

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Tanara Raquel de Oliveira da Silva

**PESQUISA DE *EQUUS CABALLUS* PAPILLOMAVIRUS-2 EM  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS E PAPILOMAS GENITAIS  
DE EQUINOS MACHOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Santa Maria, RS  
2022

**Tanara Raquel de Oliveira da Silva**

**PESQUISA DE *EQUUS CABALLUS* PAPILLOMAVIRUS-2 EM  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS E PAPILOMAS GENITAIS DE  
EQUINOS MACHOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS) como requisito para obtenção de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariana Martins Flores

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

da Silva, Tanara Raquel O.  
PESQUISA DE EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS-2 EM  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS E PAPILOMAS GENITAIS DE  
EQUINOS MACHOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL / Tanara  
Raquel O. da Silva.- 2022.  
34 p.; 30 cm

Orientadora: Mariana Martins Flores  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2022

1. Papilomavirus 2. EcPV-2 3. Carcinoma de células  
escamosas 4. Equino 5. Genital I. Martins Flores,  
Mariana II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, TANARA RAQUEL O. DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Tanara Raquel de Oliveira da Silva**

**PESQUISA DE *EQUUS CABALLUS* PAPILLOMAVIRUS-2 EM  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS E PAPILOMAS GENITAIS DE  
EQUINOS MACHOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS) como requisito para obtenção de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovada em 17 de fevereiro de 2022:**

*Mariana Flores*

---

**Mariana Martins Flores, Dra, UFSM**  
(Presidente/Orientadora)

*Eduardo Kenji Masuda*

---

**Eduardo Kenji Masuda (Axys Análises)**

*Tatiane C. Faccin*

---

**Tatiane Cargin Faccin (UEL)**

Santa Maria, RS

2022

## DEDICATÓRIA

*Dedico ao meu querido e amado avô Ari Santana de Oliveira (in memoriam), que esteve presente durante toda minha vida e jornada acadêmica, incentivando e dando forças, sendo exemplo de amor e superação.*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com base no apoio e incentivo de pessoas especiais, que estiveram do meu lado em todas as etapas do processo, tornando meu sonho possível. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- Primeiramente a Deus por me permitir viver e me abençoar com muita saúde e força para continuar minha jornada.
- Ao meu esposo, Djeison Dalla Corte pelo amor, dedicação, e por estar sempre ao meu lado, me apoiando e sonhando junto comigo.
- A minha amada filha Isabella, pela paciência e compressão, e principalmente pelo amor incondicional, seu amor é o que me mantém forte.
- Aos meus pais, Ari da Silva e Isabel de Oliveira por todo amor, apoio e por me incentivarem a sempre seguir meus sonhos. Aos meus irmãos, gratidão por acreditarem em mim e por estarem presentes na minha vida e principalmente na vida da Isabella, enquanto estive longe, vocês foram carinho e proteção. Amo vocês.
- Aos meus queridos compadres e amigos Daniel e Laura por me receberem de braços abertos em sua casa e tornarem meus dias fora de casa mais aconchegantes.
- A minha orientadora, Mariana M. Flores por acreditar em meu potencial e me permitir conduzir seu projeto como tema da dissertação. Agradeço imensamente a oportunidade e os ensinamentos compartilhados.
- A professora Glaucia, pela paciência e carinho ao longo desta jornada. E pelos ensinamentos passados, levarei para vida.
- A amiga e colega Betina a qual me ajudou incansavelmente, sempre prestativa, além de ser uma ótima companhia.
- Aos demais colegas do laboratório Eryca, Alex, Vanessa e Ariel pela paciência, dedicação e carinho. Tornaram meus dias mais felizes em meio a correria do dia a dia.
- Aos estagiários, pela disponibilidade e ajuda prestada, vocês são imprescindíveis em todos os processos.
- A CAPES, CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro neste projeto.

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.

(Martin Luther King)

## RESUMO

### PESQUISA DE *EQUUS CABALLUS* PAPILOMAVIRUS-2 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS E PAPILOMAS GENITAIS DE EQUINOS MACHOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

AUTOR: Tanara Raquel de Oliveira da Silva  
ORIENTADORA: Mariana Martins Flores

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna oriunda dos queratinócitos altamente prevalente em equinos, afetando frequentemente o pênis e prepúcio. Sua contrapartida benigna, o papiloma, também é comum na região genital, e pode ser induzida pela infecção por papilomavírus (PVs). Embora se saiba que os papilomas genitais de equinos podem ter uma origem viral, a etiologia dos CCEs genitais não está completamente elucidada. Recentemente foi detectada a presença de um novo PV, o papilomavírus *Equus caballus* tipo 2 (EcPV-2), em meio a CCEs genitais de equinos machos. Acredita-se, a partir disso, que possa existir uma associação entre a infecção por EcPV-2 e a gênese de alguns papilomas e CCEs genitais em equinos. Desde a sua descoberta em 2010, o EcPV-2 já foi descrito em diferentes países da América do Norte e Europa, no entanto, sem relatos no Brasil. Com base nisso, o objetivo desse trabalho é investigar o EcPV-2 em meio a CCEs e papilomas genitais de equinos machos brasileiros. Foram investigados 40 CCEs e papilomas acometendo pênis e/ou prepúcio recebidos na rotina de biópsias e necropsias do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e na rotina de biópsias do setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (2000-2021). Dados relacionados à raça e à idade foram retirados dos laudos histopatológicos. Os blocos de parafina foram recuperados para confecção de lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina, de imuno-histoquímica (IHQ) para PV (40/40) e de reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando um par de primers específico para PV (40/40) e um par de primers específico para EcPV-2 (40/40). Casos positivos foram sequenciados. Dos casos incluídos, 34 eram CCEs invasivos, três eram carcinomas *in situ* (CIS) e três eram papilomas. A mediana de idade foi de 13,2 anos, e dos equinos com *status* reprodutivo informado, três eram garanhões e dois eram castrados. A raça Crioula foi a mais representada (16/40). Todos os tumores apresentaram graus variáveis de inflamação linfoplasmocítica, sendo que dois CCEs apresentaram invasão vascular linfática e dois apresentaram invasão sanguínea. Em meio aos carcinomas, ou na mucosa adjacente ao tumor, também se observaram coilócitos, os mesmos visualizados em todos os papilomas. Inclusões estavam ausentes em todos os casos. Na IHQ utilizando anticorpo anti-BPV-1, quatro casos (dois CCEs, um CIS e um papiloma) tiveram imunomarcagem positiva, observada no núcleo de ceratinócitos neoplásicos (CIS e papiloma) ou no epitélio adjacente ao tumor (CCEs). A análise molecular revelou sete casos positivos para PV e cinco desses positivos para EcPV-2. Três casos positivos para EcPV-2 e dois casos positivos para PV e negativos para EcPV-2 foram sequenciados, sendo todos compatíveis com EcPV-2. A partir desses resultados, podemos confirmar a presença de EcPV-2 em equinos brasileiros. Espera-se que esse estudo venha a estimular novas pesquisas relacionadas a esse novo vírus, contribuindo, por fim, para o melhor conhecimento das formas de transmissão do vírus, e para o desenvolvimento de medidas preventivas eficazes.

**Palavras-chave:** CCE. EcPV-2. Cavalos. Pênis. Prepúcio.



## ABSTRACT

### ***EQUUS CABALLUS* PAPILOMAVIRUS-2 INVESTIGATION IN GENITAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS AND PAPILOMAS IN MALE HORSES FROM RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL**

AUTHOR: Tanara Raquel de Oliveira da Silva  
ADVISOR: Mariana Martins Flores

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant neoplasm arising from keratinocytes. It is highly prevalent in horses, often affecting the penis and prepuce. Its benign counterpart, the papilloma, is also common in the genital region, and can be induced by infection with papillomaviruses (PVs). Although it is known that equine genital papillomas may have a viral origin, the etiology of genital SCCs is not fully understood. The presence of a new PV, *Equus caballus* papillomavirus type 2 (EcPV-2), was recently detected among genital SCCs in male horses. Based on this, it is believed that there may be an association between EcPV-2 infection and the genesis of some equine genital papillomas and SCCs. Since its discovery in 2010, EcPV-2 has been described in different countries in North America and Europe, however, with no reports in Brazil. The objective of this research is to investigate the presence of EcPV-2 within genital papillomas and SCCs of male Brazilian horses. We investigated 40 SCCs and papillomas involving the penis and/or prepuce, diagnosed in the biopsy or necropsy routine of the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), and in the biopsy routine of the Setor de Patologia Veterinária (SPV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (2000-2021). Data related to breed and age were taken from the histopathological reports. The paraffin blocks were recovered for the preparation of Hematoxylin and Eosin slides, immunohistochemistry (IHC) for PV (40/40) and polymerase chain reaction (PCR) using a pair of primers specific for PV (23/40) and another pair specific for EcPV-2 (40/40). Positive cases were sequenced. Of the included cases, 34 were invasive SCCs, three were carcinomas in situ (CIS), and three were papillomas. The median age was 13.2 years, and of the horses with informed reproductive status, three were stallions and two were geldings. The breed *Crioula* was the most represented (16/40). All tumors showed varying degrees of lymphoplasmacytic inflammation, with two SCC's showing lymphatic vascular invasion and two showing blood invasion. Within the carcinomas, or in the tumor-adjacent mucosa, swollen, degenerated keratinocytes with a weakly basophilic cytoplasm, occasionally containing a clear vacuole and a large nucleus, were occasionally observed. Viral inclusions were absent in all cases. In the IHC using anti-BPV-1 antibody, four cases (two SCCs, one CIS and one papilloma) had positive immunostaining, observed in the nucleus of neoplastic keratinocytes (CIS and papilloma) or in the epithelium adjacent to the tumor (SCCs). PCR revealed seven positive cases for PV and five of these positive for EcPV-2. Three EcPV2-positive cases and two PV-positive and EcPV2-negative were sequenced, and compatible with EcPV-2. With this study, we can confirm the presence of EcPV-2 in Brazilian horses. We hope this study stimulates further research related to this new virus, ultimately contributing to a better understanding of transmission routes, and to the development of effective preventive measures.

**Keywords:** CCE. EcPV-2. Horse. Penis. Prepuce.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 ARTIGO - DETECTION OF EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS-2 IN EQUINE PENILE/PREPUTIAL PAPILLOMAS AND SQUAMOUS CELL CARCINOMAS IN SOUTHERN BRAZIL</b> .....	15
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	333
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	333

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE), também conhecido como carcinoma epidermoide, carcinoma de células espinhosas ou carcinoma espinocelular, é uma neoplasia cutânea e mucocutânea maligna oriunda dos ceratinócitos (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). As espécies mais acometidas por CCEs são os equinos, bovinos, caninos e felinos, sendo incomum em ovinos e raro em suínos e caprinos (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Em equinos essa neoplasia é mais comum na glândula peniana (EDWARDS, 2008), olhos e cabeça (BATAIER et al., 2012). O CCE é normalmente localmente invasivo, tem crescimento lento e baixa incidência de metástase (TÚLIO et al., 2009). Os papilomavírus (PVs) são vírus não envelopados, de DNA circular de fita dupla, de natureza oncogênica, podendo se desenvolver na forma benigna ou maligna em pele ou mucosa (ZHU et al., 2015). São altamente espécie específicos (KING et al., 2012). Podem se manifestar de três formas: papilomatose clássica, placa aural e papilomatose genital (SCOTT; MILLER, 2003). Algumas das raças equinas mais acometidas são o Crioulo, Irlandês, Shetland e o Suiço (LANGE et al., 2012). Acredita-se que papilomas genitais possam progredir para CCEs em equinos (KNIGHT et al., 2011).

CCEs e papilomas genitais geralmente acometem equinos mais velhos, entre 16,2 a 18 anos de idade (VAN DEN TOP et al., 2008). Não há diferença significativa entre animais castrados ou inteiros (FOSTER, 2017). Há algumas especulações que sugerem a maior prevalência desses tumores em machos castrados, pois eles mantêm o pênis retraído no prepúcio onde o esmegma se acumula (SCASE et al., 2010). As raças de cavalos mais acometidas por CCEs genitais são: Belga, Clydesdale, Shire, Cavalos de pintura americano e Appaloosa (AGNEW; MACLACHLAN, 2017). Papilomas genitais em equinos são geralmente induzidos por infecção por papilomavírus (LANGE et al., 2012). A etiologia dos CCEs genitais não está completamente elucidada (TATIBANA et al., 2011), entretanto, sabe-se que alguns CCEs são induzidos pela exposição prolongada à radiação ultravioleta (BATAIER et al., 2012). O acúmulo de esmegma, irritações crônicas, balanopostite (ZHU et al., 2015), raça e idade são considerados fatores de risco (VAN DEN TOP et al., 2010; NEWKIRK et al., 2014). Além disso, a infecção por papilomavírus foi recentemente incluída como possível causa (LANGE et al., 2012). CCEs genitais geralmente progridem a partir de papilomas, e inicialmente apresentam-se sob a forma de carcinomas *in situ*, posteriormente, tornando-se invasivos (SCASE et al., 2010; SYKORA et al., 2012).

Macroscopicamente, os papilomas se apresentam sob a forma de lesões pequenas (1 a 2cm), exofíticas e vegetativas, únicas ou múltiplas, presentes na pele ou mucosas (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016). Histologicamente, há proliferação benigna de ceratinócitos, não invasiva, com graus variados de hiperkeratose ortoceratótica a paraceratótica no estrato córneo. Os papilomas induzidos por infecção viral têm algumas características que os confirmam como papilomas virais, dentre elas: presença de coilócitos, grânulos de ceratohialina grandes e proeminentes e inclusões virais intranucleares (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Ainda, alteração citopática, e degeneração balonosa com núcleos picnóticos excêntricos podem ser visualizados (KNIGHT et al., 2011; LANGE et al., 2012). Nos tecidos genitais masculinos, podem estar presentes no pênis, glândula peniana, processo uretral e prega prepucial (VAN DEN TOP et al., 2008).

Macroscopicamente, os CCEs podem se apresentar de diversas formas, desde úlceras, o que é mais comum, até massas exofíticas, muitas com um aspecto irregular, lembrando uma couve-flor (VAN DEN TOP et al., 2010). As áreas se tornam mais firmes com o passar do tempo e invadem os tecidos subjacentes, conseqüentemente aumentando o tamanho e profundidade das úlceras (ROCHA et al., 2010). Ainda podem ser observados na forma de placas despigmentadas e até discretas irregularidades na superfície do pênis ou prepúcio. Por vezes, essas alterações são associadas a tecido de granulação (VAN DEN TOP et al., 2011). Histologicamente, CCEs são geralmente de fácil diagnóstico (VAN DEN TOP et al., 2008; MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016). As células neoplásicas se arranjam em ninhos, cordões e ilhas que se comunicam com o epitélio de revestimento da mucosa ou pele, e invadem o tecido subjacente. Essas células se assemelham àquelas que compõem o estrato espinhoso da epiderme. Observa-se diferenciação escamosa em meio ao tumor, com formação de pérolas de queratina (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016). As células neoplásicas estão entremeadas por tecido fibroso, e podem ser infiltradas por linfócitos e plasmócitos. No caso dos CCEs genitais de equinos, metástases, embora incomuns, podem ocorrer em linfonodos inguinal superficial, inguinal profundo e ilíaco medial. A obstrução linfática pelas células tumorais pode causar edema prepucial e a cavidade prepucial fica distendida pela presença de esmegma retido, detritos inflamatórios e urina (FOSTER, 2017).

O diagnóstico definitivo dos carcinomas de células escamosas e papilomas é realizado através da histopatologia (VAN DEN TOP et al., 2010). Como diagnósticos diferenciais para CCEs de pênis e prepúcio em equinos, cita-se sarcoide, habronemíase, papiloma, melanoma, adenocarcinoma, fibrossarcoma, carcinoma basocelular e neurofibroma (AGNEW; MACLACHLAN, 2017). Dependendo da localização e estágio da doença, o CCE pode

acarretar em prejuízos aos criadores, pois requer tratamento clínico e cirúrgico (RABBERS et al., 2014). A escolha da terapia instituída dependerá principalmente do tamanho, localização da lesão e presença ou não de metástases (VAN DEN TOP et al., 2008). Geralmente opta-se pela intervenção cirúrgica, ressecção parcial ou em bloco do órgão afetado que pode acarretar em complicações pós-operatórias e eutanásia (SCASE et al., 2010). O prognóstico varia, mas muitas vezes é reservado, uma vez que o tumor tende a recidivar no período de um ano em 11 a 30% dos casos (VAN DEN TOP et al., 2011). Papilomas genitais geram menos incômodo, pois frequentemente regridem espontaneamente (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016). No entanto, deve-se considerar a possibilidade de progressão para CCEs (SCASE et al., 2010; SYKORA et al., 2012).

Há alguns anos, foi descrita a ocorrência de um CCE genital em meio a múltiplos papilomas virais na vulva de uma égua, o que levantou a hipótese de que ambas as lesões (papilomas e CCE) teriam a mesma origem, viral (SMITH et al., 2010). Até então, não havia nenhuma descrição de CCE associado a infecção por papilomavírus em equinos, apesar de se conhecerem alguns papilomavírus que poderiam induzir a formação de papilomas na pele e em mucosas desses animais, como *papilomavírus equus caballus* (EcPV) tipos 1, 3, 4, 5 e 6 (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016). Logo em seguida, veio o primeiro estudo sistemático a investigar e confirmar o DNA de papilomavírus em múltiplos CCEs de equinos por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) e hibridização *in situ* (SCASE et al., 2010). Por meio desta última técnica, demonstrou-se a presença de um papilomavírus no núcleo das células neoplásicas dos CCEs genitais, e a sua ausência no tecido epitelial normal adjacente a estes tumores, o que fortaleceu a teoria de associação causa-efeito entre o vírus e o tumor. As sequências genômicas encontradas nestes CCEs pertenciam a um papilomavírus equino nunca antes descrito, que foi então denominado *papilomavírus equus caballus* tipo 2 (EcPV-2).

Estudos em diversos países foram surgindo e comprovando a presença de EcPV-2 em CCEs predominantemente genitais de equinos. O vírus foi descrito nos Estados Unidos (KNIGHT et al., 2011; NEWKIRK et al., 2014), Áustria (SYKORA et al., 2012), Bélgica (BOGAERT et al., 2012), Suíça (LANGE et al., 2012), Nova Zelândia (KNIGHT et al., 2013), Canadá (GREENWOOD et al., 2020), China (TONG et al., 2021) e mais recentemente no Japão (YAMASHITA-KAWANISHI et al., 2021). O vírus foi encontrado em 43% (NEWKIRK et al., 2014), 45% (KNIGHT et al., 2011) e 100% (LANGE et al., 2012) dos papilomas e CCEs penianos de equinos em alguns desses estudos. O DNA de EcPV-2 também foi detectado menos frequentemente em amostras normais, lesões pré-neoplásicas e papilomas (BOGAERT et al., 2012). No entanto, o vírus é encontrado com maior frequência em CCEs e papilomas do que

em mucosas e pele de animais saudáveis, sugerindo se tratar de um vírus oncogênico, e não de um vírus comensal (SYKORA; BRANDT, 2017). Os livros-texto mais atuais em Patologia Veterinária já reconhecem que parte dos CCEs penianos de equinos é associada ao EcPV-2 (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016; AGNEW; MACLACHLAN, 2017; FOSTER, 2017). No entanto, até o momento, não há descrição da ocorrência do vírus no Brasil.

Como citado acima, muitos papilomas de pele e mucosas em equinos – e outros animais domésticos – são induzidos por infecção por diferentes papilomavírus. Os papilomavírus possuem tropismo pelo epitélio da pele e da mucosa de animais e humanos e são espécie-específicos (MUNDAY; THOMSON; LUFF, 2017). São vírus pequenos, epiteliotrópicos, com DNA circular de fita dupla (BOGAERT et al., 2012). O ciclo de vida dos PVs é ligado à diferenciação epitelial, estratégia que permite que vírions sejam eliminados durante a descamação mucocutânea, e ajuda o vírus a escapar da resposta imune. O duplo genoma de DNA codifica genes iniciais (E) – envolvidos na replicação do genoma viral e na oncogênese –, e genes tardios (L) – que codificam as proteínas do capsídeo. Os genes iniciais são expressos em camadas mais profundas do epitélio, e o gene tardio, apenas mais superficialmente (NASIR; CAMPO, 2008). Os papilomavírus se reproduzem no núcleo de queratinócitos, e para infectar as células do estrato basal, é necessário um defeito no epitélio, como uma fissura ou erosão. Sua replicação ocorre quando as células infectadas se tornam diferenciadas, e com isso, os PVs provocam uma exacerbada proliferação de células basais e diferenciação das mesmas em queratinócitos terminais (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016).

Em humanos, a presença de DNA PV é de alto valor preditivo: com base em alguns estudos pode-se observar que mulheres que desenvolveram carcinomas cervicais são positivas para DNA PV, enquanto que as negativas para PV não desenvolvem esse tumor. Contudo, apenas uma parcela de mulheres positivas para o DNA PV irá desenvolver o câncer (HOWLEY; LOWY, 2006). Alguns autores acreditam que esta mesma ideia se aplique aos equinos infectados por EcPV-2 (VANDERSTRAETEN et al., 2011), pela alta percentagem de DNA viral em papilomas e CCEs, comparados à baixa percentagem do vírus em tecidos sem lesão, pelo menos na maioria dos estudos (LANGE et al., 2012). Uma investigação, no entanto, demonstrou a presença de EcPV-2 em 29% dos cavalos sem lesões penianas, por meio de *swab* genital (GREENWOOD et al., 2020<sup>2</sup>).

Sugere-se que este vírus possa ser transmitido por contato sexual, contato direto e também por vetores como os insetos (BOGAERT et al., 2012). Um artigo recente relata a presença de DNA de EcPV-2 em tecidos genitais de uma égua prenhe e em seu feto (ambos submetidos a necropsia por motivos não-relacionados à infecção). Isto sugere que a transmissão

vertical do EcPV-2 pode ocorrer antes do parto (GREENWOOD et al., 2020<sup>2</sup>). Há uma possibilidade de imunotolerância em alguns animais, o que explica por que alguns cavalos infectados não tinham evidências de soropositividade em um estudo (FISCHER et al., 2014). Quanto aos dados epidemiológicos, a infecção por EcPV-2 foi semelhante em cavalos de diferentes idades e com diversos padrões de pigmentação da pele (GREENWOOD et al., 2020<sup>2</sup>). Acredita-se que animais assintomáticos podem ter o número de cópias virais muito baixas e restrito às camadas mais profundas do epitélio estratificado, semelhante ao que ocorre na infecção por HPV. Isso poderia tornar difícil a detecção do vírus com esfregaços superficiais (GREENWOOD et al., 2020<sup>2</sup>). Apesar de EcPV-2 predominar em CCEs genitais, um estudo demonstrou a sua presença em CCEs gástricos em equinos, onde foram analisados 11 casos de CCEs gástricos, sendo todas as amostras de CCE gástrico positivas na ISH e positivas na PCR para EcPV-2. Dois PCR positivos, no entanto, foram ISH-negativos, podendo haver diferença na sensibilidade entre os 2 testes (ALLOWAY et al., 2020).

Até o momento, os mecanismos oncogênicos do EcPV-2 não foram bem estabelecidos, mas o genoma do EcPV-2 tem os oncogenes E6 e E7, genes com um papel importante na carcinogênese (ALLOWAY et al., 2020). Dentre estes, acredita-se que o E6 tenha maior importância na carcinogênese associada a EcPV-2 (HAMID et al., 2009). Em papilomavírus humano de alto risco (hr-HPVs), a proteína E6 utiliza várias vias para interagir com as células hospedeiras, incluindo aquelas envolvendo o ciclo celular e a inativação do gene p53 (FISCHER et al., 2014). Acredita-se que o mesmo ocorra na infecção por EcPV-2 (ALLOWAY et al., 2020). Muitas perguntas relacionadas à carcinogênese do EcPV-2, no entanto, ainda permanecem sem resposta. O vírus foi identificado em até 29% de equinos assintomáticos, o que torna difícil entender porque alguns equinos desenvolvem a neoplasia e outros não (GREENWOOD et al., 2020<sup>2</sup>). Apesar de se acreditar que o vírus induza a proliferação celular, ainda não foi descartada a possibilidade de que a proliferação celular facilite ou favoreça a infecção e replicação viral (GREENWOOD et al., 2020<sup>2</sup>). A prevalência da infecção não parece mudar entre animais castrados e ganhos, sugerindo que o contato sexual não seja o único meio de transmissão de EcPV-2 (GREENWOOD et al., 2020<sup>1</sup>). Finalmente, ainda não está claro qual o papel que o vírus desempenha no desenvolvimento da neoplasia equina. Alguns autores sugerem que, semelhantemente aos hr-HPVs, o EcPV-2 possa ser um fator causal, mas insuficiente na etiopatogenia de CCEs genitais em equinos (GREENWOOD et al., 2020<sup>1</sup>).

Com base no exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo investigar a presença de EcPV-2 em papilomas e CCEs genitais de equinos machos diagnosticados na necropsia ou no serviço de exames histopatológicos do Laboratório de Patologia Veterinária

(LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) ou no serviço de exames histopatológicos do Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).



**2 ARTIGO - DETECTION OF EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS-2 IN  
EQUINE PENILE/PREPUTIAL PAPILLOMAS AND SQUAMOUS CELL  
CARCINOMAS IN SOUTHERN BRAZIL**

Artigo a ser submetido para o periódico Brazilian Journal of Microbiology

## **Detection of *Equus caballus* papillomavirus-2 in equine penile/preputial papillomas and squamous cell carcinomas in southern Brazil**

Tanara Raquel de Oliveira da Silva<sup>1</sup>, Paula Nitiana Campos Gonçalves<sup>1</sup>, Valentina Berté Marcus<sup>1</sup>, Carolina Mucellini<sup>2</sup>, Igor Ribeiro dos Santos<sup>3</sup>, Glaucia Kommers<sup>1</sup>, David Driemeier<sup>3</sup>, Eduardo Furtado Flores<sup>2</sup>, Juliana Felipetto Cargnelutti<sup>4</sup>, Mariana M. Flores<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), Brasil

<sup>2</sup>Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), Brasil

<sup>3</sup>Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), Brasil

\*Autor para correspondência, Avenida Roraima, 1000, 97015-900. [marianamflores@yahoo.com.br](mailto:marianamflores@yahoo.com.br)

Silva, R.O.S. – 0000-0002-3246-223X

Gonçalves, P.N.C. – 0000-0002-8421-3673

Marcus, V.B.M. – 0000-0003-1817-5119

Mucellini, C. – 0000-0002-4166-794X

Santos, I. R. – 0000-0002-4247-7478

Kommers, G. – [0000-0002-2255-3015](https://orcid.org/0000-0002-2255-3015)

Driemeier, D. – 0000-0003-3766-0654

Flores, E.F. – 000-0002-5074-6025

Cargnelutti, J.F. – 0000-0002-3160-3643

Flores, M.F. – [0000-0002-2754-6885](https://orcid.org/0000-0002-2754-6885)

**Abstract**

For approximately one decade, a novel papillomavirus termed *Equus caballus papillomavirus-2* (EcPV-2) has been associated with equine penile/preputial papillomas and squamous cell carcinomas (SCC's). It is currently believed that the virus has a carcinogenic activity, being able to induce such neoplastic lesions. After being first described, EcPV-2 has been detected in many countries from North America, Europe and Asia, however, to date, it has not been reported in Brazil. The aim of this research was to investigate the presence of EcPV-2 in penile/preputial papillomas and SCC's of Brazilian horses. Forty samples diagnosed as equine penile and/or preputial papillomas, carcinomas in situ (CIS) or SCC's in two veterinary anatomic pathology services from southern Brazil were investigated. Histologic evaluation and immunohistochemistry (IHC) using a BPV-1 antibody were performed. Posteriorly, the samples were submitted to Polymerase Chain Reaction using two broad spectrum (MY09/11 and FAP) and one EcPV-2-specific primer sets. Three EcPV2-positive and two PV-positive and EcPV2-negative samples were sequenced. PV antigen expression was detected in one papilloma, one CIS and two SCC's by IHC. Five SCC's, one papilloma and one CIS were PV-positive. Sequencing of the five PCR products revealed homology with EcPV-2. This study confirms the occurrence of EcPV-2 infection in Brazilian horses. Moreover, the results presented here provide useful information concerning the phylogeny from the viruses detected in our samples. We hope to encourage further studies on this novel agent, contributing to its characterization, and, possibly, to the eventual development of preventive measurements, including a possible vaccine.

**Keywords:** horse, genital, neoplasia, SCC, viral, EcPV-2.

## Introduction

Squamous cell carcinoma (SCC) is a highly prevalent malignant tumor in the penis of horses. It often behaves aggressively, invading the corpus cavernosum and causing urinary and reproductive disfunctions [3]. It may also metastasize to inguinal lymph nodes, and less commonly, to distant organs [3, 11]. Genital papillomas are common benign viral-induced tumors that may eventually progress to SCC's [3,19].

Papillomaviruses (PV) are nonenveloped viruses with a double-stranded DNA genome that are frequently involved in the genesis of cutaneous and mucocutaneous papillomas in humans and domestic animals [11]. Although some PV's are associated with canine and feline SCC's, such association had not been done for equine SCC's until recently [4]. For approximately one decade, a novel PV, *Equus caballus papillomavirus-2* (EcPV-2), has been recognized as a potential cause of a subset of genital SCC's and papillomas in horses ([16, 19]. This is the first time a PV has been associated with SCC's in equines. Despite having already been detected in SCC's from other locations and in non-neoplastic tissues, EcPV-2 appears to have a tropism for the male genital tract [1, 6, 8, 19]. It is now generally accepted that EcPV-2 plays a role in the development of these SCC's, similarly to what occurs with human papillomavirus and uterine cancer [5, 6, 8, 16, 18]. Many aspects concerning EcPV-2 transmission and carcinogenesis, however, remain obscure.

After being first described, EcPV-2 has been detected in many countries, including Austria, Belgium, Canada, Japan, Korea, New Zealand, Switzerland, United States and United Kingdom [2, 5, 7-10, 12, 18, 21]. However, to date, this virus has not been reported in Brazil. Investigations on the geographic distribution and phylogenetic variations of this new virus may help understanding different aspects on transmission and carcinogenesis, ultimately contributing to the development of preventive measures and screening protocols. The aim of this study was to investigate the presence of EcPV-2 in penile papillomas and SCC's of Brazilian horses.

## Material and methods

Forty samples diagnosed as equine penile and/or preputial papillomas (n=3), squamous cell carcinomas in situ (CIS) (n=3) and SCC's (n=34) in two veterinary anatomic pathology services from southern Brazil (Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria and Setor de Patologia Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul) were selected in a retrospective approach (2000-2021). Paraffin-embedded tissues were retrieved and used for histologic evaluation, immunohistochemistry (IHC) and molecular analysis. When more than one block existed for a single sample, all sections were histologically

evaluated; the block with most affected tissue and, when possible, with adjacent non-neoplastic epithelium, was selected for IHC and PCR. Patient details were collected from histopathology reports.

### **Histopathology**

All tumors were searched for vascular invasion, secondary lymphoplasmacytic inflammation, koilocytes and intranuclear viral inclusions. Invasive SCCs were classified into well-differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated according to Goldschmidt & Goldschmidt [4]. Histologic evaluation also allowed selecting the best tissue samples for IHC in cases with more than one paraffin block available.

### **Immunohistochemistry**

The tissues were submitted to IHC using a polyclonal antibody against bovine papillomavirus-1 (anti-rabbit, code B-0580). Antigen retrieval was performed by microwaving (10 min at full power) in TRIS-EDTA pH 9. Sections were incubated with the primary antibody diluted in phosphate-buffered saline with Tween 20 (1:200) for 1 h at 37°C. A polymer-HRP system (Easypath, São Paulo, Brazil) was used, followed by substrate development with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Easypath). Two cutaneous viral papillomas (from a cow and a horse) were used as positive controls. For negative controls, the same test sections were used, and the primary antibody was replaced by phosphate-buffered saline with Tween 20.

### **Polymerase chain reaction (PCR)**

Paraffin-embedded tissues from all samples were subjected to PCR using two broad spectrum (MY09/11 and FAP) and one EcPV-2-specific primer sets. Samples that were positive in the broad-spectrum PCR were considered "PV-positive", and those that were negative were "PV-negative". Samples that were positive in the EcPV-2-specific PCR were considered "EcPV2-positive" and those that were negative were "EcPV2-negative". For both PCR protocols, DNA extraction was performed using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN®) according to instructions by the producer. The extracted products were then submitted to a first protocol using the following primers: FAP58/FAP64 and MY09/MY11 as previously described [17]. The PCR products were visualized in a 1.5% agarose gel stained with Gel Red® under UV light after electrophoresis (80v for 60 min.). As positive and negative controls, DNA extracted from a canine viral papilloma and TRIS-EDTA were used, respectively. In the second PCR, primers were designed for amplification of a 306 bp segment of the L1 gene of EcPV-2, based on alignment of the EcPV-2 isolates (HM461973.1 e EU503122.1). Sequences were as follows: EcPV-2For (5'-TCCTCCACCAATTTTAAA-ACCTAT-3') and EcPV-2Rev (5-'ATCCAAGTCAAGG-GAAAG-3'), according to Greenwood et al. [5]. Reactions were performed using the *Taq* DNA Polymerase, Recombinant Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) with a final volume of 25ul, using 2ul of DNA, 0.5µM of each

primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs, 1x buffer and 2U of Taq polymerase (Invitrogen®). Conditions were as follows: initial denaturation (94°C 2min), 35 cycles of 94°C/30s; annealing at 58,4°C/30sec and extension at 72°C/60 sec. A final extension step was used at 72°C for 10 minutes, then held at 10°C. The PCR products were visualized in a 2% agarose gel, stained with Gel Red® under UV light after electrophoresis (100v for 50 min.). For positive and negative controls, DNA extracted from a known EcPV-2-positive genital SCC and TRIS-EDTA were used, respectively. Three EcPV2-positive and two PV-positive/EcPV2-negative samples were sequenced. The amplicons were purified using the Pure Link Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Thermo Scientific®), according to the manufacturer's instructions. Each amplicon was sequenced two times in an automatic sequencer (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer®). Results were compared to sequences published in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) using the BLAST tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All obtained sequences were included in a phylogenetic analysis. Phylogeny was inferred by maximum likelihood (ML) method and General Time Reversible model obtained by an alignment of a partial sequence of L1 gene of EcPV in MEGA X software.

## Results

The affected animals varied from 7 to 25 years old (median 13.2). Only five animals had their reproductive status informed: two geldings and three stallions. The most common breed was *Crioula* (16/40) followed by one each of *Mangalarga marchador*, Appaloosa and Hanoverian. Seventeen horses were mixed breed. The remaining animals did not have their breed informed.

Variable degrees of lymphoplasmacytic inflammation were observed within all tumors. Lymphatic (2/37) or blood (2/37) vascular invasion was occasionally observed in SCC's. All papillomas and some CIS (2/3) (Fig. 1a) and SCC's (9/34) had occasional koilocytes. They were observed within the neoplastic epithelium of papillomas and CIS and within the non-neoplastic epithelium adjacent to some SCC's. They were swollen keratinocytes in the stratum spinosum and/or granulosum either containing a clear perinuclear vacuole and a pycnotic, condensed, nucleus or presenting a diffusely lightly eosinophilic to basophilic cytoplasm – occasionally with clear vacuoles – and an enlarged nucleus. Well-differentiated SCC's (19/34) were the most common, followed by moderately (11/34) and poorly differentiated (4/34).

Papillomavirus antigen expression was detected in four (4/40) samples by IHC (Table 1) and was always patchy within these tumors. It was seen uncommonly in the nucleus of individual neoplastic keratinocytes within the papilloma and the CIS and in rare keratinocytes in the non-neoplastic epithelium adjacent to SCC's. Labelled

cells were restricted to the superficial epithelium, predominated in the stratum spinosum and granulosum, and positivity was most common in koilocytes (Fig 1b). Neoplastic keratinocytes invading the dermis or entering blood/lymphatic vessels did not have any antigen expression. When present, labelling was always strong and diffuse within the nucleus. No cytoplasmic antigen expression was observed.

Seven (7/40) tumors were PV-positive and five of these (5/40) were EcPV2-positive (Tables 1, 2). Amplicons from five samples (three EcPV2-positive/PV-positive and two EcPV2-negative/PV-positive) were sequenced and included in a phylogenetic analysis. The genetic sequence was compatible with EcPV-2 (GenBank access number EU503122). EcPV type and GenBank accession numbers are indicated in the phylogenetic tree (Fig 2). Details on the seven EcPV2-positive horses are shown in Table 2.

## **Discussion**

By means of this investigation, it was possible to detect EcPV-2 DNA in the penis/prepuce of five SCC's, one CIS and one papilloma of Brazilian horses, constituting approximately 18% of the analyzed samples. It is important to emphasize that the first EcPV2-positive case from this retrospective investigation dates from 2004, which means this infection has been occurring in Brazil for a long time without being diagnosed.

Approximately 18% of the male genital tumors included in this study were EcPV-2 positive. Other investigations had a prevalence varying from 29 to 100% [2, 5, 7, 12]. Comparing the percentage of positive tumors from different studies, however, is difficult due to significant variations in the methodologies adopted for sample collection and viral detection. PCR is a highly sensible technique for PV detection in domestic animals [4]. Unfortunately, it can lose sensitivity when performed in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) samples [16]. For this reason, the possibility of some of the tumors from this investigation being false-negative for EcPV-2 DNA cannot be ruled out. It is also important to emphasize that IHC had an important role in this study, allowing us to demonstrate viral antigen expression within the nuclei of neoplastic and neighboring non-neoplastic keratinocytes, most of which were koilocytes. This, in turn, strengthens the idea of EcPV-2 playing a role in keratinocyte proliferation [1]. IHC was less sensitive when compared to PCR, a result that was already expected [7, 8]. This can be attributed to several reasons, from epitope damage induced by formalin fixation to the fact that these two techniques have different targets [14]. While PCR detects viral DNA, the antibody used in IHC is specific for structural capsid antigens, which makes both techniques somewhat complementary to each other [7].

Different degrees of intratumoral lymphoplasmacytic inflammation were observed in all tumors investigated in this study. Although the presence of lymphocytes within a virus-infected tumor could represent an

immune response to viral infection, this could also be a lymphocytic reaction to the tumor itself [13]. Some subsets of lymphocytes have a particularly important role in the immune response to neoplastic and virus-infected cells, and their presence within papillomas and SCC's is well described [4, 13, 15]. No lymphocyte phenotyping was performed in this study, which did not allow us to determine the role of inflammation in these tumors. Another important histologic finding were occasional swollen cells with a clear, vacuolated cytoplasm and a condensed to enlarged nucleus, interpreted as koilocytes [4]. They were observed in all papillomas and some of the carcinomas from this study and were frequently positive for antigen expression, similarly to what was observed in previous studies [9, 19]. The presence of koilocytes is important in the suspicion of a viral etiology, however, they may go unnoticed, particularly in SCCs [4].

Even with low numbers of early lesions (papillomas and CIS) included in this investigation, we were able to detect EcPV-2 in one papilloma and one CIS, in addition to SCC's. Greenwood et al. [5] were unable to detect EcPV-2 in male genital CIS, probably due to the low number of in situ lesions included in their study. Similarly to infections with other PVs with carcinogenic potential, the chances of detecting EcPV-2 within a tumor are believed to be higher in early lesions when compared to invasive carcinomas [5]. This is attributed to the fact that as the tumor evolves, PV is no longer necessary to its progression, and in many instances, it may be eliminated [1]. In agreement with this hypothesis, antigen expression confirmed in two SCC's from this study was always restricted to the neighboring non-neoplastic epithelium from transitional areas, while neoplastic keratinocytes invading subjacent tissues were negative. The SCC's with viral antigen expression and/or molecular findings indicating PV infection had variable degrees of differentiation, indicating that poorly differentiated tumors may also be associated with viral infection. In that line of thought, EcPV-2 has been demonstrated in metastatic lesions, which shows it might also persist in some advanced lesions [20].

In this study, we only investigated genital tissues affected by epithelial neoplasms, however, asymptomatic horses may be EcPV-2-positive as well [2, 6]. Recently, a Canadian group has demonstrated similar rates of EcPV-2 infection between normal and neoplastic penile tissues [5, 6]. Additionally, 36% of healthy Canadian horses were seropositive for EcPV-2 [6]. This strengthens the idea that asymptomatic infection is more frequent than thought. It is possible that only some of these infected horses will evolve to neoplasia, similarly to what occurs with HPV-infected women. In the other hand, the tropism for male genital tissues, independently of them being neoplastic or not, is well established [2, 5, 12]. Although it may suggest EcPV-2 is sexually transmitted, an association between breeding status has not been established in many investigations, and several EcPV-2-positive horses are geldings, which suggests there are other routes of transmission [2, 5, 9]. In our study,



unfortunately, information regarding reproductive status was scarce and did not allow any association with EcPV-2 positivity. Semen and milk samples were reportedly negative for EcPV-2 in a previous study [18], and apparently, this virus can be transmitted in uterus [6], although this route has not been thoroughly investigated. Despite the large number of studies in the last decades, EcPV-2 transmission routes are still poorly understood.

Phylogenic analyses revealed little variations between the EcPV-2 sequences detected in our samples. By means of this kind of analysis, different EcPV-2 variants have been observed in other studies, however, with no associations with type of lesions [2, 9, 16]. The results from this study provide useful information concerning the prevalence and phylogeny of EcPV-2 in penile tumors from Brazilian horses. We hope to encourage further studies on this novel agent, contributing to its characterization, and mainly to future infection preventive measures.

#### **Declarations**

#### **Acknowledgments**

To the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) and Setor de Virologia (SV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and Serviço de Patologia Veterinária (SPV) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### **Funding**

This research was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do RS (FAPERGS) (process number 19/2551-0001324-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Tanara da Silva has a scholarship from CAPES; Eduardo F Flores and Glaucia D Kommers have a fellowship from CnPQ.

#### **Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)**

The authors do not have any conflict of interest do declare.

#### **Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)**

This research is within the ethical guidelines for animal welfare. Since it did not involve any experiments with live animals, it was not submitted to an ethical committee.

#### **Consent to participate (include appropriate statements)**

Not applicable.

#### **Consent for publication (include appropriate statements)**

Not applicable.

#### **Authors' contributions (mandatory: please see more information here)**

All authors whose names appear on the submission have made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; drafted the work or revised it critically for important intellectual content; approved the version to be published; and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### Referências

- 1 Alloway E, Linder K, May S, Rose T, DeLay J, Bender S, Tucker A, Luff J (2020) A subset of equine gastric squamous cell carcinomas is associated with *Equus caballus papillomavirus-2* infection. *Vet Pathol* 57, 427 - 431. <https://doi.org/10.1177/0300985820908797>
- 2 Bogaert L, Willemsen A, Vanderstraeten E, Bracho M, Baere C, Bravo IG, Martens A (2012) EcPV2 DNA in equine genital squamous cell carcinomas and normal genital mucosa. *Vet Microbiol* 158, p. 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.005>
- 3 Foster RA (2016) Integumentary System. In: Maxie MG (ed) Jubb, Kennedy and Palmers' Pathology of Domestic Animals, V3, 6<sup>th</sup> edn. Elsevier, St Louis, pp 509.
- 4 Goldschmidt MH, Goldschmidt KH (2017) Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In: Meuten DJ (ed.) Tumors in Domestic Animals, 5<sup>th</sup> edn. John Wiley & Sons Inc., Ames, pp 91-99.
- 5 Greenwood S, Chow-Lockerbie B, Epp T, Knight C, Wachoski-Dark G, MacDonald-Dickinson V, Wobeser B (2020) Prevalence and prognostic impact of *Equus caballus papillomavirus* type 2 infection in equine squamous cell carcinomas in Western Canadian Horses. *Vet Pathol* 57(5):623–631. <https://doi.org/10.1177/0300985820941266>
- 6 Greenwood S, Chow-Lockerbie B, Ramsauer S, Wachoski-Dark G, Knight C, Wobeser B (2020) Prevalence of *Equus caballus Papillomavirus* type-2 Infection and Seropositivity in Asymptomatic Western Canadian Horses. *Vet Pathol* 57(5):632–651. <https://doi.org/10.1177/0300985820941270>
- 7 Knight CG, Munday JS, Peters J, Dunowska M (2011) Equine penile squamous cell carcinomas are associated with the presence of equine papillomavirus type-2 DNA sequences. *Vet Pathol* 48:1190–1194. <https://doi.org/10.1177/0300985810396516>
- 8 Knight CG, Munday JS, Peters J, Dunowska M (2013) Comparison of the levels of *Equus caballus papillomavirus* type 2 (EcPV-2) DNA in equine squamous cell carcinomas and non-cancerous tissues using quantitative PCR. *Vet Microbiol* 166: 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.004>

- 9 Lange CE, Tobler K, Lehner A, Grest P, Welle MM, Schwarzwald CC, Favrot C (2012) EcPV2 DNA in equine Papillomas and *in situ* and invasive squamous cell carcinomas supports papillomavirus etiology. *Vet Pathol* 50:686–692. <https://doi.org/10.1177/0300985812463403>
- 10 Lee SK, Lee JK, Lee I (2019) Molecular detection of *Equus caballus* papillomavirus type 2 in genital swabs from healthy horses in the Republic of Korea. *J Equine Vet Sci* 72, 97-100. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.015>
- 11 Mauldin EA, Peters-Kennedy J (2016) Integumentary System. In: Maxie MG (ed) Jubb, Kennedy and Palmers' Pathology of Domestic Animals, V1, 6<sup>th</sup> edn. Elsevier, St. Louis, pp 706.
- 12 Newkirk K, Hendrix D, Anis E, Rohrbach BW, Ehrhart EJ, Lyons JA, Kania SA (2014) Detection of papillomavirus in equine periocular and penile squamous cell carcinoma. *J Vet Diagn Invest* 26:131–135. <https://doi.org/10.1177/1040638713511618>
- 13 Pérez J, Mozos E, Martín MP, Day MJ (1999) Immunohistochemical Study of the Inflammatory Infiltrate Associated with Equine Squamous Cell Carcinoma. *J Comp Pathol* 121(4):385-397. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0336>
- 14 Ramos-Vara, JA, Miller, MA (2014) When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet Pathol* 51(1) 42-87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
- 15 Santana CH, Moreira PRR, Rosolem MC, Vasconcelos RO (2016) Relationship between the inflammatory infiltrate and the degree of differentiation of the canine cutaneous squamous cell carcinoma. *Vet Anim Sci* 1-2:4-8. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2016.10.001>
- 16 Scase T, Brandt S, Kainzbauer C, Sykora S, Bijmolt S, Hughes K, Sharpe S, Foote A (2010) *Equus caballus papillomavirus-2* (EcPV-2): an infectious cause for equine genital cancer? *Equine Vet J*. 42(8):738–745. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00311.x>
- 17 Silva MS, Weiss M, Brum MCS, Anjos BL, Torres FD, Weiblen R, Flores EFF (2010) Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 22:603-606. <https://doi.org/10.1177/104063871002200417>
- 18 Sykora S, Samek L, Schönthaler K, Palm F, Borzacchiello G, Aurich C, Brandt S (2012) EcPV-2 is transcriptionally active in equine SCC but only rarely detectable in swabs and semen from healthy horses. *Vet Microbiol* 158 (1–2): 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.006>

- 19 Smith M, Levine D, Getman L, Parente E, Engiles J (2010) Case Report: Vulvar squamous cell carcinoma *in situ* within viral papillomas in an aged Quarter Horse mare. Equine Vet Educ 21(1):11-16. <https://doi.org/10.2746/095777309X390551>
- 20 Zhu K, Affolter V, Gaynor A, Dela Cruz Jr. F, Pesavento P (2015) Equine Genital Squamous Cell Carcinoma: *In Situ* Hybridization Identifies a Distinct Subset Containing *Equus caballus* Papillomavirus 2. Vet Pathol 52 (6): 1067-72. <https://doi.org/10.1177/0300985815583095>
- 21 Yamashita-kawanishi N, Ito S, Chamers JK, Uchida K, Sato M, Chang HW, Knight C, Meer F, Haga T (2021) Vulvar squamous cell carcinoma associated with *Equus caballus* papillomavirus type 2 infection in a Japanese mare. Tumour Virus Research 12:200226. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200226>

Table 1. Prevalence of *Equus caballus* Papillomavirus-2 (EcPV-2) in squamous cell carcinomas (SCC), carcinomas in situ (CIS) and papillomas in forty Brazilian horses.

Tumor	PV antigen expression (IHC)	PV-positive (PCR)	EcPV-2 positive (PCR)	Sequencing compatible with EcPV-2
SCC (34)	2/34	5/17	3/34	5/5
CIS (3)	1/3	1/3	1/3	Not performed
Papilloma (3)	1/3	1/3	1/3	Not performed
Total (40)	4/40	7/23	5/40	5/5

Table 2. Epidemiologic information, antigen expression and molecular analysis in nine equine penile tumors with antigen expression and/or molecular findings indicative of papillomavirus infection

Case n°	Age	Reproductive status	Diagnosis	Koilocytes	PV antigen expression (IHC)	PV-positive (PCR)	EcPV-2 positive (PCR)	Sequence compatible with EcPV-2
1	13 y	n.i.	SCC, MD	Yes	-	+	-	Yes
2	n.i.	n.i.	SCC, MD	No	-	+	+	Yes
3	16 y	Stallion	CIS	Yes	+	+	+	Not performed
4	22 y	n.i.	SCC, PD	No	-	+	-	Yes
5	21 y	n.i.	SCC, WD	No	-	+	+	Yes
6	n.i.	n.i.	SCC, WD	Yes	-	+	+	Yes
7	10 y	n.i.	Papilloma	Yes	+	+	+	Not performed
8	25 y	n.i.	SCC, WD	Yes	+	-	-	Not performed
9	10 y	n.i.	SCC, WD	Yes	+	-	-	Not performed

PV: papillomavirus, y: years, n.i.: not informed, SCC: squamous cell carcinoma, CIS: carcinoma in situ, MD: moderately differentiated, PD: poorly differentiated, WD: well-differentiated.

**Figure Legends**

Figure 1a. Carcinoma in situ (case n°3). Some of the neoplastic keratinocytes are swollen, degenerated, with a diffusely lightly basophilic cytoplasm and an enlarged nucleus. In some of these cells, a clear perinuclear vacuole is observed. Figure 1b. Carcinoma in situ (case n°3). The degenerated keratinocytes shown in figure 1a were frequently positive for PV antigen expression in immunohistochemistry. Figure 2. Phylogenetic tree. Phylogeny inferred by maximum likelihood (ML) method and General Time Reversible model obtained by an alignment of a partial sequence of L1 gene of EcPV in MEGA X software. EcPV type and GenBank accession numbers are indicated in the tree. Bootstraps of 1000 replicates were used and >60 values are shown at the internal nodes. Sequences obtained in this article are highlighted with a black circle.

Figure 1a

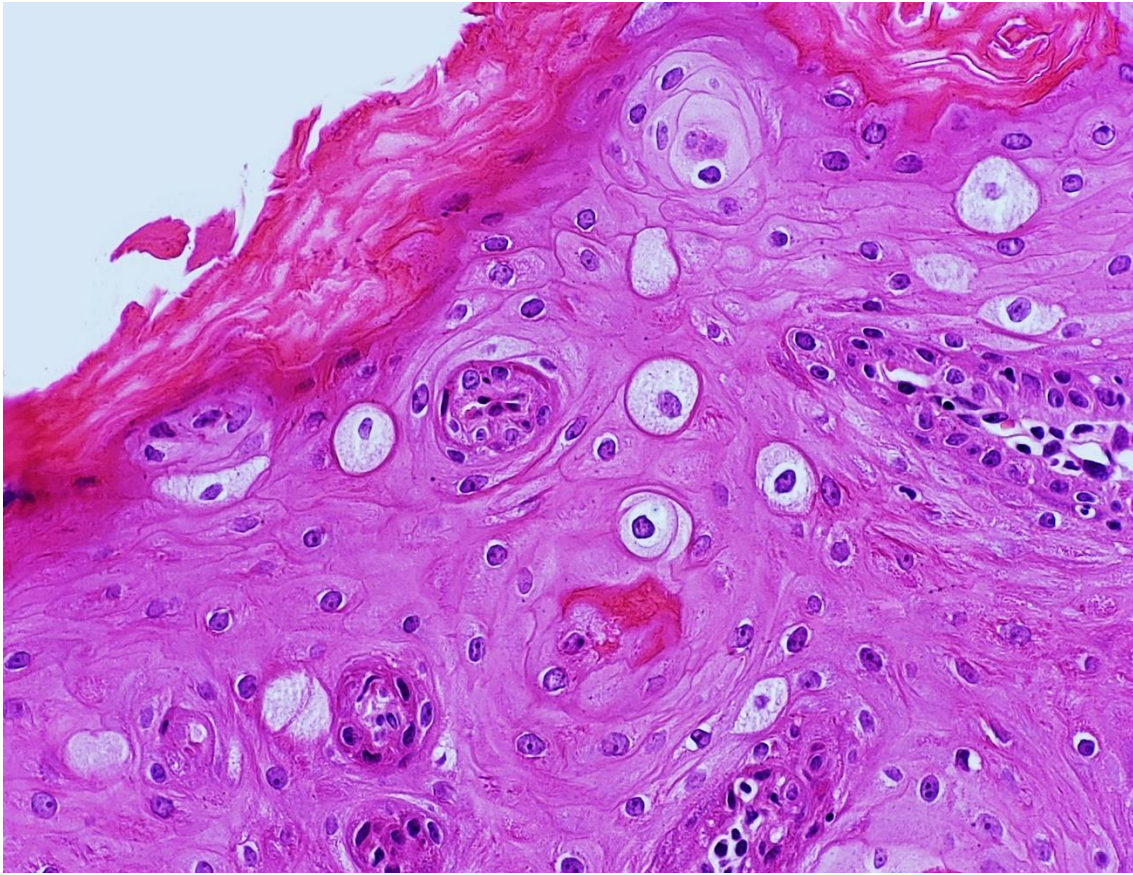




Figure 1b

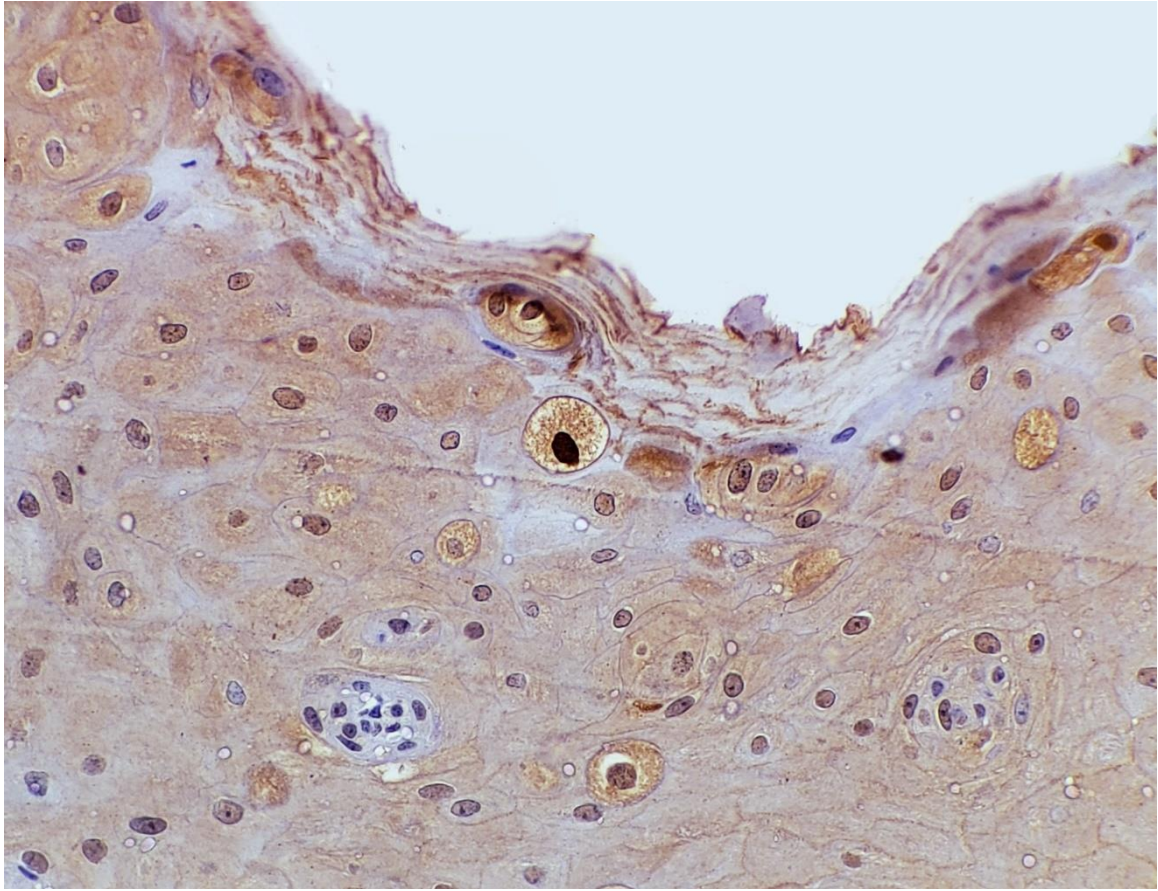
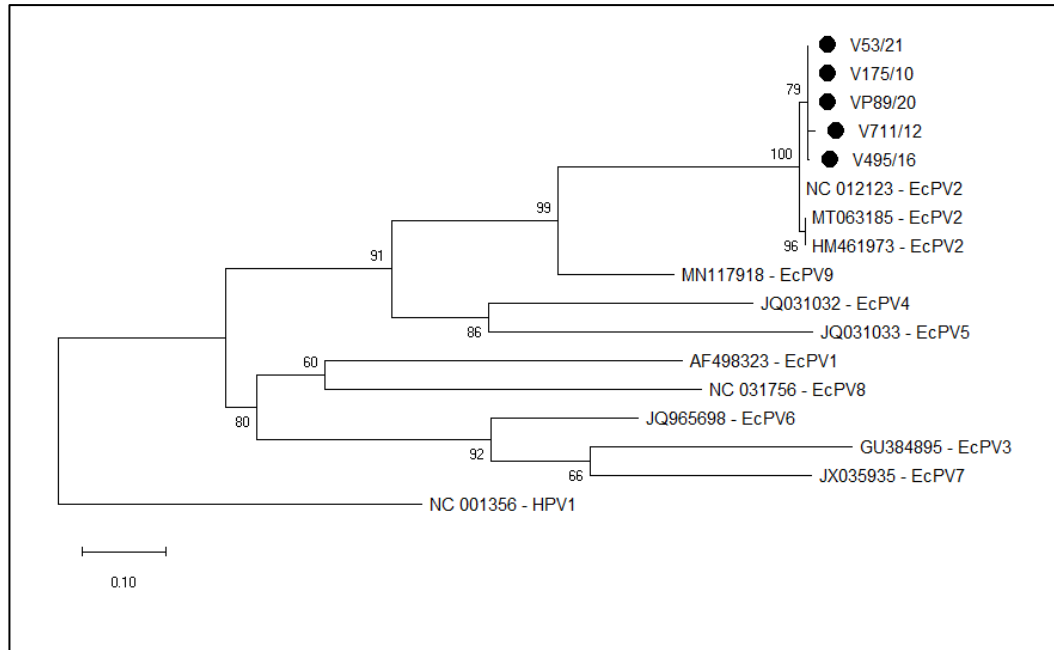


Figure 2



### 3 CONCLUSÃO

Concluimos que o EcPV-2 está presente em CCEs e papilomas genitais de equinos machos no Brasil.

### REFERÊNCIAS

- AGNEW, D. W.; N. MACLACHLAN, J. Tumors of the Genital Systems In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. John Wiley & Sons, Inc, 2017. Cap. 16, p. 718.
- BATAIER, M. N. et al. **Carcinoma de células escamosas em prepúcio de equino: Relato de Caso**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária – Ano IX, n. 18, 2012.
- EDWARDS, J.F. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. **Animal Reproductive Science**, v.107, n. 3, p.197-207, 2008.
- FISCHER, N.M.et al. Serum antibodies and DNA indicate a high prevalence of equine papillomavirus 2 (EcPV2) among horses in Switzerland. **Vet Dermatol**, 25(3):210–254, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.12129>>. Acesso em: 10 out. 2021
- HAMID N.A, et al. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. **Cell Mol Life Sci**, 66(10):1700–1717, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-009-8631-7>>. Acesso em: 10 out. 2021
- HOWLEY, P. M; LOWY D. R. Papillomaviruses. In: KNIPE D. M, HOWLEY P. M, eds. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wikins. 2299–2354, 2006.
- KING, A. M. Q. et al. Family Papillomaviridae. In: **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 235-239, 2012.
- MUNDAY, J. S; THOMSON N. A; LUFF J. A. Papillomaviruses in dogs and cats. **Vet J.**, 225:23-31, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.018>>. Acesso em: 10 out. 2021
- NASIR, L., CAMPO, M.S. Bovine papillomaviruses: their role in a etiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Vet Dermatol**, 19, 243-254, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00683.x>>. Acesso em: 10 out. 2021
- PORCELLATO, I. et al. Equus caballus papillomavirus type 2 (EcPV2) in co-occurring vulvar and gastric lesions of a pony. **Research in Veterinary Science**, 132 167–171, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.003>>. Acesso em: 10 out. 2021
- RABBERS, A. S. Diagnóstico clínico, laboratorial e tratamento cirúrgico do carcinoma de células escamosas no genital de equinos machos: relatos de dois casos. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 21, n. 1, p. 12-18, jan./mar, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.020>>. Acesso em: 10 out. 2021

ROCHA, J.R. et al. Carcinoma de Células Escamosas em Cães – Relato de Caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – Ano VIII, n.14, 2010.

SCOTT, D.W.; MILLER, W. H. Jr. Equine Dermatology, 1st 297 edition, **Elsevier Science**, 298 St Louis. p 707, 2003.

SYKORA S.; BRANDT S. Papillomavirus infection and squamous cell carcinoma in horses. **Vet J.** 223:48–54, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.05.007>>. Acesso em 10 out. 2021

TATIBANA, L. S. et al. Dermatite solar em cães e gatos: revisão de literatura e relato de casos em cães. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária*, V.9, n.28, 49-54, 2011.

TOING, P. et al. First Detection and Genetic Characterization of Equus Caballus Papillomavírus 1, 2 and 7 in China. **Research Square**, 2021: Preprint (versão 1). Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-243215/v1>>. Acesso em: 10out. 2021

TÚLIO, L. M. et al. Paraparesia espástica e hiperreflexia em um bovino associada a carcinoma de células escamosas: relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, 1, suplemento, 76-82, 2009.

VAN DEN TOP, J. G. et al. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse and proposal of a classification system. **Equine Veterinary Education**, v. 23, n. 12, p. 636–648, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2010.00216.x>>. Acesso em: 10 out. 2021

VAN DEN TOP, J. G. et al. Penile and preputial tumours in the horse: Literature review and proposal of a standardised approach. **Equine Vet. Journal**, 42, 746–757, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00290.x>>. Acesso em 10 out. 2021

VAN DEN TOP, J. G. et al. Penile and preputial tumours in the horse: A retrospective study of 114 affected horses. **Equine Vet. Journal**. 40: 528–532, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2746/042516408x281180>>. Acesso em: 10 out. 2021

VANDERSTRAETEN, E. et al. EcPV2 DNA in equine squamous cell carcinomas and normal genital and ocular mucosa. **Vet Microbiol**. 147:292–299, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.008>>. Acesso em: 10 out. 2021