

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ADRIANE FERRARESI ROBERTO

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ESFOLIATIVO PARA DIAGNÓSTICO DE
PLACA AURAL EM EQUINOS

UBERLÂNDIA
2026

ADRIANE FERRARESI ROBERTO

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ESFOLIATIVO PARA DIAGNÓSTICO DE
PLACA AURAL EM EQUINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Ciências Agrárias

Orientador: Diego José Zanzarini Delfiol

UBERLÂNDIA
2026

ADRIANE FERRARESI ROBERTO

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ESFOLIATIVO PARA DIAGNÓSTICO DE
PLACA AURAL EM EQUINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Ciências Agrárias

Uberlândia - MG, 2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol (FMVZ UFU)

M.V Esp. Dara Santos Alves (FMVZ UFU)

Prof. Dr. Geison Morel Nogueira (FMVZ UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais, Acássio (*in memoriam*) e Rose. Ao meu pai, cuja memória sempre ilumina meu caminho, e à minha mãe, por ser meu porto seguro, minha maior incentivadora e a força que tornou este sonho possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me sustentar em todos os momentos desta caminhada, concedendo-me força e sabedoria para superar cada desafio.

À minha mãe, Rose Ferraresi Roberto, por ser meu maior exemplo de amor, dedicação e força. Obrigada por cada renúncia, cada incentivo e por nunca medir esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Nos momentos em que eu duvidei de mim mesma, foi você quem acreditou por nós duas. Esta conquista é tão sua quanto minha.

Ao meu pai, Acássio Cardoso Roberto (*in memoriam*), que não está aqui para presenciar este momento. Em cada conquista da minha vida existe um pouco de você, e este trabalho é mais uma delas.

À minha irmã, Amanda Ferraresi Roberto, que, mesmo a quilômetros de distância, nunca deixou de acreditar em mim. Obrigada por todo o carinho, incentivo e por sempre torcer pelas minhas vitórias como se fossem as suas.

A toda a minha família, de Uberlândia e de Pacaembu, por terem sido meu porto seguro ao longo dessa jornada. Obrigada por me lembrarem, tantas vezes, que eu nunca estive sozinha.

Ao meu namorado, Tomás Cardoso Vieira, por ser minha força nos dias difíceis, acalmar minhas inseguranças e celebrar comigo cada pequena e grande conquista. Seu apoio, paciência e amor tornaram essa trajetória muito mais leve e especial.

Às minhas amigas, Fernanda Vitorino e Isabela Araújo, por dividirem comigo as alegrias, as angústias, os desafios e as conquistas ao longo desses anos. Ter vocês ao meu lado fez toda a diferença.

À minha amiga de pesquisa, Dara Alves, pela paciência, generosidade e disposição em compartilhar seus conhecimentos.

Ao Grupo de Estudos em Equídeos da UFU (GEEq), por ter sido essencial para minha formação, contribuindo para meu amadurecimento e por me apresentar tantas pessoas incríveis dentro e fora da universidade.

Aos meus professores, Geison Morel e Hugo Toma, por todo o conhecimento transmitido, pela dedicação ao ensino e pelo cuidado com minha formação.

Ao Hospital Veterinário da UFU, principalmente o Setor de Grandes Animais, pelos ensinamentos, experiências e oportunidades que marcaram minha trajetória acadêmica.

Ao meu professor orientador, Diego Delfiol, pela confiança, paciência e ensinamentos. Agradeço pelas inúmeras oportunidades proporcionadas durante minha trajetória acadêmica, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os
seus planos serão bem-sucedidos.”

(Provérbios 16:3)

RESUMO

A placa aural é uma enfermidade dermatológica viral que acomete o pavilhão auricular de equídeos, causada por diferentes genótipos do papilomavírus equino (EcPVs). Tais lesões manifestam-se pela perda de pigmentação e de queratinização da região acometida. As mudanças causadas pela enfermidade influenciam negativamente no valor comercial dos equinos, uma vez que prejudicam a participação dos animais em exposições, leilões e competições. O diagnóstico de placa aural baseia-se no uso de biópsia, realizada através do *punch* de 6 a 8 mm, o qual permite a coleta de fragmentos de pele. As amostras colhidas são submetidas à análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma vez que apresenta alta sensibilidade para detecção do DNA viral. O método em questão é considerado invasivo e necessita de curativos diários no local até a completa cicatrização. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a utilização da cureta dermatológica de 2 mm como método alternativo para a coleta de amostras destinadas ao diagnóstico molecular da placa aural, buscando um procedimento menos invasivo, mais rápido e de menor custo. Sendo assim, foram colhidas amostras de 101 lesões clinicamente sugestivas de placa aural provenientes de 79 equinos, utilizando-se a cureta dermatológica e a biópsia por *punch* para a coleta. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos utilizados na coleta ($p > 0,05$). Além disso, o método esfoliativo demonstrou elevada concordância, com destaque ao EcPV-3 (0,936) no índice Kappa. Ainda, foram observados valores de sensibilidade e especificidade equivalentes ao uso do *punch*, principalmente para EcPV-1 (84,2%), EcPV-3 (100%) e EcPV-6 (71,4%). Dessa forma, a curetagem esfoliativa mostrou-se comparável à biópsia por *punch* para a detecção molecular dos principais genótipos de EcPV avaliados, apresentando potencial como método alternativo de coleta para o diagnóstico da placa aural.

Palavras-chave: pavilhão auricular; dermatopatia; cavalo; papilomavírus.

ABSTRACT

Aural plaque is a viral dermatological disease that affects the pinna of equids and is caused by different genotypes of equine papillomavirus (EcPVs). These lesions are characterized by loss of pigmentation and keratinization in the affected region. The changes caused by the disease negatively affect the commercial value of horses, as they may impair their participation in shows, auctions, and competitions. The diagnosis of aural plaque is based on biopsy using a 6–8 mm punch biopsy, which allows the collection of skin fragments. The collected samples are subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis due to its high sensitivity for viral DNA detection. This method is considered invasive and requires daily wound care until complete healing. In this context, this study aimed to evaluate the use of a 2 mm dermatological curette as an alternative method for sample collection intended for the molecular diagnosis of aural plaque, seeking a less invasive, faster, and more cost-effective procedure. Thus, samples from 101 lesions clinically suggestive of aural plaque from 79 horses were collected using a dermatological curette and punch biopsy. The results demonstrated that there was no statistically significant difference between the sampling methods ($p > 0.05$). Furthermore, the exfoliative method demonstrated high agreement, particularly for EcPV-3, with a Kappa index of 0.936. Additionally, sensitivity and specificity values comparable to those obtained using the punch biopsy were observed, particularly for EcPV-1 (84.2%), EcPV-3 (100%), and EcPV-6 (71.4%). Therefore, exfoliative curettage proved comparable to punch biopsy for the molecular detection of the main EcPV genotypes evaluated, demonstrating potential as an alternative sampling method for the diagnosis of aural plaque.

Keywords: auricular pinna; dermatopathy; horse; papillomavirus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxa de detecção de EcPVs por PCR de acordo com o método de coleta utilizado.....	23
Tabela 2 -	Percentual de resultados positivos e negativos nas análises de PCR para os tipos de EcPV, segundo o método de coleta.....	23
Tabela 3 -	Percentual de resultados positivos para os tipos de EcPV detectados por PCR, segundo o método de coleta utilizado, considerando 101 análises para cada tipo viral.....	24
Tabela 4 -	Comparação da detecção dos tipos de EcPV entre os métodos de coleta por <i>punch</i> e cureta dermatológica por meio do teste de McNemar's.....	25
Tabela 5 -	Índice Kappa e interpretação da concordância entre os métodos de coleta para detecção dos tipos de EcPV.....	25
Tabela 6 -	Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia da cureta dermatológica na detecção dos diferentes tipos de EcPV.....	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Papilomavírus	12
2.1.1	Ciclo de replicação viral.....	13
2.1.2	Genótipos de papilomavírus	13
2.2	Placa aural.....	14
2.2.1	Epidemiologia.....	15
2.2.2	Sinais clínicos	16
2.2.3	Apresentação histopatológica da placa aural.....	16
2.2.4	Transmissão.....	17
2.2.5	Diagnóstico	18
2.2.6	Tratamento.....	19
3	METODOLOGIA.....	20
3.1	Cureta dermatológica	21
3.2	Biópsia por <i>punch</i>	21
3.3	Processamento das amostras no laboratório	21
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A placa aurál é decorrente de uma infecção de caráter viral, que acomete a porção interna do pavilhão auricular de equinos, de natureza benigna (Lange et al., 2011; Linder et al., 2018; Scase et al., 2010; Torres; Koch, 2013; Turco et al., 2023). O agente etiológico da doença são os papilomavírus equino (EcPVs), pertencentes à família *Papillomaviridae*. Em equinos, a infecção pode acontecer por diferentes tipos de EcPVs, que variam do 1 ao 10, o que resulta em desenvolvimento de neoplasias benignas, como papilomas, ou malignas, como o carcinoma de células escamosas

Mira et al. (2018) constataram que a maior frequência de placa aurál em equinos ocorre na região sudeste do Brasil (25,7%). Adicionalmente, Rodrigues et al., (2025) conduziram um estudo no estado de Minas Gerais, no qual 37,5% (309/825) dos animais avaliados foram positivos para a doença. Os equinos acometidos apresentam redução do valor comercial, o que prejudica a participação em exposições, competições e leilões (Sousa et al., 2008), além de impactar negativamente o bem-estar animal. Dessa forma, nota-se a importância do diagnóstico e adoção de medidas preventivas, visando a redução da prevalência de placa aurál no país e promoção do bem-estar dos equinos.

Ademais, o diagnóstico é crucial para a adoção de um tratamento adequado que minimize as perdas econômicas causadas pela enfermidade. O diagnóstico sugestivo é realizado a partir de aspectos clínicos da lesão e de sua localização, características típicas da doença. Porém, tal forma de diagnóstico não permite a identificação do tipo viral. Sendo assim, atualmente, o método de diagnóstico com maior sensibilidade é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), realizada a partir de amostras de biópsia da lesão do pavilhão auricular do animal. Nesse cenário, o uso da biópsia é considerado invasivo pela lesão de pele causada, além da necessidade de curativos diários da região até a cicatrização completa da lesão. Em virtude dessa característica do procedimento, a técnica apresenta aceitação limitada por parte dos proprietários, o que implica maior dificuldade na possibilidade de diagnóstico precoce da doença.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a eficácia de um método esfoliativo da região interna do pavilhão auricular de equinos acometidos por placa aurál, por meio de uma cureta dermatológica. O método esfoliativo busca uma alternativa ao uso da biópsia no diagnóstico, ao garantir não só um procedimento menos traumático ao animal, mas também um processo que não necessite do uso de contenção química. Sendo assim, propõe-se um método de diagnóstico mais acessível e rápido, garantindo maior adesão dos proprietários de equinos e o bem-estar animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Papilomavírus

Os papilomavírus, pertencentes à família *Papillomaviridae*, são vírus pequenos (52 a 55 nanômetros de diâmetro) com DNA de fita dupla circular, capsídeo de simetria icosaédrica e possuem a capacidade de infectar todos os vertebrados (Zur Hausen, 2009). O vírus apresenta tropismo específico pelo tecido epitelial escamoso, queratinizado ou não queratinizado (Antonsson; Hansson, 2002; Antonsson; McMillan, 2006; Bravo; Félez-Sánchez, 2015).

Em equinos, a infecção pode acontecer por diferentes tipos de papilomavírus equino (EcPV), com variação de 1 a 10, e desenvolve neoplasias benignas, como papilomas, ou malignas, como o carcinoma de células escamosas. Embora os papilomavírus sejam altamente espécie/tecido específicos (Bernard, 2005), o sarcoide, enfermidade neoplásica associada ao papilomavírus, apresenta etiologia relacionada à infecção por papilomavírus bovinos (BPV1 e BPV2) (Munday; Kiupel, 2010; Nasir; Brandt, 2013; Valentine, 2006; Wobeser et al., 2010).

Os papilomavírus equinos são classificados em três gêneros: *Zetapapillomavirus*, que inclui apenas o EcPV1; *Dyoiotapapillomavirus*, composto pelos tipos EcPV-2, EcPV-4 e EcPV-5; e *Dyorhopapillomavirus*, que engloba os tipos EcPV-3, EcPV-6 e EcPV-7. Entretanto, os tipos EcPV-8, EcPV-9 e EcPV-10 ainda não foram formalmente classificados nos gêneros descritos. Apesar disso, estudos relatam que esses tipos apresentam estreita relação filogenética com o EcPV-2, sugerindo sua possível inclusão no gênero *Dyorhopapillomavirus* (Munday et al., 2024).

Por serem considerados vírus não envelopados, apresentam relativa resistência às condições ambientais, podendo manter-se viáveis fora do hospedeiro por períodos prolongados, além de demonstrarem resistência à ação de solventes lipídicos, como éter e clorofórmio (King et al., 2012).

A infecção do hospedeiro pelo papilomavírus depende da existência de uma porta de entrada, visto que o vírus não é capaz de atravessar ativamente as barreiras orgânicas (Nasir; Brandt, 2013). Assim, a presença prévia de lesões epiteliais torna-se necessária para expor a camada basal do epitélio e possibilitar a infecção viral (Longworth; Laimins, 2004).

Ainda, são facilmente detectados na pele de animais saudáveis ou daqueles que apresentam enfermidades e, uma vez que são considerados epiteliotrópicos, podem causar lesões proliferativas na pele e em mucosas (Antonsson; Hansson, 2002; Bravo; Félez-Sánchez, 2015), com manifestações clínicas que variam desde a verrugas autolimitantes até a formação de tumores de caráter invasivo. Porém, em geral, são consideradas infecções subclínicas. De

acordo com estudos realizados por Bravo; Félez-Sánchez (2015), o aparecimento das lesões dependem do genótipo viral, características do epitélio, tipo de hospedeiro e ambiente.

Os equinos são comumente infectados pelos papilomavírus, que podem se manifestar de formas distintas, como o carcinoma de células escamosas, sarcóide, papilomatose genital, papilomatose clássica e papilomatose auricular, ou comumente referida como placa aural (Scott; Miller, 2011).

2.1.1 Ciclo de replicação viral

De acordo com o ciclo de vida do papilomavírus, a infecção depende da ocorrência prévia de microtraumas epiteliais, os quais permitem o acesso dos microrganismos às células da camada basal do epitélio, principal sítio de infecção e replicação viral (Doorbar, 2005). Através da exposição da camada basal pelo microtrauma, tem-se a exposição de células de alta divisão, as quais facilitam a expressão do genoma viral (Longworth; Laimins, 2004). Dessa forma, os papilomavírus apresentam dependência do processo de diferenciação epitelial para completar seu ciclo de vida (Doorbar, 2005). As principais células que são infectadas são os queratinócitos, localizados no epitélio escamoso (Longworth; Laimins, 2004).

Os papilomavírus não apresentam a capacidade de penetrar ativamente as barreiras do epitélio (Nasir; Brandt, 2013). Dessa maneira, a formação de microfissuras no epitélio, que podem ser resultantes do repasto sanguíneo de insetos hematófagos, pode gerar portas de entrada para o vírus (Scott; Miller, 2011). Adicionalmente, a presença de vetores mecânicos pode favorecer a transmissão viral (Scott; Miller, 2011).

Além disso, os vírus podem permanecer em estado de latência, infectando as células do epitélio basal e, em situações de imunossupressão, podem promover uma replicação viral intensificada, resultando em uma reativação da infecção (Maglennon; Doorbar, 2012).

2.1.2 Genótipos de papilomavírus

Na espécie equina, foram identificados dez tipos de papilomavírus específicos, os *Equus caballus papillomavirus* (EcPV1-10), são considerados altamente específicos quanto à espécie e ao tropismo do tecido (Bernard et al., 2010; King et al., 2012). Contudo, alguns vírus possuem potencial de infecção em outras espécies, como por exemplo o papilomavírus bovino, *Bos Taurus papillomavirus* (BPV-1, BPV-2) (Nasir; Brandt, 2013) e (BPV-13) (Alfieri; Lunardi; Alfieri, 2012).

A identificação de papilomavírus em lesões de placa aural foi estabelecida a partir de estudos moleculares que identificaram, por meio da PCR, os genótipos EcPV-1, EcPV-3, EcPV-4, EcPV-5 e EcPV-6 como os principais causadores da enfermidade (Lange et al., 2011; Taniwaki et al., 2013; Lange et al., 2013; Zakia et al., 2015). Estudos realizados por Mira et al., (2018) demonstraram que, em comparação aos demais tipos virais, o EcPV-4 foi o mais frequentemente detectado tanto em coinfeções (84%) quanto como único vírus identificado (32%), o que também é confirmado em estudos realizados por Rodrigues et al., (2025), que descrevem maior prevalência de EcPV4 (67%; 8/12) nas raças avaliadas.

O EcPV1 tem sido descrito, predominantemente, por codeteção viral, em associação com outros tipos virais (Mira et al., 2018). De acordo com Peters-Kennedy et al. (2019), o EcPV8 pode ser responsável pelo desenvolvimento de placa aural, pois desenvolve lesões generalizadas que incluem o pavilhão auricular. A presença da codeteção viral em equinos da raça Mangalarga Marchador apresenta maior índice quando comparada ao Quarto de Milha, com maior ênfase para associação dos EcPVs 4 e 6 (Rodrigues et al., 2025).

2.2 Placa aural

A placa aural é uma enfermidade dermatológica benigna de caráter viral, causada pelo papilomavírus, que acomete a face interna do pavilhão auricular de equinos (Figura 1) (Lange et al., 2011; Linder et al., 2018; Torres; Koch, 2013; Turco et al., 2023). Nessas condições, de acordo com Reed, Bayly e Sellon (2021), há a manifestação de lesões que podem ser isoladas ou agrupadas, com superfícies lisas a elevadas, brancas a acinzentadas marcadas por perda da pigmentação e deposição de queratina.

A enfermidade descrita pode ocasionar a formação de pápulas esbranquiçadas, medindo entre 1 e 2 mm de diâmetro, que podem coalescer e evoluir para placas queratinizadas (Scott; Miller, 2011). As lesões podem apresentar aspecto verrucoso, estendendo-se por toda a superfície interna do pavilhão auricular (Sousa et al., 2008).

Também chamada de papilomatose auricular, afeta pelo menos 22% dos equinos (Torres et al., 2010) e não apresenta predisposição claramente estabelecida quanto ao sexo, raça ou idade. Entretanto, há relatos de maior ocorrência em equinos que possuem idade superior a um ano (Torres; Koch, 2013). A enfermidade pode afetar uma ou ambas as orelhas e ser caracterizada em lesões individuais, múltiplas ou que coalescem, formando placas (Jackson, 2003; Scott; Miller, 2003).

Os papilomavírus associados à enfermidade pertencem aos gêneros *Dyoyotapapillomavirus* e *Dyorhopapillomavirus* (Bromberger et al., 2023; Mira et al., 2018).

Os equinos acometidos pela placa aural podem desenvolver certo grau de hipersensibilidade na região acometida ou ser assintomáticos (Scott; Miller, 2003; Torres; Koch, 2013). Na literatura há relatos de que a regressão espontânea dessas lesões é considerada rara (Binniger; Piper, 1968).

Figura 1- Placa aural localizada na porção interna do pavilhão auricular esquerdo de um equino.



Fonte: Arquivo pessoal

2.2.1 Epidemiologia

No Brasil, a doença é difundida em diferentes regiões do país, tanto isolada quanto associada a uma codeteção. O estudo realizado por Mira et al. (2018), relatou que 97% das amostras coletadas compatíveis com placa aural foram positivas para pelo menos um genótipo viral, com maior proporção de amostras provenientes da região Sudeste (25.7%). Além disso, nesse mesmo estudo, demonstrou-se que 85% dos haras visitados apresentam pelo menos um animal com diagnóstico de placa aural. A explicação para a distribuição geográfica dos genótipos virais pode estar associada a fatores como clima, manejo e sistema imune do hospedeiro, conforme descrito na literatura (Scott; Miller, 2011).

Rodrigues et al., (2025), em um estudo desenvolvido no estado de Minas Gerais, relatou que 100% dos locais visitados apresentavam pelo menos um animal positivo para placa aural e que 37.45% (309/825) dos animais avaliados clinicamente eram acometidos pela enfermidade. Esses dados evidenciam a ampla difusão do vírus pelo estado. Adicionalmente, o referido estudo, concluiu que os equinos da raça Mangalarga Marchador apresentam maior acometimento por placa aural, predominantemente em animais com 1 a 5 anos de idade, em

comparação aos da raça Quarto de Milha, reforçando os achados previamente descritos por Sousa et al. (2008).

Portanto, observa-se que no Brasil, mais especificamente em Minas Gerais, há uma alta distribuição da enfermidade e alta prevalência de animais infectados. Além disso, no estudo conduzido por Rodrigues et al., (2025), não foi detectada a presença dos tipos EcPV-2, EcPV-7, EcPV-8, EcPV-9 e EcPV-10, o que sugere a ausência de associação desses genótipos com a placa aural em equinos avaliados no estado de Minas Gerais.

2.2.2 Sinais clínicos

A placa aural pode ocorrer sob diferentes apresentações clínicas, desde lesões puntiformes até a formação de placas bem distribuídas pela superfície da porção interna do pavilhão auricular (Thomsett, 1979). Logo, Mira et al. (2018) categorizaram as lesões em três grupos: as do tipo A, caracterizadas por até cinco lesões puntiformes, são mais frequentes de serem encontradas, as lesões B, compostas por múltiplas lesões puntiformes e, por fim, tipo C definido pelas lesões coalescentes.

Os cavalos podem apresentar respostas distintas associadas à placa aural, variando desde uma infecção subclínica, ou seja, assintomática, até lesões com sinais de prurido, hipersensibilidade e dor (Knottenbelt, 2009; Torres et al., 2010).

2.2.3 Apresentação histopatológica da placa aural

A placa aural é caracterizada, histologicamente, por alterações presentes na epiderme, sendo o exame histopatológico considerado importante para a caracterização das placas aurais e sua diferenciação de outras dermatopatias que podem apresentar alterações semelhantes (Fairley; Haines, 1992; Postey et al., 2007).

Entre as principais alterações histológicas, destacam-se a hiperqueratose ortoqueratótica do estrato córneo e a hiperplasia epidérmica, geralmente acompanhadas por alterações nos queratinócitos das camadas mais superficiais da epiderme (Fairley; Haines, 1992). Essas alterações estão relacionadas ao ciclo de replicação dos papilomavírus, uma vez que possui como principais células-alvo os queratinócitos (Longworth; Laimins, 2004).

Fairley e Haines (1992) descreveram a presença de células aumentadas, com citoplasma claro e grânulos semelhantes aos de querato-hialina, compatíveis com coilócitos. Essas células foram observadas principalmente no estrato granuloso e na porção mais superficial do estrato espinhoso, podendo ocorrer de forma isolada ou agrupadas em pequenos conjuntos. Além disso,

os autores identificaram antígenos de papilomavírus nos núcleos de coilócitos presentes nessas regiões da epiderme, reforçando a associação entre essas alterações citológicas e a infecção por papilomavírus nas placas aurais (Fairley; Haines, 1992).

Além das alterações citadas também podem ser observadas alterações como o aumento da atividade mitótica das células da camada basal. Adicionalmente, a hipomelanose, caracterizada pela redução da pigmentação da epiderme, também é descrita como uma alteração histopatológica, podendo estar relacionada à redução ou distribuição irregular da melanina nos queratinócitos (Fairley; Haines, 1992; Postey et al., 2007).

A utilização de amostras histológicas também possibilitou o avanço da investigação molecular dos papilomavírus associados às placas aurais. Zakia et al. (2015) avaliaram amostras de placas aurais fixadas em formalina e incluídas em parafina, previamente confirmadas por diagnóstico clínico e histopatológico, com o objetivo de estabelecer uma metodologia para a detecção, por PCR, de DNA de diferentes tipos de papilomavírus equinos. Os autores demonstraram que amostras fixadas e incluídas em parafina constituem uma fonte potencial para a investigação molecular desses vírus, evidenciando a possibilidade de associar a caracterização histopatológica à investigação etiológica por métodos moleculares.

2.2.4 Transmissão

Diante da escassez de informações na literatura acerca dos mecanismos envolvidos na transmissão entre os animais e da forma de penetração do vírus na pele da região auricular, as estratégias de prevenção tornam-se limitadas.

Estudos realizados por Scott e Miller, 2011, demonstram que a presença de artrópodes, especialmente simulídeos, pode estar relacionada aos mecanismos de transmissão viral, a partir do trauma cutâneo que os possíveis vetores tendem a provocar no hospedeiro, o que facilita a penetração do vírus. Adicionalmente, condições ambientais específicas e práticas de higiene com potencial de desencadear traumas mecânicos também são consideradas potenciais vias de transmissão da enfermidade (Peters-Kennedy et al., 2019). A transmissão direta entre os equinos não está bem estabelecida na literatura.

Ainda, a ausência de ectoparasitas na região interna do pavilhão auricular pode estar associada a uma menor prevalência da enfermidade (Rodrigues et al., 2025), o que reforça a hipótese de que artrópodes desempenham papel na transmissão do papilomavírus entre os animais. Portanto, os métodos de prevenção baseiam-se na redução da taxa de transmissão, por meio do controle dos insetos no ambiente (Torres et al., 2010).

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de placa aurál pode ser realizado por meio do aspecto clínico da lesão e sua localização característica (Scott; Miller, 2011). Porém, para realizar a identificação do genótipo viral, é necessária a utilização de métodos avançados que possibilitem um diagnóstico aprofundado da enfermidade, uma vez que a manifestação clínica possui causas multifatoriais visto que pode variar de acordo com o genótipo viral, epitélio infectado, condições ambientais, estado nutricional e imunológico do animal (Torres; Koch, 2013).

O isolamento em cultivo convencional ainda não tem sido adotado (King et al., 2012, Bravo; Félez-Sánchez, 2015). Portanto, a técnica mais utilizada atualmente para o diagnóstico de placa aurál em equinos é a PCR (Lange et al., 2011; Zakia et al., 2019), responsável por proporcionar alta sensibilidade no diagnóstico de DNA viral, além da possibilidade de identificar o tipo de agente envolvido na lesão.

Para a realização da PCR, pode ser realizada a coleta de amostras da área acometida com a placa aurál, através da utilização de um *punch* com tamanho de 6 a 8 mm de diâmetro. O melhor local para a realização da biópsia corresponde ao centro da maior lesão presente no pavilhão auricular, a fim de garantir a obtenção de amostra exclusivamente da porção de tecido lesionado (Rodrigues et al., 2025), uma vez que a quantidade de DNA viral pode variar pela extensão da lesão (Mira et al., 2018).

Além disso, os animais devem ser sedados para realização da biópsia e, posteriormente, deve haver a limpeza do local biopsiado e a administração tópica de repelentes até que haja a cicatrização completa do local (Hernandez, 2015; Rodrigues et al., 2025). Ressalta-se que as amostras colhidas são armazenadas a -20°C até o processamento e realização das análises laboratoriais (Hernandez, 2015).

Por outro lado, existem outros métodos de diagnóstico para placa aurál, através do uso da microscopia eletrônica (Fairley; Haines, 1992) e também por meio da imuno-histoquímica (Fairley; Haines, 1992; Postey et al., 2007). Conforme o estudo realizado por Fairley e Haines (1992), foi encontrada por microscopia eletrônica, a presença de arranjos cristalinos intranucleares de partículas virais hexagonais, com aproximadamente 38-42 nm de diâmetro. Essas partículas localizavam-se dentro do núcleo dos queratinócitos da camada da granulosa da epiderme em amostras de lesões compatíveis com placas aurais. Dessa forma, a microscopia eletrônica permitiu a observação microscópica direta de partículas compatíveis com papilomavírus. Porém, trata-se de um método de elevado custo, além de apresentar disponibilidade restrita a determinadas localidades (Torres; Koch, 2013).

Além disso, os autores utilizaram a imuno-histoquímica para detectar a presença do antígeno viral, evidenciando proteínas virais localizadas no núcleo das células (Fairley; Haines, 1992; Postey et al., 2007). O estudo demonstrou, portanto, que tanto a microscopia eletrônica quanto a imuno-histoquímica confirmam a presença do papilomavírus na amostra analisada, embora os métodos não identifiquem qual o tipo viral específico em questão.

Estudos associados ao uso da PCR demonstraram a presença do antígeno de papilomavírus em diversas amostras de placa aural por imuno-histoquímica. Logo, embora a microscopia eletrônica e a imuno-histoquímica confirmem a presença viral através da análise microscópica, as análises moleculares realizadas pela PCR são cruciais para investigar os tipos de papilomavírus equinos envolvidos na patogênese das manifestações clínicas da lesão, principalmente pela sua alta sensibilidade. A utilização da PCR como método diagnóstico só é possível devido à disponibilidade do sequenciamento completo do genoma dos diferentes tipos de papilomavírus já descritos (Fairley; Haines, 1992; Lange et al., 2011; Gorino et al., 2013; Postey et al., 2007).

Ademais, Gorino et al. (2013), utilizando técnicas moleculares de PCR, detectaram os tipos EcPV-3 e EcPV-4 em lesões de placa aural equina, corroborando a participação desses papilomavírus na patogênese da doença.

Conclui-se, ainda, que a técnica de PCR aplicada em amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) é adequada para a detecção dos papilomavírus equinos associados à placa aural, especialmente o EcPV-4 (Zakia et al., 2015).

2.2.6 Tratamento

A placa aural apresenta baixa taxa de regressão espontânea, sendo necessária a intervenção terapêutica para a resolução do quadro clínico. Atualmente, o tratamento para a regressão da doença consiste na aplicação tópica de Imiquimod 5%, sendo considerado o método mais eficaz descrito na literatura (Torres et al., 2010; Zakia et al., 2016). A medicação corresponde a um quimioterápico modulador sintético da resposta imune, com caráter antiviral e antitumoral, pertencente à classe das aminas imidazoquinolinas (Torres et al., 2010).

O tratamento com Imiquimod 5% creme (Aldara®) foi utilizado em um estudo feito por Torres et al., (2010), com aplicações em dias alternados, 3 vezes por semana. No estudo, observou-se que o creme de Imiquimod 5% promoveu diversos efeitos colaterais como a intensa inflamação local, ulceração, formação de crosta espessada no local da aplicação e na pele adjacente, exsudato, descamação e dor. Embora tenha ocorrido resolução completa das lesões após o tratamento realizado em 88% dos animais, os efeitos adversos desenvolvidos durante o

tratamento muitas vezes geram questionamentos por parte dos proprietários quanto à necessidade de sua realização.

Recentemente, a auto-hemoterapia também foi avaliada como alternativa terapêutica para a placa aural equina. Entretanto, após cinco meses de acompanhamento, observou-se recidiva das lesões em três dos quatro animais tratados (Bastianetto et al., 2025). Apesar disso, a auto-hemoterapia tem demonstrado resultados satisfatórios no tratamento de papilomavirose em diferentes espécies animais, incluindo cães, caprinos e bovinos (Yildirim et al., 2022; PV et al., 2024). Dessa forma, embora promissora, sua aplicação no tratamento da placa aural em equinos ainda demanda estudos adicionais que comprovem sua eficácia e segurança clínica.

3 METODOLOGIA

O trabalho foi previamente aprovado na Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo nº 23117.063345/2024-48.

A partir de estudos realizados anteriormente, para quantificar o número necessário de amostras, foi utilizada uma proporção esperada de 90% de positividade, 10% de erro máximo, com aplicação da fórmula de dimensionamento amostral, 80% de poder estatístico e 5% de nível de significância, na qual resultou em um número de no mínimo 98 amostras necessárias para a realização do presente trabalho. O cálculo foi realizado a partir do programa Action® (Software Action Stat, versão 3.7 Estatcamp, São Carlos, SP, Brasil).

Sendo assim, foram colhidas 101 amostras de pavilhão auricular de 79 equinos diagnosticados clinicamente com placa aural, 22 animais apresentavam lesão bilateral, sendo colhidas amostras de ambas as orelhas. Os animais não foram divididos por raça, sexo ou idade e eram oriundos de haras ou fazendas localizadas na região de Uberlândia, Minas Gerais. As propriedades foram contatadas previamente para obtenção da autorização dos responsáveis quanto à avaliação dos animais e à realização da coleta das amostras.

A partir da confirmação clínica da presença de lesões compatíveis com placa aural, os animais foram submetidos a duas formas de coleta de material, sendo a primeira através da esfoliação com a cureta dermatológica de 2 mm e a segunda através de biópsia, com a utilização de um *punch* de 8 mm.

3.1 Cureta dermatológica

Primeiramente, os animais foram devidamente contidos com o auxílio de cabresto em tronco apropriado. Em seguida, realizou-se a esfoliação por meio da cureta dermatológica de 2 mm diretamente sobre a lesão, sem a limpeza prévia do local, de modo a promover a curetagem da área até a completa retirada das crostas das lesões. Ressalta-se que a esfoliação era realizada ao centro da maior lesão presente no pavilhão auricular, a fim de garantir a obtenção de amostra exclusivamente da porção de tecido lesionado (Rodrigues et al., 2025),

O material colhido era diretamente armazenado em microtubos plásticos de 1,5 mL, posicionados próximos à região, durante o procedimento de esfoliação.

3.2 Biópsia por *punch*

Posterior à coleta pela cureta dermatológica, os animais foram submetidos a um processo de sedação com cloridrato de detomidina a 1% na dose de 0,01 mg/kg, por via intravenosa, para que fosse realizada a biópsia por meio de um *punch* de 8 mm de diâmetro. Vale ressaltar que o fragmento foi coletado na mesma região em que foi realizada a coleta com o auxílio da cureta dermatológica.

As amostras obtidas a partir do *punch* também foram armazenadas em microtubos de plástico de 1,5 mL. Além disso, as amostras coletadas a campo eram identificadas e transportadas até o laboratório em caixas térmicas com gelo reciclável, garantindo a integridade do material.

Após a realização da biópsia, era necessário realizar a limpeza com gaze embebida em iodopolividona seguida de aplicação de repelente tópico. Ainda, os animais foram monitorados até o retorno completo da sedação e administrado Flunixin Meglumine na dose de 1,1 mg/kg, dose única, por via intravenosa para que houvesse controle da dor e desconforto após o procedimento.

3.3 Processamento das amostras no laboratório

As amostras coletadas a partir da cureta dermatológica eram mantidas a -20°C até a realização da extração de DNA. As amostras de biópsia coletadas com o auxílio de *punch* foram divididas ao meio com o auxílio de lâmina de bisturi n° 23 e uma agulha 40x12, sobre uma placa de petri descartável. Os fragmentos eram armazenados em microtubos de 1,5 mL, sendo metade congelada a -20 °C até a realização do processamento e extração de DNA

(Rodrigues et al., 2025) e a outra metade fixada em formalina a 10% para a realização de exame histopatológico (Sousa et al., 2008).

No laboratório, foi realizada a extração do DNA, na qual o tecido, após ser dividido ao meio com o auxílio de lâmina de bisturi nº 23 e uma agulha 40x12, era transferido para microtubos estéreis de 1,5 mL e macerado com o auxílio de uma agulha estéril. Após essa etapa, foram adicionados 250 µL de água nuclease-free. As amostras eram homogeneizadas com o auxílio do vórtex durante 10 segundos e submetidas a centrifugação rápida. Ressalta-se que a extração de DNA foi realizada utilizando o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, tanto para as amostras obtidas por curetagem, quanto para as obtidas por meio do *punch*.

Concluída a etapa de extração do DNA, as amostras foram avaliadas a partir da concentração e qualidade do DNA por meio de espectrofotometria (Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™). Após extração e avaliação, o material foi armazenado em freezer a -20°C até a realização da PCR.

As PCRs foram realizadas especificamente para EcPVs 1, 3, 4, 5, 6, utilizando primers descritos na literatura (Turco et al., 2023). Concluída a etapa da PCR, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e foto documentados no ImageQuant® imager (GE Healthcare). Ainda, para as amostras negativas, foi realizada uma PCR adicional com primers direcionados ao gene β -actina, com o objetivo de verificar a presença de DNA passível de amplificação.

As amostras fixadas em formalina foram processadas, incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 5 µm, corados por hematoxilina e eosina (HE) para exame histopatológico e avaliação das alterações teciduais associadas às lesões, realizada por meio de microscopia óptica de luz.

3.4 Análise estatística

Todos os dados foram tabulados na plataforma Microsoft Excel® (Microsoft Office 365, Redmond, WA, EUA), com distinção entre amostras obtidas por biópsia e por cureta dermatológica, permitindo comparação direta da sensibilidade entre os métodos.

Para a análise estatística, realizada no software R (R Core Team, 2024), utilizou-se estatística descritiva e testes comparativos. Para a comparação entre os dois métodos foi realizado o Índice de concordância Kappa, teste de McNemar's, além das avaliações de sensibilidade, especificidade e os valores preditivos, garantindo robustez na interpretação dos resultados.

4 RESULTADOS

Foram colhidas amostras de 79 animais clinicamente diagnosticados com placa aural. Desses, 22 apresentavam acometimento bilateral, possibilitando a coleta de amostras de ambas as orelhas, totalizando 101 amostras obtidas para o presente trabalho. Entre as amostras coletadas, 44 foram provenientes do pavilhão auricular esquerdo e 57 do pavilhão auricular direito.

A partir das 101 amostras obtidas, observou-se que a taxa de detecção de pelo menos um tipo viral foi de 95% (96/101) nas amostras coletadas por *punch*, enquanto nas amostras obtidas com cureta dermatológica a taxa de detecção foi de 92% (93/101) (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxa de detecção de EcPVs por PCR de acordo com o método de coleta utilizado

Método de coleta	Positivo	Negativo
<i>Punch</i>	95%	5%
Cureta dermatológica	92%	8%

A análise estatística foi baseada na comparação dos resultados positivos e negativos de cada método utilizado. Portanto, apesar da discreta diferença observada entre os métodos de coleta, descrita na tabela 1, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,4211$).

Foram pesquisados cinco tipos virais (EcPV-1, EcPV-3, EcPV-4, EcPV-5 e EcPV-6) por meio da técnica de PCR. Dessa forma, considerando as 101 amostras analisadas, foram realizadas 505 reações de PCR para cada método de coleta empregado. Diante disso, das 505 análises de PCR realizadas para cada método de coleta, 147 (29,11%) apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos tipos virais pesquisados nas amostras obtidas por cureta dermatológica, enquanto 149 (29,5%) análises foram positivas nas amostras coletadas por *punch* (Tabela 2). Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos ($p = 0,8900$).

Tabela 2 - Percentual de resultados positivos e negativos nas análises de PCR para os tipos de EcPV, segundo o método de coleta.

Método de coleta	Positivos	Negativos	Total
<i>Punch</i>	29,5%	70,5%	100%
Cureta dermatológica	29,11%	70,89%	100%

A partir do total de amostras de PCR, foi identificado, nas coletas de biópsia, que 75% das amostras foram positivas para EcPV-1 (75/101), seguidas de 7,92% para EcPV-3 (8/101), 22,77% para EcPV-4 (23/101), 0% para EcPV-5 (0/101) e, por fim, 41,58% para EcPV-6 (42/101).

Nas amostras obtidas pela cureta dermatológica, foram observados 75% de amostras positivas para EcPV-1 (75/101), 8,91% para EcPV-3 (9/101), 17,82% para EcPV-4 (18/101), 0% para EcPV-5 (0/101) e 43,56% de amostras positivas para EcPV-6 (44/101) (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentual de resultados positivos para os tipos de EcPV detectados por PCR, segundo o método de coleta utilizado, considerando 101 análises para cada tipo viral

Método de coleta	EcPV-1	EcPV-3	EcPV-4	EcPV-5	EcPV-6
<i>Punch</i>	75%	7,92%	22,77%	0%	41,58%
Cureta	75%	8,91%	17,82%	0%	43,56%

Ainda, destaca-se que os tipos virais EcPV-1, EcPV-3, EcPV-4 e EcPV-6 foram detectados tanto de forma isolada quanto em coinfeções, enquanto o EcPV-5 não foi identificado em nenhuma das amostras avaliadas, em nenhum dos dois métodos de coleta utilizados.

Considerando conjuntamente os dois métodos de coleta, foram analisadas 202 amostras, sendo 101 obtidas por *punch* e 101 por cureta dermatológica. Destas, 43% (87/202) apresentaram codetecção de dois ou mais tipos virais. Entre as amostras com codetecção, 22% (19/87) apresentaram simultaneamente três tipos virais, enquanto as demais apresentaram associação entre dois EcPVs. A codetecção frequentemente observada ocorreu entre os tipos EcPV-1 e EcPV-6, seguida por EcPV-1 e EcPV-4.

Quando comparados os métodos de coleta por *punch* e cureta dermatológica para cada tipo viral individualmente, por meio do teste de McNemar's, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na taxa de detecção dos EcPV-1 ($p = 1,0000$), EcPV-3 ($p = 1,0000$), EcPV-4 ($p = 0,3827$) e EcPV-6 ($p = 0,8445$). Esses resultados indicam que os métodos de coleta apresentaram desempenho semelhante na detecção dos diferentes tipos virais avaliados (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação da detecção dos tipos de EcPV entre os métodos de coleta por *punch* e cureta dermatológica por meio do teste de McNemar's

	<i>McNemar's Chi-squared test</i>	<i>p-value</i>
EcPV1 <i>Punch</i> X EcPV1 Cureta	0	1
EcPV3 <i>Punch</i> X EcPV3 Cureta	0	1
EcPV4 <i>Punch</i> X EcPV4 Cureta	0,7619	0,3827
EcPV5 <i>Punch</i> X EcPV5 Cureta	0	0
EcPV6 <i>Punch</i> X EcPV6 Cureta	0,0384	0,8445

A concordância entre os métodos de coleta por *punch* e cureta dermatológica foi avaliada por meio do Índice Kappa de Cohen. Observou-se concordância fraca a moderada para os tipos virais EcPV-1 (Kappa = 0,362), EcPV-4 (Kappa = 0,360) e EcPV-6 (Kappa = 0,474), enquanto o EcPV-3 apresentou concordância quase perfeita entre os métodos (Kappa = 0,936). Para o EcPV-5, não foi possível determinar a concordância, uma vez que esse tipo viral não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas por ambos os métodos de coleta (Tabela 5).

Tabela 5 - Índice Kappa e interpretação da concordância entre os métodos de coleta para detecção dos tipos de EcPV

Tipo viral	Índice Kappa	p-value	Interpretação
EcPV-1	0,362	0,00027	Concordância fraca a moderada
EcPV-3	0,936	<0,001	Concordância quase perfeita
EcPV-4	0,360	0,00025	Concordância fraca a moderada
EcPV-5	0	-	Sem detecção em ambos os métodos
EcPV-6	0,474	<0,001	Concordância moderada

Ainda, realizou-se a análise de sensibilidade, especificidade e acurácia da cureta dermatológica para a detecção dos diferentes tipos de EcPV (Tabela 6). O EcPV-3 apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 98,9% e acurácia de 99,0%. Para o EcPV-1, observaram-se valores de 84,2% de sensibilidade, 52,0% de especificidade e 72,2% de acurácia. O EcPV-4 apresentou sensibilidade de 43,5%, especificidade de 89,7% e acurácia de 79,2%, enquanto o EcPV-6 apresentou sensibilidade de 71,4%, especificidade de 76,3% e acurácia de 74,3%. Para o EcPV-5, não foram detectadas amostras positivas, resultando em sensibilidade de 0% e especificidade e acurácia de 100%.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que o EcPV-3 apresentou ótima sensibilidade e especificidade, o que possibilita um desempenho semelhante ao uso do *punch*. Para os tipos virais EcPV-1 e EcPV-6, foram observados valores de sensibilidade superiores a 70%, indicando boa capacidade de detecção pela cureta dermatológica. Em contrapartida, o EcPV-4 apresentou menor sensibilidade (43,5%), embora tenha demonstrado elevada especificidade (89,7%).

Tabela 6 – Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia da cureta dermatológica na detecção dos diferentes tipos de EcPV

Tipo viral	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
EcPV-1	84,2%	52,0%	72,2%
EcPV-3	100%	98,9%	99,0%
EcPV-4	43,5%	89,7%	79,2%
EcPV-5	0%	100%	100%
EcPV-6	71,4%	76,3%	74,3%

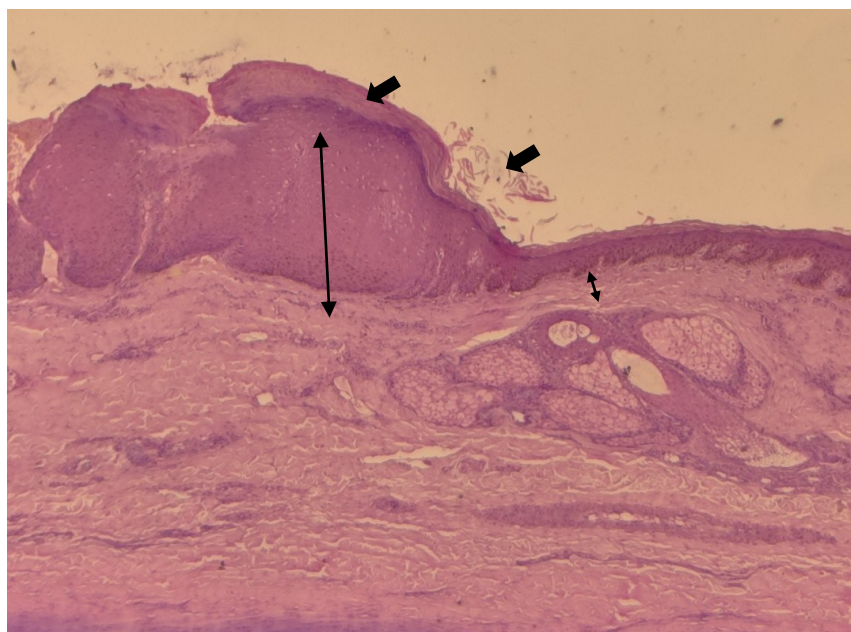
As amostras também foram submetidas à avaliação histopatológica de tecidos acometidos por placa aural. Do total de 101 amostras coletadas, foi possível estabelecer o diagnóstico histopatológico em 70 (69,3%), enquanto 31 (30,7%) apresentaram material insuficiente para avaliação. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de a cureta dermatológica promover a remoção predominantemente superficial do tecido lesionado, o que, em alguns casos, impossibilita a obtenção de fragmentos adequados para análise histopatológica. Dessa forma, as amostras com material insuficiente foram excluídas das análises subsequentes.

Considerando as 70 amostras passíveis de avaliação histopatológica, 66 (94,3%) apresentaram resultados positivos, enquanto 4 (5,7%) foram negativas. As quatro amostras com resultado negativo na histopatologia foram positivas na PCR em ambos os métodos de coleta. Em contrapartida, as duas amostras negativas na PCR, independentemente do método de coleta empregado, apresentaram resultado positivo na avaliação histopatológica.

As amostras consideradas positivas na avaliação histopatológica apresentaram hiperplasia epidérmica (Figura 2), associada à discreta papilomatose e à formação de cristas epidérmicas. Os queratinócitos observados exibiam núcleos aumentados, vesiculosos e com múltiplos nucléolos evidentes, além de citoplasma abundante e eosinofílico. Adicionalmente, foram observadas figuras de mitose, áreas de espongiose, caracterizadas por edema intracelular, e hipopigmentação, alteração responsável pelo aspecto esbranquiçado característico da placa

aural. A camada granulosa mostrava-se delgada, contendo grânulos finos, enquanto a epiderme apresentava hiperqueratose ortoqueratótica em padrão lamelar. Nas amostras obtidas por biópsia também foram identificadas áreas de ulceração envolvendo epiderme e derme nos locais previamente submetidos à coleta com cureta dermatológica, abrangendo principalmente a camada epidérmica e, em alguns casos, a derme superficial.

Figura 2- Pele com área de transição entre epiderme normal (seta fina pequena) e hiperplasia epidérmica (acantose) (seta fina grande), além de hiperqueratose ortoqueratótica (setas grossas). HE, obj.40x.



Fonte: arquivo pessoal

5 DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos no exame clínico, é possível estabelecer o diagnóstico presuntivo de placa aural em equinos. Entretanto, esse método não permite a identificação do tipo viral envolvido na lesão (Scott; Miller, 2011). Nesse contexto, a PCR é considerada o método padrão-ouro para o diagnóstico da enfermidade, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção e a caracterização das cepas de papilomavírus presentes nas lesões (Binniger; Piper, 1968; Gorino et al., 2013).

Os elevados índices de detecção de DNA viral nas lesões clinicamente compatíveis com placa aural reforçam que as características clínicas da enfermidade constituem um importante indicativo para a suspeita diagnóstica, corroborando a utilização do exame clínico como etapa inicial para a identificação da doença. Esse achado confirma o que foi descrito por Scott e Miller (2011), que destacam que as lesões de placa aural apresentam características clínicas sugestivas,

permitindo seu reconhecimento durante o exame físico, embora a identificação do tipo viral dependa de métodos complementares.

Diante disso, o presente estudo baseou-se na confirmação clínica das lesões compatíveis com placa aural, seguida da coleta de amostras para análise molecular por PCR, empregando-se dois métodos distintos de coleta. Ainda, as amostras foram analisadas a partir de sua morfologia através da histopatologia.

Nesse estudo, a positividade para pelo menos um tipo viral foi observada em 95% (96/101) das amostras obtidas por meio do *punch* e em 92% (93/101) das amostras coletadas com cureta dermatológica. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os métodos ($p \geq 0,05$) demonstra que ambas as técnicas apresentam desempenho semelhante para a obtenção de material destinado à análise molecular.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os métodos de coleta, algumas amostras apresentaram resultados positivos na curetagem e negativos na biópsia por *punch*, enquanto outras apresentaram o padrão inverso. De acordo com Mira et al. (2018), fatores como a quantidade e a distribuição do DNA viral podem influenciar sua detecção, uma vez que a carga viral pode variar em diferentes regiões de uma mesma lesão. Dessa forma, pequenas variações no local de coleta podem resultar em diferenças na detecção molecular do agente.

A utilização da cureta dermatológica permitiu a detecção de coinfeções em frequência semelhante à observada nas amostras obtidas por biópsia por *punch*, sem diferenças estatisticamente significativas entre os métodos. A elevada frequência de codetecção entre os tipos virais EcPV1, EcPV4 e EcPV6 pode sugerir a ocorrência de sinergismo viral, no qual diferentes papilomavírus coexistem na mesma lesão e potencialmente favorecem sua persistência (Mejlhede et al., 2010). No entanto, não há consenso na literatura sobre esse fenômeno, uma vez que alguns autores consideram as codetecções como eventos ocasionais, sem interação biológica significativa entre os vírus (Mejlhede et al., 2010; Chaturvedi et al., 2005).

O resultado elevado de EcPV-3 no Índice Kappa demonstra que o tipo viral apresenta alta concordância entre os métodos utilizados, o que corrobora as afirmativas de que a coleta por meio da curetagem garante amostras adequadas para a amplificação do DNA viral. O EcPV-1 e EcPV-6 apresentaram concordância moderada no Índice Kappa, porém tal resultado pode estar associado à distribuição do DNA viral na lesão. Ainda, de acordo com Scott e Miller (2011) e Torres (2013), o vírus tem a característica de replicar-se nas camadas profundas do

epitélio escamoso. Portanto, lesões que apresentam maior queratinização tecidual podem dificultar a curetagem, impossibilitando amostras com presença de células basais infectadas.

Para o EcPV-3, observou-se sensibilidade de 100%, indicando que, entre as amostras positivas identificadas pela biópsia por *punch*, todas também foram detectadas pela curetagem esfoliativa. A elevada especificidade (98,9%) demonstra que, entre as amostras classificadas como negativas pelo método de referência, também foram corretamente identificadas como negativas pela curetagem. Associada à acurácia de 99,0%, essa elevada capacidade de classificação reforça o bom desempenho da curetagem esfoliativa na detecção do EcPV-3.

Além disso, para o EcPV-4, observou-se menor sensibilidade (43,5%). Entretanto, a elevada especificidade (89,7%), acurácia de 79,2% e a ausência de diferença estatística entre os métodos ($p = 0,3827$) sugerem que a cureta dermatológica apresenta potencial significativo para a detecção molecular desse genótipo viral.

Adicionalmente, para o EcPV-5, não foram identificadas amostras positivas pelo método de referência, impossibilitando uma interpretação adequada da sensibilidade. Nesse caso, a especificidade de 100% indica que todas as amostras classificadas como negativas pela biópsia por *punch* também foram corretamente classificadas pela curetagem, resultando em acurácia de 100%. A ausência de detecção do EcPV-5 pode estar relacionada à baixa frequência desse genótipo, conforme descrito previamente na literatura (Mira et al., 2018; Rodrigues et al., 2025).

Ressalta-se que a avaliação histopatológica pode ser empregada nos casos de placa aural, uma vez que as lesões apresentam espessamento da epiderme, associado à hiperqueratose e à hipomelanose acentuadas. Essas alterações promovem uma distinção evidente entre o epitélio saudável e aquele acometido pela placa aural (Sousa et al., 2008). Os papilomavírus alojam-se nos queratinócitos e caracterizam-se por induzir resposta inflamatória discreta, visto que essas células apresentam capacidade limitada de realizar a apresentação de antígenos (Gissmann et al., 1996). Nesse contexto, uma mesma lesão de placa aural pode abrigar diferentes tipos de DNA viral, o que pode explicar as diferenças observadas entre os métodos de coleta empregados para a detecção viral.

Além disso, a hipopigmentação observada nessas lesões é atribuída à redução da quantidade de melanócitos identificados nos cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Corroborando esse achado, Binniger; Piper (1968) demonstraram, por meio de microscopia eletrônica, que o estrato germinativo acometido pelo papilomavírus era composto predominantemente por queratinócitos, com ausência de melanina. Ainda, a ocorrência de alterações nos queratinócitos, associada à presença de figuras de mitose, também é compatível

com a atividade proliferativa induzida pelos papilomavírus, que possuem essas células como principais alvos durante seu ciclo replicativo (Fairley; Haines, 1992; Longworth; Laimins, 2004).

A realização da curetagem previamente à obtenção do fragmento destinado ao exame histopatológico mostrou-se um fator limitante para a avaliação microscópica das lesões de placa aural. Como a cureta promove a remoção da epiderme, região onde se concentram as principais alterações histológicas, aproximadamente 30% das amostras apresentaram material insuficiente para análise. Dessa forma, embora a curetagem tenha se mostrado adequada para a obtenção de material destinado ao diagnóstico molecular, sua utilização antes da biópsia comprometeu a qualidade dos fragmentos coletados para avaliação histopatológica.

Observou-se ainda discordância entre os resultados da histopatologia e da PCR em algumas amostras. As quatro amostras negativas na avaliação histopatológica apresentaram resultado positivo na PCR para ambos os métodos de coleta. Esse achado pode ser explicado pelo fato de a PCR detectar diretamente o DNA viral, apresentando elevada sensibilidade mesmo quando as alterações microscópicas são discretas ou quando o fragmento analisado não representa adequadamente a região acometida. Por outro lado, as duas amostras negativas na PCR e positivas na histopatologia podem estar relacionadas à baixa carga viral no tecido analisado ou à distribuição do vírus na lesão, fatores capazes de ocasionar resultados falso-negativos na técnica molecular.

Tais resultados demonstram que os fragmentos coletados podem não representar às regiões de tecido acometidos pela enfermidade, visto que a amostra coletada era dividida ao meio, destinando-se metade para realização de PCR e a outra metade para a análise histopatológica. Dessa forma, os resultados indicam que o diagnóstico clínico, associado à análise molecular, apresenta elevada confiabilidade, tornando a análise histopatológica dispensável para o diagnóstico de placa aural em equinos.

Nesse contexto, os resultados obtidos indicam que o uso da cureta dermatológica constitui uma alternativa comparável à biópsia por *punch* para a coleta de amostras destinadas à PCR, possibilitando a detecção e a identificação dos papilomavírus presentes nas lesões. Além da ausência de diferença na taxa de detecção viral entre os métodos, a distribuição dos tipos de papilomavírus identificados foi semelhante entre as técnicas de coleta. Esses achados sugerem que a curetagem não interfere na caracterização molecular das amostras, reforçando sua aplicabilidade em estudos diagnósticos e epidemiológicos da placa aural em equinos. Dessa forma, trata-se de uma técnica viável, menos invasiva e adequada para o diagnóstico molecular da placa aural em equinos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a coleta por curetagem é um método eficiente para obtenção de amostras destinadas ao diagnóstico molecular da placa aural em equinos, apresentando resultados comparáveis aos observados com a biópsia por *punch*. A ausência de diferenças estatísticas significativas entre os métodos evidencia que a cureta dermatológica pode ser empregada como alternativa para a coleta de material para PCR. Além da eficácia diagnóstica, a curetagem apresenta vantagens práticas por ser um procedimento menos invasivo e fácil execução quando comparado à biópsia convencional. Dessa forma, a técnica representa uma ferramenta promissora para a rotina clínica e para pesquisas envolvendo a identificação molecular do papilomavírus equino, contribuindo para a ampliação das possibilidades diagnósticas da placa aural.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Papillomaviridae. Em: **Virologia Veterinária**. 2. ed. [S. l.: s. n.], 2012. p. 463–480.
- ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy Skin of Many Animal Species Harbors Papillomaviruses Which Are Closely Related to Their Human Counterparts. **Journal of Virology**, [s. l.], 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/10.1099/vir.0.82195-0>
- BASTIANETTO, E., DE AZEVEDO, M. I., FERRÃO, I. S., FANTINI, P., LIMA, E. M. M., CASTRO, M. B., DE MELO, C. B. (2025). Aural plaques: Considerations on autohaemotherapy treatment in four Mangalarga Marchador crossbred horses. **Equine Veterinary Education**. <https://doi.org/10.1111/eve.14196>
- BERNARD, H.-U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>
- BERNARD, H.-U., BURK, R. D., CHEN, Z., DOORLAERS, K., HAUSEN, H.; VILLIERS, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, 401, 70–79.
- 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>
- BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses. **Evolution, Medicine, and Public Health**, [s. l.], v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015. <https://doi.org/10.1093/emph/eov003>

BROMBERGER, C. R., COSTA, J. R., HERMAN, M., HERNANDEZ, J. M., ALBERTINO, L. G., ALVES, C. E. F., BORGES, A. S., OLIVEIRA-FILHO, J. P. (2023). Detection of *Equus caballus* Papillomavirus in Equine Aural Plaque Samples. *Journal of Equine Veterinary Science*, 128, 104877. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104877>

CHATURVEDI, A. K., MYERS, L., HAMMONS, A. F., CLARK, R. A., DUNLAP, K., KISSINGER, P. J., HAGENSEE, M. E. (2005). Prevalence and Clustering Patterns of Human Papillomavirus Genotypes in Multiple Infections. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(10), 2439–2445. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0465>

DE PAOLIS, L., DE CIUCIS, C. G., PELETTI, S., CAPPELLI, K., MECOCCHI, S., NERVO, T., GUARDONE, L., CRESCIO, M. I., PIETRUCCHI, D., FRUSCIONE, F., GABBIANELLI, F., TURCO, S., VARELLO, K., DONATO, G. G., MAURELLA, C., MODESTO, P., MANIACI, M. G., CHILLEMI, G., GHELARDI, A.; RAZZUOLI, E. (2022). *Equus caballus* Papillomavirus Type-9 (EcPV9): First Detection in Asymptomatic Italian Horses. **Viruses**, 14(9), 2050. <https://doi.org/10.3390/v14092050>

DOORBAR J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology** 2005 Mar; 32. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.006>

DOORBAR, J. The E4 protein: structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, p. 80–98, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008>

FAIRLEY, R. A.; HAINES, D. M. The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 1, p. 79–81, 1992. <https://doi.org/10.1177/030098589202900110>

GISSMANN, L. (1996). Immunologic responses to human papillomavirus infection. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, 23(3), 625–639.

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>

HERNANDEZ, J. M. Pesquisa do DNA viral de papilomavirus equino em lesões de placa aural. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015.**

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

KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, Amsterdam.

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.; FAVROT, C. Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. **Veterinary Microbiology** 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 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>

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, N°2. p.362-372, 2004. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>

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>

MEJLHEDE, N., PEDERSEN, B. V., FRISCH, M., & FOMSGAARD, A. (2010). Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy? *APMIS*, 118(5), 346–352. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.2602.x>

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. **Veterinary Dermatology**, 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>

MUNDAY, J. S., KIUPEL, M. (2010). Papillomavirus-Associated Cutaneous Neoplasia in Mammals. **Veterinary Pathology**, 47(2), 254–264. <https://doi.org/10.1177/0300985809358604>

MUNDAY, J. S., KNIGHT, C. G., BODAAN, C. J., CODACCIONI, C., & HARDCASTLE, M. R. (2024). Equus caballus papillomavirus Type 7 is a rare cause of equine penile squamous cell carcinomas. **The Veterinary Journal**, 306, 106155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106155>

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>

PETERS-KENNEDY, J., LANGE, C. E., RINE, S. L.; HACKETT, R. P. (2019). Equus caballus papillomavirus 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse. **Equine Veterinary Journal**, 51(4), 470–474. <https://doi.org/10.1111/evj.13046>

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. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 28–33, 2007.

PV, G., LOUIS, L. E., PM, D., VIJAYAKUMAR, M., VELAVAN, A. (2024). A comprehensive treatment strategy for bovine Papillomatosis: Assessing the synergistic effects of Autohaemotherapy, surgical intervention, and Autogenous vaccination. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, 9(1S), 609–612. <https://doi.org/10.22271/veterinary.2024.v9.i1Si.1084>

REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C. **Medicina Interna Equina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. E-book. p.1183. ISBN 9788527738262. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527738262/>. Acesso em: 23 jan. 2026.

RODRIGUES, G. G., ALVES, D. S., BROMBERGER, C. R., NOMELINI, Q. S. S., BORGES, A. S., DE OLIVEIRA-FILHO, J. P.; DELFIOL, D. J. Z. (2025). Clinical and epidemiological aspects in equine aural plaques. **Veterinary Research Communications**, 49(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10572-0>

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. DOI: 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

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, J. P. (2013). Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. *Veterinary Microbiology*, 162(1), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.025>

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 of North America: Equine Practice**, v. 29, n. 3, 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>

TURCO, S., GABBIANELLI, F., MAVIAN, C. N., PIETRUCCHI, D., DE PAOLIS, L., GIALLETTI, R., MECHELLI, L., DE CIUCIS, C. G., CAPPELLI, K., DELL'ANNO, F., MECOCCHI, S., DONATO, G. G., NERVO, T., FRUSCIONE, F., CRESCIO, M. I., GHELARDI, A., CHILLEMI, G.; RAZZUOLI, E. (2023). Genetic Characterization of a Novel *Equus caballus* Papillomavirus Isolated from a Thoroughbred Mare. **Viruses**, 15(3), 650. <https://doi.org/10.3390/v15030650>

VALENTINE, B. A. (2006). Survey of Equine Cutaneous Neoplasia in the Pacific Northwest. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 18(1), 123–126. <https://doi.org/10.1177/104063870601800121>

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. (2010). Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. **The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne**, 51(10), 1103–1108.

YILDIRIM, Y., BOZKURT, G., KÜÇÜK, A., TAŞAL, İ. (2022). Investigación de la efectividad de varios métodos de tratamiento en cabras con papilomatosis cutánea. *Revista MVZ Córdoba*, 27(2), e2376. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2376>

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 paraffinembedded equine aural plaque samples. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.67, n.4, p.1193- 1196, 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8077>

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. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 12, n. 1, p. 1 – 4, 2019. <http://dx.doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4>

ZAKIA, L.S.; OLIVO, G.; BASSO, R.M.; MIRA, J.; HERMAN, M.; ARAUJO-JR, J.P.; BORGES, A.S.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Imiquimod treatment for *Equus caballus* papillomavirus infection in equine aural plaques. **Veterinary Dermatology**. v. 27, pag175–e44. 2016.

ZUR HAUSEN, H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 1–10, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.001>