo EcPV6 53,3% (16,6% em QM e 36,7% em MM), EcPV5 13,3% (10% em QM e 3,3% em MM), EcPV3 13,3% (6,6% em QM e 6,6% em MM) e EcPV1 10% (3,3% em QM e 6,7% em MM). Em uma amostra, houve a detecção isolada do EcPV1, anteriormente descrito apenas em coinfeções. Quando avaliada a existência de coinfeção dos diferentes vírus, equinos da raça MM apresentaram maior índice de coinfeções comparados a equinos QM, com destaque para a associação dos EcPVs 4 e 6. Conclui-se que a placa aural está amplamente distribuída no estado de Minas Gerais, com maior prevalência do EcPV4, e equinos da raça MM apresentam maior susceptibilidade e frequência da doença comparado aos equinos da raça QM. A ausência de detecção dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 sugere que não estão associados com a placa aural nesse estado do país.

Palavras-chave: Cavalo, EcPV, Mangalarga Marchador, Papilomatose, PCR, Quarto de Milha.

1 INTRODUÇÃO

A Placa Aural é uma enfermidade dermatológica infecciosa de origem viral, causada por *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) [1]. Sua presença é observada na face interna do pavilhão auricular de equinos, com características de demarcação evidente, despigmentação, superfície plana e frequentemente escamosa [2,3]. As placas podem variar de 1 a 20 mm e podem afetar mais de 40% das orelhas, de forma uni ou bilateral, isoladamente ou de forma múltipla, com tendência a coalescer [4].

Apesar da improbabilidade do vírus ser transmitido entre os equinos, ainda são desconhecidos os mecanismos pelos quais os vírus penetram na pele do pavilhão auricular e a forma de contágio entre os animais [5]. Acredita-se que a presença de artrópodes e simulídeos esteja relacionada à patogênese da placa aural, uma vez que promovem lesões cutâneas e podem atuar como vetores mecânicos do vírus [6].

A placa aural não apresenta predileção em relação ao sexo, raça ou idade, apesar das lesões serem raramente descritas em cavalos com menos de um ano de idade [7, 8]. Contudo, alguns estudos apontam maior frequência dessa enfermidade em equinos da raça Mangalarga comparado a equinos da raça Quarto de Milha [9].

Atualmente, em equinos, já foram detectados nove tipos virais responsáveis pela propagação das papilomatoses, além dos papilomavirus bovinos que também podem ser patogênicos aos equinos. Desses porém, apenas os EcPVs tipos 1, 3, 4, 5 e 6 foram isolados e relatados como possíveis responsáveis por causar a doença de placa aural, através do uso de técnicas moleculares como PCR, sendo o EcPV 1 apenas identificado em coinfeções [10, 11, 12].

Ainda são poucos os dados disponíveis sobre a distribuição dos tipos virais, a presença de coinfeção e a relação com a apresentação clínica em diferentes regiões do Brasil, e nenhum está diretamente ligado com o estado de Minas Gerais, que hoje apresenta o maior número de cavalos registrados do país [13].

Com isso, objetivou-se determinar a prevalência clínica de placas aurais em equinos das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha no estado de Minas Gerais, e avaliar prováveis fatores de risco. Além disso, objetivou-se detectar a presença de DNA de *Equus caballus papillomavirus* (EcPV) em biópsias de placas aurais de equinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e características dos grupos experimentais

Foram examinados 825 equinos, de 53 haras do estado de Minas Gerais, machos e fêmeas, das raças Mangalarga Marchador (n=400) e Quarto de Milha (n=425). O tamanho da amostra foi calculado de acordo com a fórmula do site OpenEpi: Estatísticas epidemiológicas de código aberto para saúde (<https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm> acessado em 15/04/2022), usando a população total de cavalos registrados no estado de Minas Gerais das raças Mangalarga Marchador (241.520 animais) e Quarto de Milha (13.102 animais) disponibilizada em seus sites oficiais. Com base na fórmula $n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d2/Z21 - \alpha/2 * (N-1) + p * (1-p))]$, o tamanho da amostra necessária para calcular o estudo foi de no mínimo 377 cavalos da raça Mangalarga Marchador e 374 cavalos da raça Quarto de Milha, com intervalo de confiança de 95% e utilizando frequência antecipada de 50%, conforme recomendado.

Cada equino teve uma ficha de identificação, contendo informações referentes à raça, sexo, idade, bem como a presença ou não das lesões compatíveis com placa aural, sua localização anatômica e classificação das lesões em três tipos: tipo A, orelhas com um a cinco lesões puntiformes; tipo B, orelhas com mais de dez lesões puntiformes; ou tipo C, orelhas com lesões de placa aural coalescente [14].

Outros fatores foram avaliados como a presença ou não de ectoparasitas, tipo de manejo (intensivo, semi-intensivo e extensivo), realização de tosquia das orelhas, assim como a presença de sensibilidade auricular mediante palpação.

Trinta animais que apresentaram lesões típicas de placa aural, sendo 15 da raça Mangalarga Marchador e 15 da raça Quarto de Milha, foram submetidos à biópsia, sendo colhido no máximo um animal de cada raça por haras. Os fragmentos obtidos foram armazenados em tubo plástico de 1,5 ml e congelados a -20°C até o momento das análises.

2.2 Extração de DNA e realização da PCR

O processo de extração de DNA foi realizado na amostra de placa aural com cerca de 20g, utilizando o Kit Gen Elute-E Single Spin Tissue DNA (Sigma-Aldrich), de acordo com as recomendações do fabricante. Para ruptura de membrana e aminoácidos, foram utilizados kit Tissue Lysis Buffer + T Protease, seguidos de centrifugação e incubação. Após a eluição do material, avaliou-se a concentração e qualidade de DNA por espectrofotometria (Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™), utilizando como referência A260/280 de 1,8.

Para a realização da PCR dos EcPVs 1 - 9 foram utilizados primers previamente descritos [14, 15, 16, 17]. A reação e condições de termociclagem utilizadas para os EcPVs 1 – 7, foram descritas anteriormente [14]. As reações para os EcPVs 8 e 9, foram padronizadas para um volume final de 25µL, contendo 2,5µL do DNA, 12,5µL da enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega™), 0,6µL de cada um dos primers e 8,8µL de H₂O “nuclease-free”.

A programação de termociclagem foi a seguinte: 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos 55°C por 1 minuto para o EcPV 8 e 60°C para o EcPV 9, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 4 minutos Após a PCR, os tamanhos dos produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e fotodocumentados no ImageQuant®imager (GE Healthcare).

Para confirmar a presença de DNA celular nas amostras negativas para todos os EcPVs, foi realizada PCR usando primers para o gene β-actina em todas as amostras para confirmar a presença de DNA amplificável [18].

2.3 Controle positivo (mini-genes)

Para os EcPVs 2, 7, 8 e 9, que não haviam sido previamente detectados em amostras do laboratório, foram utilizados um conjunto de genes sintéticos (mini-genes), como controle positivo nas reações de PCR para validar o protocolo de PCR instituído e os primers utilizados.

Os mini-genes foram sintetizados a partir de sequências dos EcPVs depositadas no GenBank™, utilizando Genone Biotechnologies (Soluções em Biotecnologia – Rio de Janeiro). Estas sequências foram inseridas em DNA plasmídico e diluídas em 100µL de H₂O “nuclease-free” (concentração final de 50 ng/µL), e utilizados no mesmo volume das amostras de DNA na reação de PCR. Todos os mini-genes, após amplificados, foram purificados utilizando Beads magnéticas e enviados para sequenciamento de Sanger. A sensibilidade analítica de cada mini-gene foi avaliada a partir de reações de PCR utilizando-os em uma curva de diluição de 10 vezes (de não diluído à 10⁻⁹), sendo detectados pelo menos até 10⁻³.

2.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados, inicialmente, em planilhas do programa Microsoft Excel® (Microsoft Office 365 Software, Redmond, WA, EUA). Para a análise estatística dos dados foi utilizado o ambiente R: A Language and Environment for Statistical Computing. Para análise comparativa de presença de placa aural entre as raças, utilizou-se o teste binomial para duas proporções Hollandeb e Wolfe (1973) e o teste de Qui-quadrado (X^2) para independência.

Os dados obtidos em relação as demais variáveis analisadas, se deram pelo método estatístico de Qui-quadrado (X^2), e para verificar a existência de diferença da prevalência entre os animais das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, foi usado a comparação entre os intervalos de confiança. Os tipos virais detectados nas diferentes raças, foram analisados na forma descritiva.

3 RESULTADOS

Dos 400 cavalos da raça Mangalarga Marchador amostrados no estudo, 41,5% (166/400) possuíam placa aural, enquanto dos 425 cavalos Quarto de Milha avaliados 33,6% (143/425) foram positivos para a doença. O resultado comparativo entre as raças mostrou-se significativo (tabela 1). Ou seja, a presença de placa aural é estatisticamente maior em equinos da raça Mangalarga Marchador, comparada a raça Quarto de Milha. Para atingir o N necessário, foram visitados 53 haras e em todos havia pelo menos um animal com placa aural.

Tabela 1 – Resultado de presença de placa aural em relação as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.

Variáveis	Raça fã (p%)		p-valor ¹	p-valor ²
	QM	MM		
PA	SIM (n=309)	143 (46,3b)	166 (53,7a)	0,03
	NÃO (n=516)	282 (54,6a)	234 (45,4b)	<0,01

¹Letras distintas na mesma linha se diferem entre si pelo teste Binomial para duas proporções, ²p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Dentre os animais positivos para PA, 1,3% (4/309) possuíam até 1 ano de idade, 27,2% (84/309) estavam entre 1 a 3 anos de idade, 27,2% (84/309) entre 3 a 5 anos, 18,4% (57/309) entre 5 a 8 anos, 12,6% (39/309) entre 8 a 10 anos, 10,4% (32/309) entre 10 a 15 anos, e 2,9% (9/309) com idade superior a 15 anos. A presença de PA nas idades inferior a 1 ano e superior a 15 anos, mostrou-se diferente estatisticamente comparada à outras idades, mostrando que a ocorrência da doença é significativamente menor nessas idades.

As idades de até 1 ano, 5 a 8 anos e 10 a 15 anos, mostraram significativa diferença estatística em relação a presença e ausência de PA, mostrando que nessas faixas etárias, a probabilidade de não ter placa aural é maior. Dentre os animais positivos para PA, os equinos da raça MM mostraram maior prevalência da enfermidade entre as idades de 1 a 3 anos (63,1%) e de 3 a 5 anos (61,9%), quando comparados a equinos da raça QM com as mesmas faixa etária, sendo 36,9% e 38,1% respectivamente (tabela 2).

As variáveis relacionadas à pelagem, função, presença de mosquitos, tosquia das orelhas, manejo e sexo não apresentaram relevância estatística que indique influência na presença de placa auricular, considerando o total de animais avaliados, desconsiderando as raças.

Tabela 2 – Características dos animais em relação a raça (entre) e com PA positivo, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=309).

Variáveis	Raça fa (p%) [IC]			p-valor
		QM	MM	
Uni/bilateral	Unilateral (n=191)	93 (48,7) [41,4-56,0]	98 (51,3) [44,0-58,6]	0,29
	Bilateral (n=118)	50 (42,4) [33,3-51,8]	68 (57,6) [48,2-66,7]	
Isolada/Múltipla	Isolada (n=197)	99 (50,2) [43,1-57,4]	98 (49,8) [42,6-56,9]	0,07
	Múltipla (n=112)	44 (39,3) [30,2-49,0]	68 (60,7) [51,0-69,8]	
Pruriginosa	Não (n=299)	139 (46,5) [40,7-52,3]	160 (53,5) [47,7-59,3]	0,75
	Sim (n=10)	4 (40,0) [12,1-73,8]	6 (60,0) [26,2-87,8]	
Sensibilidade	Não (n=277)	134 (48,4a) [42,3-54,4]	143 (51,6a) [45,6-57,6]	0,04
	Sim (n=32)	9 (28,1b) [13,7-46,7]	23 (71,9a) [53,2-86,2]	
Classificação	A (n=169)	86 (50,9) [43,1-58,6]	83 (49,1) [41,3-56,9]	0,21
	B (n=42)	17 (40,5) [25,6-56,7]	25 (59,5) [43,3-74,4]	
	C (n=98)	40 (40,8) [31,0-51,2]	58 (59,2) [48,8-69,0]	
Tratamento	Não (n=305)	142 (46,6) [40,8-52,3]	163 (53,4) [47,7-59,1]	0,63
	Sim (n=4)	1 (25,0) [0,6-80,6]	3 (75,0) [19,4-99,4]	
Ectoparasitas	Não (n=187)	99 (52,9) [45,5-60,3]	88 (47,1) [39,7-54,5]	<0,01
	Sim (n=122)	44 (36,1b) [27,6-45,2]	78 (63,9a) [54,7-72,4]	
Mosquito	Não (n=281)	127 (45,2) [39,3-51,2]	154 (54,8) [48,8-60,7]	0,24
	Sim (n=28)	16 (57,1) [37,2-75,5]	12 (42,9) [24,5-62,8]	
Tosquia das orelhas	Não (n=229)	126 (55,0) [48,3-61,6]	103 (45,0) [38,4-51,7]	<0,01
	Sim (n=80)	17 (21,3b) [12,9-31,8]	63 (78,7a) [68,2-87,1]	
Manejo	Intensivo (n=156)	75 (48,1) [40,0-56,2]	81 (51,9) [43,8-60,0]	0,02
	Semi (n=52)	31 (59,6) [45,1-73,0]	21 (40,4) [27,0-54,9]	
	Extensivo (n=101)	37 (36,6b) [27,3-46,8]	64 (63,4a) [53,2-72,7]	
Idade	ATÉ 1 (n=4)	3 (75,0) [19,4-99,4]	1 (25,0) [0,6-80,6]	0,04
	1 A 3 (n=84)	31 (36,9) [26,6-48,1]	53 (63,1) [51,9-73,4]	
	3 A 5 (n=84)	32 (38,1) [27,7-49,3]	52 (61,9) [50,7-72,3]	
	5 A 8 (n=57)	33 (57,9) [44,1-70,9]	24 (42,1) [29,1-55,9]	
	8 A 10 (n=39)	19 (48,7) [32,4-65,2]	20 (51,3) [34,8-67,6]	
	10 A 15 (n=32)	20 (62,5) [43,7-78,9]	12 (37,5) [21,1-56,3]	
	>15 (n=9)	5 (55,6) [21,2-86,3]	4 (44,4) [13,7-78,8]	

fa: frequência absoluta; p.: proporção; IC: intervalo de confiança para proporção exato [19]. ¹p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Em relação às características da placa auricular, tem-se que os animais da raça MM apresentaram maior índice de sensibilidade ao toque (71,9%), comparado aos equinos da raça QM (28,15) (tabela 2). Foi relatado prurido em 10 equinos, sendo 4 da raça Quarto de Milha e 6 da raça Mangalarga Marchador, e em todos esses animais a detecção de prurido foi baseada nas informações relatadas pelos proprietários. Desses 10 animais com prurido, 7 apresentavam lesões bilaterais, múltiplas e coalescentes. Na tabela 3, observa-se que, neste estudo, em ambas

as raças QM e MM, houve uma maior prevalência de PA nas formas unilateral, de forma isolada e não pruriginosa.

Em relação aos ectoparasitas, em animais sem ectoparasitas nos pavilhões auriculares a presença de placa aural foi menor. Dos animais positivos para placa aural, os equinos da raça Mangalarga Marchador apresentaram maior prevalência de ectoparasitas (63,9%) comparados a raça Quarto de Milha (36,1%) (tabela 2). Além disso, nos animais positivos para PA da raça QM, observou-se que a ausência de ectoparasitas foi estatisticamente maior que a presença desses na mesma raça (tabela 3). Essa diferença não foi observada nos animais da raça MM. Essas duas análises sugerem que equinos MM positivos para PA tendem a apresentar maior frequência de ectoparasitas nas orelhas.

Tabela 3 – Características dos animais em relação a raça (dentro) e com PA positivo, incluindo os intervalos para proporção com 95% de confiança (n=309).

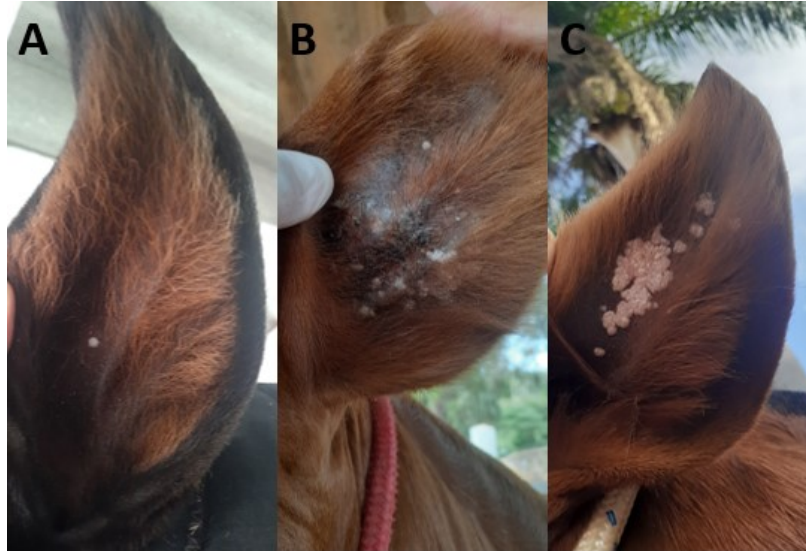
Variáveis		Raça fa (p%) [IC]		p-valor
		QM (n=143)	MM (n=166)	
Uni/bilateral	Unilateral	93 (65,0a) [56,6-72,8]	98 (59,0a) [51,1-66,6]	0,29
	Bilateral	50 (35,0b) [27,2-43,4]	68 (41,0b) [33,4-48,8]	
Isolada/Múltipla	Isolada	99 (69,2a) [61,0-76,7]	98 (59,0a) [51,1-66,6]	0,07
	Múltipla	44 (30,8b) [23,3-39,0]	68 (41,0b) [33,4-48,8]	
Pruriginosa	Não	139 (97,2a) [93,0-99,2]	160 (96,4a) [92,3-98,7]	0,75
	Sim	4 (2,8b) [0,8-7,0]	6 (3,6b) [1,3-7,7]	
Classificação	A	86 (60,1a) [51,6-68,2]	83 (50,0a) [42,1-57,8]	0,21
	B	17 (11,9c) [7,1-18,3]	25 (15,1b) [10,0-21,4]	
	C	40 (28,0b) [20,8-36,1]	58 (34,9a) [27,7-42,7]	
Ectoparasitas	Não	99 (69,2a) [61,0-76,7]	88 (53,0) [45,1-60,8]	<0,01
	Sim	44 (30,8b) [23,3-39,0]	78 (47,0) [39,2-54,9]	
Tosquia das orelhas	Não	126 (88,1a) [81,6-92,9]	103 (62,0a) [54,2-69,4]	<0,01
	Sim	17 (11,9b) [7,1-18,3]	63 (38,0b) [30,5-45,8]	
Manejo	Intensivo	75 (52,4a) [43,9-60,8]	81 (48,8a) [41,0-56,7]	0,02
	Semi	31 (21,7b) [15,2-29,3]	21 (12,6c) [8,0-18,7]	
	Extensivo	37 (25,9b) [18,9-33,9]	64 (38,6b) [31,1-46,4]	

fa: frequência absoluta; p.: proporção; IC: intervalo de confiança para proporção exato [19]. ¹p-valor teste de Qui-quadrado para independência, em negrito teste significativo à 5%, ou seja, não há independência, logo existe a dependência entre as variáveis.

Em ambas as raças, houve uma maior detecção de placa aural com até cinco lesões puntiformes (Classificação A), seguida pelas placas com característica coalescente (Classificação C), e posteriormente as placas que apresentam mais de cinco lesões puntiformes (Classificação B), representando o tipo de placa aural menos encontrado entre os animais positivos (tabela 3). Contudo, na raça Mangalarga Marchador, a quantidade de placa aural com

classificação A não apresentou diferença significativa da classificação C, já na raça Quarto de Milha observou-se essa diferença. Essas características foram representadas pela figura 1.

Figura 1 – Orelhas com lesões de placa aural. Classificação A — um a cinco pontos, B — multiponto, C — coalescente.



Dos 309 animais positivos para lesões de placa aural, apenas em quatro foram relatados uso de medicamentos para tratamento da doença, e em todos os casos foi utilizado tintura de iodo a 10% topicamente.

Das 30 biópsias coletadas, sendo 15 de equinos da raça QM e 15 da raça MM, 90% (27/30) foram positivas para pelo menos um tipo viral, sendo as três amostras negativas vindas de animais da raça Quarto de Milha. Nenhuma amostra foi positiva para os EcPV-2, 7, 8 e 9. Os EcPV's 4 e 6 foram os mais frequentemente encontrados em ambas as raças avaliadas, com maior evidência entre os animais da raça Mangalarga Marchador (80% e 73,3%), comparado aos animais QM (40% e 33,3%).

Quando avaliada a existência de coinfeção dos diferentes vírus, 55,5% (15/27) das amostras foram positivas para mais de um tipo viral. Houve uma maior presença de coinfeção entre os equinos da raça Mangalarga Marchador (73,3%, 11/15), comparado aos equinos da raça Quarto de Milha (26,7%, 4/15), com destaque para coinfeção de EcPV4 e 6, que representou 53,2% (8/15) das coinfeções encontradas, sendo 6,6% em QM e 46,6% em MM.

Já os papilomavírus encontrados isoladamente (12/27) foram o EcPV 1, 3, 4 e 6, com frequências de 8,3% (1/12), 8,3% (1/12), 66,6% (8/12) e 16,6% (2/12), respectivamente, com maior frequência nos equinos da raça Quarto de Milha (66,7%, 8/12) em relação aos

equinos da raça Mangalarga Marchador (33,3%, 4/12), que apresentaram apenas o EcPV 4 de forma isolada.

Não foram encontradas nenhuma associação ao avaliar as características da lesão, quanto a sua forma e classificação, com a presença de coinfeção e o tipo de papilomavirus.

Todas as amostras controle foram negativas e para confirmar a presença de DNA amplificável, as três amostras negativas para os EcPV's avaliados foram testadas para β -actina, sendo todas positivas.

4 DISCUSSÃO

A prevalência de placa aural nos equinos avaliados de 37,45% (309/825) no estado de Minas Gerais, demonstra que o vírus está amplamente distribuído no estado. Além da prevalência por equinos, importante destacar que 100% (53/53) dos haras visitados apresentaram pelo menos um animal positivo para placa aural. Alguns autores [14], avaliando a prevalência de placa aural nas diferentes regiões do Brasil, observaram maior frequência da doença em equinos da região Sudeste (25,7%) comparada às demais regiões do país, e também uma alta predominância por haras (85%). Esses dados podem representar um importante problema clínico no estado, uma vez que a presença de um animal positivo para placa aural pode significar maior risco a animais saudáveis, daquele mesmo ambiente, desenvolverem a enfermidade, visto que o mecanismo de transmissão do vírus é desconhecida [5,6] e, sabe-se que em outras formas de papilomatoses, o contato direto entre animais infectados pode transmitir a doença [20].

Apesar de muitos autores considerarem que as lesões de placa aural não possuem predileção racial, neste estudo foi observado que equinos da raça Mangalarga Marchador apresentam maior prevalência da enfermidade comparado a equinos da raça Quarto de Milha. Resultado semelhante foi observado em outro estudo [9], que apesar de não especificarem se os cavalos avaliados eram Mangalarga Marchador ou Paulista, identificaram uma prevalência de placa aural em 57% e 35% de equinos da raça Mangalarga e Quarto de Milha, respectivamente.

Na literatura não há relatos de que a placa aural apresenta predileção por sexo, função ou pelagem, o que confirma esse estudo. Já sobre a idade, a maioria dos autores identificaram que a enfermidade pode acometer cavalos de qualquer faixa etária, com menor ocorrência em equinos com menos de um ano [2, 21], o presente estudo corrobora essa afirmação, e um fato interessante e que no presente trabalho houve menor ocorrência em

equinos acima de 15 anos. Quando comparado as raças avaliadas, a maior prevalência de placa aurais em animais MM nas idades de 1 a 5 anos, ainda não havia sido descrita.

Pouco se sabe sobre a transmissão de placa aurais entre os animais [14]. A menor prevalência da doença em animais que não apresentaram ectoparasitas nos pavilhões auriculares, sugere a possibilidade de artrópodes transmitirem o PV, concordando com outros autores [6, 9]. Os equinos da raça MM, com placa aurais, apresentaram maior prevalência de ectoparasitas comparados aos equinos QM, sugerindo que na presença desses artrópodes, os equinos MM são mais susceptíveis a contraírem a enfermidade do que equinos QM.

Neste estudo, as lesões auriculares foram observadas com maior frequência como tipo A, com até cinco lesões puntiformes, seguida pelas placas caracterizadas como tipo C, coalescente, em ambas as raças avaliadas, mostrando que a raça não apresenta influencia em relação ao tipo de lesão. Em um estudo com 891 animais de diferentes raças, também se observou maior prevalência de lesões de classificação A [22].

Não houve nenhuma associação racial quanto a frequência de lesões uni ou bilaterais, nem quanto a frequência de lesões isoladas ou múltiplas. Esse achado difere de estudo onde encontraram maior prevalência de lesões bilaterais em equinos da raça Mangalarga comparados a equinos da raça QM [9].

Cavalos com placas aurais podem ser assintomáticos ou podem apresentar sinais de prurido ou hipersensibilidade, como relutância ao tocar a região auricular [21, 23]. Alguns autores [9] não encontraram sinais de prurido ou sensibilidade nos equinos Mangalarga e QM avaliados. Neste estudo, houve a presença de prurido, em poucos animais (3,2%), mostrando ser uma variável pouco comum. Em relação a sensibilidade, apesar de também não apresentar alta frequência, os equinos da raça MM com PA apresentaram maior sensibilidade ao toque comparado aos equinos QM.

Em relação a análise molecular das cepas virais envolvidas na enfermidade, 90% (27/30) apresentaram pelo menos um tipo viral, resultado similar à outras pesquisas [14, 24], cujas amostras positivas foram de 90,3% e 97,22%, respectivamente. Foram encontrados os tipos virais 1, 3, 4 e 6 de forma isolada, o que pode indicar maior capacidade de infecção desses vírus, possibilitando-os expressar patogenicidade de modo individual. Além disso, outros fatores podem influenciar na detecção de papilomavirus em uma mesma lesão, como a quantidade de DNA (que pode variar ao longo da lesão), como também o estado imunológico do animal [14].

Isoladamente, houve maior prevalência do EcPV4 (66,6%, 8/12) em ambas as raças avaliadas. Esse achado também foi observado em outro estudo [14], onde encontraram maior frequência desse EcPV de forma isolada em equinos sem raça definida, comparado a outros tipos virais. Investigando a prevalência de EcPVs no Brasil, observou-se em uma pesquisa [24], que o EcPV4 apresenta maior prevalência em todas as regiões do país, incluindo o Sudeste onde se encontra Minas Gerais, confirmando a predominância desse papilomavirus em placas aurais de equinos neste território.

Equinos da raça Mangalarga Marchador apresentaram apenas o EcPV4 de forma isolada, enquanto os equinos da raça Quarto de Milha, além do EcPV4, apresentaram os EcPVs 1, 3 e 6 isoladamente. A infecção isolada desses tipos virais no QM não foi identificada na literatura compilada, podendo indicar uma susceptibilidade dos equinos da raça QM a determinados tipos de PV, sendo necessária maior investigação desses EcPVs nessa raça.

Importante destacar o isolamento do EcPV1 em amostra de placa aural. Esse papilomavírus já havia sido detectado em placas aurais anteriormente apenas em coinfeções com um ou mais tipos de papilomavírus [14], sugerindo que não necessariamente ele participa do desenvolvimento das lesões auriculares, uma vez que está mais associada a papilomatose cutânea [25]. Contudo, neste estudo, foi encontrado esse tipo viral de forma isolada, sem associação com outros papilomavírus, confirmando sua patogenicidade como agente primário no desenvolvimento de lesões auriculares.

As coinfeções (55,5%, 15/27) foram mais frequentes comparadas aos tipos virais encontrados isoladamente (44,5%, 12/27). Equinos da raça MM (73,3%, 11/15) apresentaram maior índice de coinfeções comparados a equinos QM (26,7%, 4/15). Subentende-se que coinfeção se trate de mutualismo ou disputa entre os tipos virais pelo hospedeiro [26, 27]. Haverá uma menor frequência de coinfeção em casos de disputa, enquanto a frequência de coinfeção aumenta nos casos em que há sinergismo entre os tipos virais [27]. Dessa forma, a alta frequência de coinfeção dos vírus EcPV4 e 6 na raça MM, indica um possível caso de sinergismo desses vírus dentro da mesma lesão.

Alguns autores afirmam que as coinfeções são casualidades e cada tipo viral ocasiona a doença de forma independente [28, 29]. Contudo, outros sustentam que as coinfeções não são independentes do tipo viral e acontecem de forma frequente [30,31]. Em humanos, relata-se que uma pessoa já infectada por um tipo viral apresenta maior chance de se infectar por outro tipo viral [32], circunstância que pode ocorrer com animais infectados com

EcPV4, visto que esse tipo viral é o mais constantemente encontrado em coinfeções ou de forma isolada, neste estudo e em outras literaturas [14, 24].

Não há muitos relatos de frequência de coinfeções de papilomavírus em placa aural de equinos. Alguns autores [33] relataram coinfeção em 15,56% (7/45) das amostras para os EcPVs 3 e 4, enquanto em outro estudo [14], detectaram 59,05% (62/105) das amostras positivas para dois ou mais tipos de papilomavirus equinos, incluindo a identificação dos EcPVs 1, 5 e 6 pela primeira vez no Brasil. Neste estudo, semelhante a outro anterior [14], o EcPV5 foi encontrado apenas em coinfeções, tanto nos animais da raça QM quanto da raça MM, sugerindo que esse tipo viral apresenta baixa patogenicidade para gerar lesões de placa aural em equinos como agente primário.

Todas as coinfeções encontradas neste estudo, tanto da raça MM quando da raça QM, apontaram a presença do EcPV4 ou do EcPV6, mostrando que, entre os papilomavírus envolvidos em coinfeções na placa aural, estes são mais patogênicos. Anteriormente, autores encontraram esses EcPVs em 98,3% (61/62) dos casos de coinfeções em sua pesquisa [14].

A ausência dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 nas lesões de placa aural, era previsto, uma vez que os EcPVs 2, 7 e 9 estão mais relacionadas as lesões genitais, e o EcPV8 relacionado a lesões generalizadas [12, 34, 35, 36]. Apesar dos EcPVs 8 e 9 representarem uma infecção viral para a qual os dados ainda são limitados, sua ausência era esperada, uma vez que os animais avaliados não apresentaram outras lesões fora dos pavilhões auriculares. A ausência de detecção desses EcPVs nas amostras coletadas, sugere que estes EcPVs não têm relação com a etiologia da enfermidade no estado de Minas Gerais.

Neste estudo não foram encontradas associações significativas ao avaliar as características da lesão com a presença de coinfeção e o tipo de papilomavirus, pois de forma geral, as frequências das variáveis foram similares. Poucos são os dados na literatura que descrevam essas associações. Há relatos [14] onde observaram que os EcPVs 1, 3, 4 e 6 foram mais frequentemente isolados de lesões individuais, seguidas de lesões coalescentes, enquanto nessa pesquisa, os EcPVs 1, 4 e 6 foram mais frequentes em lesões coalescentes, o EcPV 3 em lesões multiponto e o EcPV 5 em lesões individuais, não demonstrando um padrão claro do tipo viral com respeito às características da lesão. Em humanos, o tipo de lesão encontrada possibilita a classificação dos HPVs em alto e baixo risco [37]. Possivelmente existe alguma relação entre os aspectos da lesão e o tipo viral que não foi demonstrada nesse estudo, sendo necessária maior investigação com um tamanho maior de amostra e outras técnicas de análise.

5 CONCLUSÕES

A alta prevalência de animais infectados com placa aural, tanto em relação ao número total de animais, quanto na detecção de animais acometidos por haras visitados, revela a ampla distribuição dessa enfermidade no estado de Minas Gerais.

Equinos da raça Mangalarga Marchador apresentaram maior frequência de placa aural – com destaque para animais com idade entre 1 a 5 anos, maior sensibilidade ao toque e maior susceptibilidade de infecção na presença de ectoparasitas, comparado a equinos da raça Quarto de Milha.

A detecção dos EcPVs 1, 3, 4, 5 e 6 nas amostras coletadas para biópsia, confirmam a associação desses tipos virais à etiologia da placa aural. A identificação do EcPV1 de forma isolada em lesão de placa aural é significativa, uma vez que esse tipo viral só havia sido encontrado em coinfeções, revelando agora seu desempenho como agente primário no desenvolvimento de lesões auriculares. A maior frequência do EcPV4 em ambas as raças avaliadas, demonstra a alta patogenicidade desse tipo viral para placa aural em equinos.

A ausência de detecção dos EcPVs 2, 7, 8 e 9 nas amostras de lesões auriculares coletadas em diferentes regiões de Minas Gerais, sugere que estes EcPVs não estão associados com a papilomatose auricular nesse estado do país.

Não foram detectadas associações significativas entre as raças, as características da lesão, o tipo viral encontrado e presença de coinfeções. Contudo, equinos da raça MM (73,3%) apresentaram maior índice de coinfeções comparados a equinos QM (26,7%), com destaque para a associação dos EcPVs 4 e 6. Isso sugere uma maior susceptibilidade dessa raça à coinfeções desse tipo viral, sendo necessária maior investigação para confirmar tal pressuposto.

6 REFERÊNCIAS

1. ALFIERI, A; ALFIERI, A; WOSIACKI, S. Papillomaviridae. Em: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, cap. 15, p.397-412, 2007.
2. BINNINGER, C. E.; PIPER, R. C. Hyperplastic dermatitis of equine ear. Journal of the American Animal Medical Association, v. 153, p. 69-75, 1968. In: TORRES, S.M.F; MALONE, E.D; WHITE, S.D; KOCH, S; WATSON, J.L. The efficacy of imiquimod 5% cream (Aldara?) in the treatment of aural plaque in horses: a pilot open-label clinical trial. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 503-509, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00877.x>
3. KNOTTENBELT, D. C.; PASCOE, R. R. Sistema Tegumentar. Em: ____ **Afecções e Distúrbios do Cavallo**. São Paulo: Editora Manole Ltda, cap. 8, p. 280, 1998.

4. 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**, 71: 28–33, 2007.
5. FAIRLEY, R. A.; HAINES, D. M. The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 70-81, 1992. <https://doi.org/10.1177%2F030098589202900110>
6. SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Neoplasms, cysts, hamartomas and keratoses. In: _____. **Equine Dermatology**. Maryland Heights: Elsevier Saunders, 2003. chap.16, p. 468-472.
7. SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. eds. Equine Dermatology. 2nd ed. **Maryland Heights, MO: Elsevier**, 2011:317–327.
8. TORRES, S. M. F.; KOCH, S. N. Papillomavirus-Associated Diseases. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.29, p. 643-655, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2013.08.003>
9. SOUSA, N. R.; ADORNO, V. B.; MARCONDES, J. S.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; CONCEIÇÃO, L. G.; AMORIM, R. L.; BORGES, A. S. Características clínicas e histopatológicas da placa aural em equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha. **Pesq. Vet. Bras.** 28(6). P.279-284. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000600004>
10. LANGE, C.E.; TOBLER, K.; ACKERMANN, M. *et al.* Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. **Vet Microbiol** 2011; 149: 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.019>
11. TANIWAKI, S. A; MAGRO, A. J; GORINO, A. C; OLIVEIRA-FILHO, J. P; FONTES, M. R. M; BORGES, A. S; ARAUJO JR, J. P. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 85-93, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.025>
12. LANGE, C.E.; VETSCH, E.; ACKERMANN, M. *et al.* Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. **J Gen Virol** 2013; 94: 1,365–1,372. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052092-0>
13. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2021. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br> . Acesso em: 08 de maio de 2023.
14. MIRA J.; HERMAN, M.; ZAKIA, L. S.; OLIVO, G.; ARAUJO JR, J. P.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. P. Frequency of Equus caballus papillomavirus in equine aural plaques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2018; 30(4):565-568. <https://dx.doi.org/10.1177%2F1040638717753495>
15. 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>
16. 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>
17. BOMBERGER, C. R. Detecção dos Equus caballus papillomavirus em amostras de placa aural equina. 2023. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/242541>>.

18. 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>
19. LEEMIS, L. M.; TRIVEDI, K. S. A comparison of approximate interval estimators for the bernoulli parameter. **The American Statistician.** Alexandria, v. 50, n. 1, p. 63-68, Feb.1996. <https://doi.org/10.2307/2685046>
20. JOHNSON, P. J. Dermatologic tumors (excluding sarcoids). **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** 14(3):625-658, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30190-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30190-6)
21. TORRES, S. M. F.; MALONE, E. D.; WHITE, S. D.; KOCH, S.; WATSON, J. L. The efficacy of imiquimod 5% cream (Aldara?) in the treatment of aural plaque in horses: a pilot open-label clinical trial. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 503-509, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00877.x>
22. MIRA J.; HERMAN, M.; ZAKIA, L. S.; OLIVO, G.; ARAUJO JR, J. P.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. P. Factors associated with equine aural plaque in Brazil. **Vet Dermatol**, 27:408–e104, 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12360>
23. KNOTTENBELT, D. C. Viral papillomatosis. In: KNOTTENBELT, D. C., editor. **Pascoe's principles & practice of equine dermatology.** Philadelphia: WB Saunders; p. 134, 2009.
24. ZAKIA, L. S.; HERMAN, M.; BASSO, R. M.; HERNADEZ, 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**, 12(1), 1 – 4, 2019. <http://dx.doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4>
25. GHIM, S.J; RECTOR, A; DELIUS, H; SUNDBERG, J.P; JENSON, A.B; VAN RUNST, M. Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 324, p. 1108-1115, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.154>
26. ROUSSEAU, M. C.; PEREIRA, J. S.; PRADO, J. C. M.; VILLA, L. L.; ROHAN, T. E.; FRANCO, E. L. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1508-1517, 2001. <https://doi.org/10.1086/324579>
27. MEJLHEDE, N.; PEDERSEN, B. V.; FRISCH, M.; FOMSGAARD, A. Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy?. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 346–352, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.2602.x>
28. CHATURVEDI, A. K.; KATKI, H. A.; HILDESHEIM, A.; RODRIGUEZ, A. C.; QUINT, W.; SCHIFFMAN, M.; VAN DOORN, L. J.; PORRAS, C.; WACHOLDER, S.; GONZALEZ, P.; SHERMAN, M. E.; HERRERO, R. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 910-920, 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.00087-13>
29. CAMPOS, N. G; RODRIGUEZ, A. C; CASTLE, P. E; HERRERO, R; HILDESHEIM, A; KATKI, H; KIM, J. J; WACHOLDER, S; MORALES, J; BURK, R.D; SCHIFFMAN, M. Persistence of Concurrent Infections with Multiple Human Papillomavirus Types: A

- Population- based Cohort Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 823-827, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq131>
30. THOMAS, K. K.; HUGHES, J. P.; KUYPERS, J. M.; KIVIAT, N. B.; LEE, S-K.; ADAM, D. E.; KOUTSKY, L. A. Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 1097- 1102, 2000. <https://doi.org/10.1086/315805>
31. GOLDMAN, B; REBOLJA, M; RYGAARDB, C; PREISLERB, S; EJEGODB, D.M; LYNGBEA, E; BONDE, J. Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark. **Vaccine**, v. 31, p. 1604-1609, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.084>
32. ROSITCH, A. F.; POOLE, C.; HUDGENS, M. G.; AGOT, K.; NYAGAYA, E.; MOSES, S.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J.; BAILEY, R. C.; SMITH, J. S. Multiple Human Papillomavirus Infections and Type Competition in Men. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1-10, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir709>
33. 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>
34. 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>
35. DE PAOLIS, L.; DE CIUCIS, C. G.; PELETTI, 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>
36. 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>
37. DOORBAR, J; QUINT, W; BANKS, L; BRAVO, I.G; STOLER, M; BROKER, T.R; STANLEY, M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30S, p. F55-F70, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>

ANEXOS

ANEXO I – Ficha de identificação dos animais

FICHA N° _____ – ANIMAIS

Idade () Até 1a () De 1 a 3a () De 3 a 5a () De 5 a 8a () De 8 a 10a () De 10 a 15a () Mais de 15 anos

Sexo () M () F

Raça () QM () MM

Função () ESPORTE () LAZER () PISTA () TRAÇÃO Pelagem: -
_____Presença de mosquitos () SIM () NÃO
() SIM () NÃO

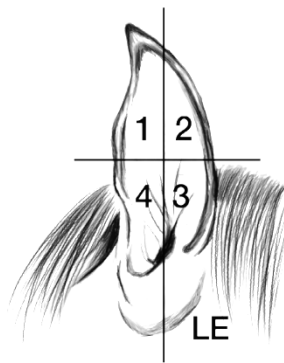
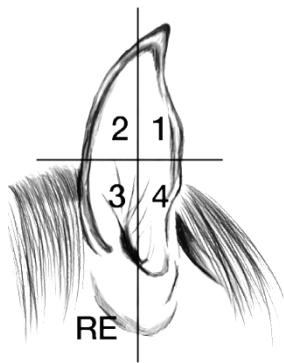
Presença de ectoparasitas nas orelhas ()

Bovinos na propriedade () SIM () NÃO
Extensivo

Manejo () Intensivo () Semi ()

Tosquia das orelhas () SIM () NÃO

TEM PLACA AURAL () SIM () NÃO



Se sim: () Unilateral ou () Bilateral

() Isolada ou () Múltipla

() Pruriginosa ou () Não pruriginosa

Tem sensibilidade auricular () SIM () NÃO

Classificação () A () B () C

Já foi realizado tratamento () SIM () NÃO

Se sim, qual?
