

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Sarcoide equino no sul do Rio Grande do Sul: casuística de 20 anos

Fabiano da Rosa Venancio

Pelotas, 2022

Fabiano da Rosa Venancio

Sarcoide equino no sul do Rio Grande do Sul: casuística de 20 anos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dra. Ana Lucia Schild

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V448s Venancio, Fabiano da Rosa

Sarcoide equino no sul do Rio Grande do Sul: :
casuística de 20 anos / Fabiano da Rosa Venancio ; Ana
Lucia Pereira Schild, orientadora. — Pelotas, 2022.

40 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas, 2022.

1. Equino. 2. Imunohistoquímica. 3. Neoplasia cutânea.
4. Papilomavírus bovino. 5. Reação em cadeia da
polimerase (pcr). I. Schild, Ana Lucia Pereira, orient. II.
Título.

CDD : 636.1

Fabiano da Rosa Venancio

Sarcoide equino no sul do Rio Grande do Sul: casuística de 20 anos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2022

Banca examinadora:

Dr^a. Ana Lucia Pereira Schild. (Orientador)
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Eliza Simone Viégas Sallis
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a. Silvia Regina Leal Ladeira
Doutora em Ciencias Veterinarias pela Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Prof. Dr. Clairton Marcolongo Pereira
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

VENANCIO, Fabiano da Rosa. **Sarcoide equino no sul do Rio Grande do Sul: casuística de 20 anos.** 2022. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Os objetivos desta dissertação foram estudar a epidemiologia e a distribuição das lesões do sarcoide equino recebidos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) em um período de 20 anos, bem como determinar os principais tipos de sarcoide e, por meio da técnica de PCR, identificar o tipo de papilomavirus bovino (BPV) envolvido nas lesões dos equinos da região. Os casos de sarcoide equino recebidos no período de 2000 a 2020 foram resgatados por meio da revisão dos protocolos de necropsia do LRD/UFPel. Os blocos parafinados de cada um dos casos foram cortados em secções de 3-5µm de espessura, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente reavaliados em microscópio ótico. As características macroscópicas descritas nos protocolos associadas à histopatologia permitiram determinar o tipo de sarcoide em cada caso. As amostras encaminhadas ao LRD/UFPel no ano de 2021 foram divididas sendo uma parte fixada em formalina 10% tamponada para histopatologia e imunohistoquímica (IHQ) e outra parte encaminhada congelada ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPel), para identificar a presença de BPVs através da técnica molecular de PCR. No período estudado foram diagnosticados 258 casos de sarcoide representando 41,95% dos casos de lesões de pele em equinos. Destes, 75,96% ocorreram em equinos da raça Crioula. Equinos com idade entre dois e cinco anos (42,64%) foram os mais afetados. Em 46,8% dos casos os sarcoides eram do tipo fibroblástico. Dos 258 casos 61% eram únicos e em 32% dos casos as lesões eram múltiplas. A IHQ foi negativa para proteína S-100 e positiva para vimentina. O presente trabalho demonstrou que na Região Sul do Rio Grande do Sul sarcoide equino é a mais importante neoplasia cutânea dos equinos.

Observou-se que a doença ocorre principalmente em animais da raça Crioula, que é a mais numerosa na região e que equinos de 24 meses a cinco anos estão entre os mais frequentemente afetados. As lesões únicas são as mais numerosas e ocorrem nos membros. Foi possível sugerir que as lesões de sarcoide menores que 7,5 cm têm mais possibilidade de não recidivar após a excisão completa. O tipo mais frequentemente diagnosticado é o fibroblástico. O genoma dos BPVs não foi detectado pela PCR nas amostras analisadas. Estes resultados demonstram que as técnicas convencionais de diagnóstico podem estar subestimando a diversidade genética desta família viral. No presente estudo, foram utilizados os primers degenerados FAP59/64, (amplamente utilizados na literatura científica), porém com limitações inerentes devido a diversidade genética dos BPVs.

Palavras-chave: Equino, Imunohistoquímica, Neoplasia cutânea, Papilomavírus bovino, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Sarcoide Equino.

Abstract

VENANCIO, Fabiano da Rosa. **Equine sarcoid in southern Rio Grande do Sul: a 20-year sample.** 2022. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

The goal of this dissertation was study the epidemiology and distribution of equine sarcoid lesions received at the Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) in a period of 20 years. The main types of sarcoid were also determined and, by the PCR technique, the type of bovine papillomavirus (BPV) involved in the lesions of horses in the region were identified. The equine sarcoid cases received in the period from 2000 to 2020 were rescued by reviewing the LRD/UFPel necropsy protocols. The paraffin blocks of each case were cut into 3-5 μ m thick sections, stained using the hematoxylin and eosin (HE) technique. The macroscopic characteristics described in the protocols associated with histopathology allowed the determination of the type of sarcoid in each case. The samples sent to the LRD/UFPel in 2021 were divided, with a part fixed in 10% buffered formalin for histopathology and immunohistochemistry (IHC) and another part sent frozen to the Laboratório de Virologia e imunologia da universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPel), to identify the presence of BPVs through the molecular technique of PCR. In the period studied, 258 cases of sarcoid were diagnosed, representing 41.95% of cases of skin lesions in horses. Of these, 75.96% occurred in Crioulo horses. Horses aged between two and five years (42.64%) were the most affected. In 46.8% of the cases, the sarcoids were of the fibroblastic type. Of the 258 cases, 61% were single and in 32% of the cases the lesions were multiple. The IHC was negative for protein S-100 and positive for vimentin. The present paper showed that in the southern region of Rio Grande do Sul, equine sarcoid is the most important equine skin neoplasm. It was observed that the disease occurs mainly in animals of the Crioulo breed, which is the most numerous in the region and that horses aged 24 months to five years are among the most frequently affected. Single lesions are the most numerous and occur on the limbs.

It was possible to suggest that sarcoid lesions smaller than 7.5 cm are more likely to not recur after complete excision. The most frequently diagnosed type is fibroblastic. The BPV genome was not detected by PCR in the analyzed samples. These results demonstrate that conventional diagnostic techniques may be underestimating the genetic diversity of this viral family. In the present study, the degenerate primers FAP59/64 (widely used in the scientific literature) were used, but with inherent limitations due to the genetic diversity of BPV.

Keywords: Horse, Immunohistochemistry, Skin neoplasm, Bovine papillomavirus, Polymerase Chain Reaction (PCR), Equine Sarcoid.

.

Lista de Figuras

Artigo

- Figura 1 A) Sarcoide tipo fibroblástico na porção distal do membro anterior direito de um equino. Observam-se áreas nodulares de alopecia e ulceração. B) Aspecto histológico do sarcoide fibroblástico. Observa-se área ulcerada à direita, hiperplasia do epitélio que se projeta para a derme onde há severa proliferação fibroblástica [HE; obj. 10x]..... 26
- Figura 2 A) Sarcoide tipo misto na região de mento e no peito, tecido proliferado de aspecto nodular e alopécico de um equino. Observam-se áreas nodulares com alopecia e ulceração. B) Aspecto histológico do sarcoide misto. Observa-se hiperplasia do epitélio (rete pegs) que se projeta para a derme formando ilhas de fibroblastos neoplásicos proliferados [HE; obj. 10x]..... 27
- Figura 3 Gel de Eletroforese. C+ Controle positivo; CE+ Controle positivo da extração; A1-A7; Amostras 1 até 7 e C- Controle negativo..... 28
- Figura 4 A) Imunohistoquímica de sarcoide tipo verrucoso apresentando reação positiva para vimentina (V9 1:200 Biocare Medical) [IHQ; obj. 10x]. B) Imunohistoquímica negativa para S100P (ACI 3010 A, B 1:200 Biocare Medical). [IHQ; obj. 10x]..... 29

Lista de Tabelas

Dissertação

Tabela 1	Aspecto macroscópico dos diferentes tipos de sarcoide.....	20
----------	--	----

Artigo

Tabela 1	Sequência dos primers e tamanho esperado do amplicon da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	25
Tabela 2	Número de cada tipo de sarcoide de acordo com a característica múltiplo ou único.....	27

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão da Literatura.....	14
2.1-Definição.....	14
2.2-Epidemiologias e Aspectos Clínicos.....	15
2.3-Patologia.....	16
2.4-Patogenia.....	17
2.5-Diagnóstico.....	18
2.6-Diagnóstico Diferencial.....	18
2.7-Tratamento.....	19
3-Artigo.....	21
4-Considerações Finais.....	35
Referências.....	36

1 Introdução

O Brasil está entre os quatro países com o maior rebanho equino do mundo, com mais de cinco milhões de cabeças (BRASIL, 2016), e o Rio Grande do Sul é o segundo estado com maior número de animais. A equinocultura tem grande importância econômica e social devido aos aspectos culturais e de lazer e também devido à geração de empregos que a criação desta espécie pressupõe (RICHTER, 2017). O agronegócio do equino no Brasil movimenta por ano cerca de 7,5 bilhões de reais e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. Além disso, o equino desempenha papel importante na sociedade, que vão desde atividades terapêuticas como equoterapia para pessoas especiais, até atividades esportivas e de lazer (ALMEIDA & SILVA, 2010). Neste contexto, o diagnóstico das diferentes enfermidades que afetam esta espécie animal tem papel fundamental para reduzir perdas tanto no âmbito das criações de equinos com aptidão para o trabalho no campo, como para aqueles criados para lazer, esporte e outras atividades.

Dentre as enfermidades que afetam os equinos ao redor do mundo as lesões cutâneas estão entre as queixas clínicas mais frequentes, sendo a terceira espécie mais acometida por dermatopatias. Sua prevalência é bem conhecida nos Estados Unidos e na Europa (SCOTT & MILLER, 2003). No Brasil alguns estudos têm sido realizados sobre a prevalência das enfermidades cutâneas em equinos em diferentes regiões do País (SOUZA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2014; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014; PESSOA et al., 2014; ASSIS BRASIL et al., 2015; BIANCHI et al., 2016; ARAGÃO et al., 2018). Dentre essas enfermidades sarcoide equino destaca-se pela alta prevalência, o que ressalta a importância do estudo dessa enfermidade cutânea, com vistas a possibilitar a redução dos efeitos que a doença causa impedindo muitas vezes exposições e atividades esportivas e de trabalho para equinos afetados, devido a sua localização. É descrito em todo o mundo como uma das principais neoplasias que acometem esta espécie animal. Na região Sul do Rio Grande do Sul um estudo retrospectivo de lesões de pele em equinos demonstrou que sarcoide foi a enfermidade mais frequentemente diagnosticada representando 32,9% de todos os casos de doenças de pele em equinos entre 1978 e 2013 (ASSIS BRASIL et al., 2015).

Em estudos realizados em outras regiões do Rio Grande do Sul, sarcoide foi, também, a lesão de pele mais prevalente (SOUZA et al., 2011; BIANCHI et al., 2016). Sarcoide é, também, a principal enfermidade diagnosticada na pele desta espécie animal em Santa Catarina (ARAGÃO et al., 2018), Paraná (SPRENGER et al., 2014) e no Nordeste (PESSOA et al., 2014). Sarcoide não causa mortalidade, porém é responsável por prejuízos econômicos consideráveis na criação de equinos como restrição ao trabalho, quando as lesões se localizam em membros, e à participação em eventos devido a questões estéticas (ARAGÃO et al., 2018).

Tem sido demonstrado que o papilomavirus está relacionado a etiologia do sarcoide (KAREEM & SALMAN, 2019). Vários trabalhos utilizando técnicas moleculares identificaram os PVB tipos 1, 2 e 13 em lesões de sarcoide (ALCÂNTARA et al., 2015; KAREEM & SALMAN, 2019; OGLUSZKA et al., 2021). No Brasil foi identificado o BPV UEL-4, classificado como uma nova espécie de BPV, em sarcoide de um equino que tinha contato com bovinos que apresentavam papilomatose (ANJOS et al., 2010). Por esta razão, é necessário determinar quais fatores estão envolvidos na etiologia da enfermidade na região sul do Rio Grande do Sul, bem como estabelecer que tipos clínico-patológicos são mais prevalentes e que medidas podem ser tomadas para minimizar as perdas em decorrência desta enfermidade. Têm sido descritos seis tipos de sarcoide, os quais são classificados clinicamente em oculto, verrucoso, nodular, fibroblástico, misto e maligno tendo cada um deles características clínicas e histológicas que sugerem diferenças no comportamento biológico, epidemiologia e patogenia que podem ser avaliadas para a implementação de tratamentos, prevenção e controle desta enfermidade (GOMIERO et al., 2015).

Os objetivos desta dissertação foram estudar a epidemiologia e a distribuição das lesões de sarcoide equino recebidos no LRD/UFPel em um período de 20 anos, determinando os principais tipos clínico-patológicos que ocorrem na área de influência do laboratório, bem como determinar quais tipos de papilomavirus bovino estão envolvidos nas lesões.

2 Revisão da Literatura

O complexo do agronegócio equino no Brasil movimenta cerca de R\$ 7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. O equino ao longo dos anos já desempenhou, funções de sela, carga e tração, a partir da segunda metade do século XX, destaca-se no aspecto social, nas atividades de esportes e lazer, assim como na equoterapia para tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócio afetiva (LIMA et al., 2006). Destacam-se, também, no agronegócio do equino os vários fornecedores de insumos, produtos e serviços, como: medicamentos, rações, acessórios, atendimento veterinário, treinadores, transporte de animais e ensino e pesquisa. No segmento de equinos utilizados em atividades esportivas os valores movimentados giram em torno de R\$ 705 milhões e empregam cerca de 20.500 pessoas, com a participação estimada de 50 mil atletas (LIMA et al., 2006; ALMEIDA & SILVA, 2010).

Neste contexto, o diagnóstico das diferentes enfermidades que afetam esta espécie animal tem papel fundamental para reduzir perdas, tanto no âmbito das criações de equinos com aptidão para o trabalho no campo, como para aqueles criados para lazer, esporte e outras atividades. No Rio Grande do Sul, dentre estas enfermidades diagnosticadas em equinos as dermatopatias estão entre as principais e dentre estas as neoplasias (SOUZA et al., 2011; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014; ASSIS-BRASIL et al., 2015; BIANCHI et al., 2016). As principais neoplasias cutâneas diagnosticadas em equinos são, sarcoide, carcinoma de células escamosas (CCE), melanoma e o linfoma cutâneo (BOGAERT et al., 2005; BRUM et al., 2010; MAULDIN & PETERS-KENNEDY, 2016).

2.1. Definição

O sarcoide equino é uma neoplasia cutânea localmente invasiva que não metastatiza e, às vezes, estende-se para as regiões mais profundas do tecido subcutâneo e para os músculos adjacentes. Sarcoides são considerados tumores bifásicos, uma vez que se derivam da proliferação de dois componentes: os fibroblastos dérmicos e os queratinócitos epidérmicos (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020).

Na maioria dos casos, os sarcoides raramente regridem espontaneamente. Possuem diferentes apresentações clínicas e o diagnóstico precoce pode melhorar o prognóstico, mas sua importância é frequentemente subestimada (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020).

O sarcoide é a principal neoplasia que acomete a pele dos equídeos em todo o mundo e caracteriza-se por lesões únicas ou múltiplas (ABREU et al., 2018; GAYNOR et al., 2015). As lesões são com maior frequência múltiplas, podendo surgir repentinamente e perdurar por longos períodos. Este tumor foi descrito em 1936 na África do Sul como uma condição fibroblástica e um componente epitelial variável com recorrência frequente (GOMIERO et al., 2015).

2.2. Epidemiologia e aspectos clínicos

Esta neoplasia normalmente ocorre em locais anatômicos mais suscetíveis a traumas recorrentes e de difícil cicatrização, como: membros, cabeça, região periorbital, região ventral do abdômen, base da orelha, região axilar e inguinal (LUNARDI et al., 2013; ABREU et al., 2018; KNOTTENBELT, 2019). Não há predileção por sexo ou por raça e a faixa etária mais acometida é entre dois e nove anos de idade (KNOTTENBELT, 2019), sendo mencionado, também, a faixa etária entre três e seis anos (SEMIK-GURGUL, 2020) e, ainda, entre três e sete anos (GOMIERO et al., 2015).

Os sinais clínicos são inespecíficos e normalmente estão associados com a localização dos tumores. O diagnóstico é baseado na história clínica, epidemiologia, características macroscópicas e histológicas das lesões. Para caracterizar e determinar a presença de agentes infecciosos como os BPVs, é necessário auxílio de técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar o DNA e proteínas específicas destes agentes nas lesões (SOUZA et al., 2011; ALCÂNTARA et al., 2015).

A ocorrência de sarcoide no Rio Grande do Sul é mais frequente em equinos da raça Crioula, provavelmente porque esta raça é a mais criada no Estado e, também, a mais utilizada nas atividades do campo em manejo de bovinos e isso resulta numa maior exposição dos equinos ao agente (BIANCHI et al., 2016). Por outro lado, casos em outras raças de equinos como PSI e Quarto de Milha além de animais sem raça definida são, também, afetados (ASSIS-BRASIL et al., 2015). Tem sido mencionado que diferentes linhagens genéticas têm predisposição para a ocorrência

do sarcoide, mas os indivíduos dentro dessas linhagens podem não sofrer a doença, enquanto outros podem ser gravemente afetados (MARTI et al., 1993; KNOTTENBELT, 2005). Um gene autossômico recessivo foi sugerido como responsável por conferir uma suscetibilidade para a condição provavelmente influenciando na gravidade e recorrência do transtorno em um indivíduo (KNOTTENBELT, 2005). Evidência adicional de um componente genético na etiopatogenia do sarcoide foi observada em um trabalho de análise genética de todo o genoma equino e regiões cromossômicas sendo identificados genes que poderiam estar associados a um aumento da suscetibilidade ao sarcoide equino (JANDOVA et al., 2012). Mais recentemente, um modo poligênico de herança genética para o sarcoide equino foi, também, hipotetizado (JANDOVA et al., 2012).

2.3. Patologia

Na literatura são descritos seis tipos clínico-patológicos de sarcoide equino, fibroblástico, verrucoso, misto, nodular, oculto e maligno, alguns deles com alguns subtipos como o nodular tipo A e tipo B, e o fibroblástico tipo 1 e tipo 2 (KNOTTENBELT, 2019; FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020). Na Tabela 1 estão descritos os tipos de sarcoide com suas características macroscópicas.

O aspecto histológico do sarcoide é heterogêneo com variação no número de componentes de acordo com o tipo clínico. As características microscópicas da epiderme podem incluir hiperqueratose ortoqueratótica ou paraqueratótica, hiperplasia irregular da epiderme com proliferações epiteliais produzindo ramos longos e pontiagudos, denominados *rete pegs* ou *rete ridges*, estendendo-se profundamente na proliferação dérmica (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020). A proliferação dérmica é constituída por grande quantidade de células fusiformes arranjadas em forma de ninhos ou feixes que se projetam em diferentes direções. Além disso, os tipos verrucoso e fibroblástico apresentam hiperplasia epidérmica caracterizada por projeções exofíticas com hiperplasia papilar e acentuada hiperqueratose. O tipo fibroblástico apresenta, muitas vezes, úlceras que se intercalam com áreas de hiperplasia epidérmica (BRUM et al., 2010; PINHEIRO et al., 2015; ABREU et al., 2018).

2.4. Patogenia

A patogenia do sarcoide equino não está, ainda, bem determinada, mas sabe-se que existe relação com a infecção pelos papilomavírus bovinos (BPVs) 1, 2 e 13, os quais foram identificados, muitas vezes, nas lesões de sarcoide (LUNARDI et al., 2013; BOGAERT et al., 2015; KAREEM & SALMAM, 2019). A transmissão do vírus para a pele ocorre por meio de fômites, fricção e picada de insetos. O DNA do BPV-1 foi detectado em uma série de insetos picadores e não picadores (*Musca autumnalis*, *Fannia carnicularis*, e *Stomoxys calcitrans*) (BERGVALL, 2013).

Em diferentes estudos foi identificado o DNA episomal do BPV no núcleo de fibroblastos neoplásicos, entretanto, alguns autores mencionam que o DNA viral foi isolado na porção epitelial do tumor. BPVs foram identificados, também, no carcinoma de células escamosas (CCE), comum na espécie equina, bem como na pele de equinos saudáveis, indicando que não estão envolvidos na fase inicial do sarcoide e sim no agravamento e disseminação da neoplasia no corpo do animal (BOGAERT et al., 2008; KAINZBAUER et al., 2012). Em alguns casos foram identificados em um mesmo animal com diversas lesões de sarcoide os três tipos de BPVs. Estudos moleculares demonstraram que o mais frequente é o BPV 1 (ALCÂNTARA et al., 2015; KAREEM & SALMAM, 2019).

Os BPVs, atuam por meio da ativação biológica do oncogêne E5, que é um dos principais oncopeptídeos que atuam na transformação das células normais do hospedeiro em células neoplásicas. Este oncogêne forma um complexo juntamente com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- β) e este complexo atua nos fibroblastos da pele, interferindo na mitogênese celular, o que contribui para a proliferação das células neoplásicas (ALCÂNTARA et al., 2015; SEMIK-GURGUL, 2020). O E5 ativado pelo BPV atua, também, no complexo principal de histocompatibilidade (MHC-1) facilitando a evasão do sistema imunológico, permitindo assim que as células infectadas evitem a imunovigilância do hospedeiro, levando a transformação celular e proliferação tecidual, dando origem ao neoplasma (SEMIK-GURGUL, 2020).

Diversos trabalhos em todo o mundo estão buscando entender melhor a relação do sarcoide com os BPVs, associando diversas técnicas e métodos diagnósticos já existentes, como: imuno-histoquímica (IHQ), reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização cromogênica in situ (CISH) e metilação do DNA viral. Estas técnicas podem auxiliar no diagnóstico precoce desta doença, visando a mínima

manipulação e invasão do animal. Está comprovado que quando manipulado o sarcoide na maioria das vezes tende a aumentar rapidamente de tamanho e em número de tumores. Além disso, estas técnicas auxiliam na determinação do grau de malignidade, invasividade, estágio de desenvolvimento da célula tumoral e quantidade de DNA presente (ALCÂNTARA et al., 2015; SEMIK- GURGUL, 2020; TURA et al., 2021).

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico de sarcoide equino pode ser relativamente simples, realizado pelas lesões macroscópicas (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020), especialmente quando é múltiplo e diferentes tipos são observados no mesmo equino (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020; SEMIK-GURGUL, 2020). A biopsia e a análise histopatológica são importantes para a confirmação (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020), no entanto, deve considerar-se que biopsias muito pequenas podem não ser representativas e induzir ao diagnóstico equivocado (SEMIK-GURGUL, 2020). Em um trabalho utilizando vários marcadores imunohistoquímicos a marcação positiva pela α -proteína associada a fibroblastos (FAP- α) foi observada em fibroblastos neoplásicos de todos os sarcoides analisados, sugerindo este marcador como um candidato potencial para o diagnóstico imunohistoquímico de sarcoides (TURA et al., 2021). Por outro lado, o mesmo autor esclarece que não há um marcador imunohistoquímico específico, embora, a presença combinada de DNA do BPV e S100 negativo sejam consideradas as principais características diagnósticas (TURA et al., 2021).

A presença na análise histológica de hiperplasia epidérmica e arranjo em paliçada de fibroblastos são tipicamente considerados patognomônicos para o diagnóstico histopatológico de sarcoide, no entanto, podem estar ausentes devido à ulceração da camada superficial da epiderme (TURA et al., 2021).

2.6. Diagnóstico diferencial

Sarcoide deve ser diferenciado de algumas enfermidades de pele que ocorrem em equinos e que macroscopicamente podem ser confundidas como carcinoma celular escamoso, tecido de granulação, habronemose, pitiose e papilomatose (BRUM et al., 2010), fibromas ou fibrossarcomas (TURA et al., 2021). É importante enfatizar que, devido às características microscópicas variáveis dos sarcoides equinos, pequenas biópsias podem não fornecer tecido suficiente para diferenciar os sarcoides,

principalmente quando as biopsias são obtidas de áreas ulceradas (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020). Nestes casos a imuno-histoquímica e a PCR são importantes para o diagnóstico diferencial (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020). A técnica de IHQ utilizando S-100 e α -actina do músculo liso (α -SMA) permitem o diagnóstico diferencial de schwannomas, e outros tumores da bainha de nervos (TURA et al., 2021).

2. 7.Tratamento

São conhecidos diversos tratamentos para o manejo de sarcoides equinos e estudos retrospectivos dão conta de terapias aparentemente eficazes, mas faltam estudos prospectivos na literatura para a confirmação de sua eficiência. As várias opções de tratamento disponíveis podem apresentar variabilidade na resposta do paciente (FUNICIELLO & ROCCABIANCA, 2020). Dentre as terapias mais utilizadas existe a cirurgia, a quimioterapia, a imunoterapia, a genoterapia, a radioterapia e a fitoterapia fotodinâmica (KNOTTENBELT, 2019).

Antes da escolha de uma determinada terapia algumas considerações devem ser feitas, ou seja, equinos com sarcoide nunca serão considerados livres da doença; cada lesão pode exigir um tratamento específico e pode reagir de maneira diferente em comparação com outros sarcoides, mesmo no mesmo equino; a extensão e a localização do tumor afetam muito o processo de escolha do tratamento; o planejamento de tratamentos combinados, prolongados ou repetidos pode ser necessário para muitos sarcoides; o tempo de evolução da lesão é, também, importante, porque o tratamento precoce geralmente é menos agressivo, além disso, é mais fácil tratar lesões pequenas do que lesões extensas, que também podem estar em transformação de um tipo para o outro de sarcoide (KNOTTENBELT, 2019).

As vacinas autólogas são também utilizadas no tratamento de sarcoide com relativo sucesso (BENJAMIM & DIPLOMATE, 2008). Em um trabalho os autores utilizaram esta técnica e observaram que houve regressão no número e no tamanho da lesão em 75% e 93,8% dos casos respectivamente (ROTHACKER et al., 2015). Por outro lado, em um trabalho de acompanhamento do curso clínico de sarcoides em equinos da raça Franches-Montagne foi observado que 38 (62%) dos 61 equinos que participaram do estudo e apresentavam a doença aos três anos de idade, ficaram livres da mesma entre 5 e 7 anos depois, e que em 29 destes 61 equinos (48%) a cura foi espontânea não havendo necessidade de tratamento (BERRUEX et al., 2016).

Tabela 1. Aspecto macroscópico dos diferentes tipos de sarcoide.

Tipo de sarcoide	Descrição
Fibroblástico	-Tem aparência fibrovascular, semelhante ao tecido de granulação, com massas ulceradas, pedunculadas e extensas. Exsudato é frequentemente observado e tem predisposição a evoluir para uma forma mais severa naqueles locais que apresentam cicatrização pouco satisfatória.
Verrucoso	-Tem aparência de verruga com graus variáveis de descamação e distribuição, em áreas limitadas ou amplas do corpo. Apresenta-se como áreas de alopecia, com aspecto áspero, superfície elevada e irregular
Misto	-É relativamente comum e apresenta lesões que possuem características pertencentes a dois ou mais tipos de sarcoide.
Nodular	-Caracteriza-se por lesões facilmente reconhecíveis, firmes e bem delimitadas no tecido subcutâneo como nódulos esféricos de tamanhos e números bem variáveis.
Oculto	-É caracterizado por áreas focais e circulares com alopecia, descamação, espessamento da pele, hiperqueratose e hiperpigmentação. Usualmente contém um ou mais nódulos cutâneos de 2–5 mm de diâmetro ou áreas com uma pequena mudança na pele.
Maligno	-É bem agressivo, localmente invasivo com infiltração de vasos linfáticos, resultando em múltiplos cordões de massas tumorais que se estendem amplamente na pele e tecido subcutâneo adjacente.

Adaptado de GOMIERO et al. 2015

3 Artigos

Artigo

Sarcoide equino na região Sul do Rio Grande do Sul: casuística de 20 anos

Fabiano da Rosa Venancio, Taina dos Santos Alberti, Lorena Alvariza Amaral, Rosimeri Zamboni, Haide Valeska Scheid, Leonardo Clasen Ribeiro, Marcelo de Lima & Ana Lucia Schild

Submetido à revista Research Society and Development

Sarcoide equino na região Sul do Rio Grande do Sul: casuística de 20 anos

Equine sarcoid in the southern region of Rio Grande do Sul: 20-year casuistry

Sarcoide equino en la región sur de Rio Grande do Sul: casuística de 20 años

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram estudar a epidemiologia e a distribuição das lesões de sarcoide equino diagnosticado no Laboratório Regional de Diagnóstico da UFPel (LRD/UFPel) em um período de 20 anos, bem como determinar os principais tipos e, por meio da PCR, identificar o papilomavirus bovino (BPV) envolvido nas lesões. Os casos recebidos entre 2000 e 2020 foram resgatados dos protocolos de necropsia do laboratório. Os blocos parafinados de cada caso foram cortados em secções de 3-5µm, corados por hematoxilina e eosina (HE) e reavaliados em microscópio ótico. As amostras encaminhadas ao laboratório em 2021 foram fixadas em formalina 10% para histopatologia e imuno-histoquímica e parte, foi congelada e encaminhada ao Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel (LabVir/UFPel) para realização da PCR. No período foram diagnosticados 258 casos, dos quais 75,96% na raça Crioula, principalmente em equinos de dois a cinco anos (42,64%). As características macroscópicas associadas à histopatologia permitiram determinar o tipo de sarcoide em cada caso. Em 46,8% dos casos os sarcoides eram fibroblásticos. Dos 258 casos 61% eram únicos, observados principalmente nos membros e 32% eram múltiplos, presentes com mais frequência do tronco. O genoma dos BPVs não foi detectado pela PCR e a IHQ foi negativa para proteína S-100 e positiva para vimentina permitindo o diagnóstico diferencial de outras neoplasias cutâneas dos equinos. O registro de 258 casos de sarcoide em 20 anos permitiu estabelecer a sua epidemiologia na região Sul do Rio Grande do Sul e alerta para a importância da doença na região.

Palavras-chave: Histopatologia, IHQ, Neoplasia cutânea, Papilomavírus bovino, PCR, Sarcoide equino.

Abstract

The objectives of this work were to study the epidemiology and distribution of equine sarcoid lesions diagnosed at the Regional Diagnostic Laboratory of UFPel (LRD/UFPel) over a period of 20 years, as well as to determine the main types and, through PCR, to identify the bovine papillomavirus (BPV) involved in the lesions. Cases received between 2000 and 2020 were retrieved from the laboratory's necropsy protocols. The paraffin blocks of each case were cut into 3-5µm sections, stained with hematoxylin and eosin (HE) and reassessed under an optical microscope. The samples sent to the laboratory in 2021 were fixed in 10% formalin for histopathology and immunohistochemistry and part was frozen and sent to the Laboratory of Virology and Immunology at UFPel (LabVir/UFPel) for PCR. In the period, 258 cases were diagnosed, of which 75.96% in the Crioula breed, mainly in horses aged two to five years (42.64%). The macroscopic characteristics associated with the histopathology made it possible to determine the type of sarcoid in each case. In 46.8% of the cases, the sarcoids were fibroblastic. Of the 258 cases, 61% were single, mainly observed in the limbs, and 32% were multiple, most often present in the trunk. The BPV genome was not detected by PCR and the IHC was negative for protein S-100 and positive for vimentin, allowing the differential diagnosis of other equine cutaneous neoplasms. The record of 258 cases of sarcoid in 20 years allowed us to establish its epidemiology in the southern region of Rio Grande do Sul and alerts us to the importance of the disease in the region.

Keywords: Histopathology, IHC, Skin neoplasm, Bovine papillomavirus, PCR, Equine sarcoid.

Resumen

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la epidemiología y distribución de las lesiones de sarcoidosis equina diagnosticadas en el Laboratorio Regional de Diagnóstico de la UFPel (LRD/UFPel) en un período de 20 años, así como determinar los principales tipos y, mediante PCR, identificar el virus del papiloma bovino (BPV) implicado en las lesiones. Los casos recibidos entre 2000 y 2020 se recuperaron de los protocolos de necropsia del laboratorio. Los bloques de parafina de cada caso se cortaron

em seções de 3-5 µm, se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) y se reevaluaron al microscopio óptico. Las muestras enviadas al laboratorio en 2021 fueron fijadas en formol al 10% para histopatología e inmunohistoquímica y parte fue congelada y enviada al Laboratorio de Virología e Inmunología de la UFPel (LabVir/UFPel) para PCR. En el período fueron diagnosticados 258 casos, de los cuales el 75,96% en la raza Crioula, principalmente en equinos de dos a cinco años (42,64%). Las características macroscópicas asociadas a la histopatología permitieron determinar el tipo de sarcoide en cada caso. En el 46,8% de los casos las sarcoides eran fibroblásticas. De los 258 casos, el 61% fueron únicos, principalmente observados en las extremidades, y el 32% fueron múltiples, con mayor frecuencia presentes en el tronco. El genoma del BPV no fue detectado por PCR y la IHC fue negativa para proteína S-100 y positiva para vimentina, lo que permitió el diagnóstico diferencial de otras neoplasias cutáneas equinas. El registro de 258 casos de sarcoide en 20 años permitió establecer su epidemiología en la región sur de Rio Grande do Sul y alerta sobre la importancia de la enfermedad en la región.

Palabras clave: Histopatología, IHC, Neoplasia de piel, Virus del papiloma bovino, PCR, Sarcoide equino.

1. Introdução

O sarcoide equino é uma neoplasia cutânea localmente invasiva que não metastatiza e, às vezes, estende-se para as regiões mais profundas do subcutâneo e músculos adjacentes. Sarcoides são considerados tumores bifásicos, uma vez que se derivam da proliferação de dois componentes: os fibroblastos dérmicos e os queratinócitos epidérmicos (Funciello & Roccabianca, 2020). Sarcoide equino é a principal neoplasia que acomete a pele dos equídeos, apresentando-se como lesões únicas ou múltiplas com origem fibroblástica (Quinn, 2003; Gaynor et al., 2015; Abreu et al., 2018). Foi descrito pela primeira vez em 1936, tem uma distribuição mundial e pode afetar, também, outros equídeos, como burros, zebras e mulas, bem como outros mamíferos (Funciello & Roccabianca, 2020).

Este tumor caracteriza-se por intensa proliferação de fibroblastos arranjados em ninhos e feixes que se entrelaçam e assumem várias direções. As células neoplásicas são fusiformes ou estreladas com núcleos alongados, hiper cromáticos e com atipia. Figuras de mitose são raras e há discreta neovascularização (Quinn, 2003; Brum et al., 2010; Souza et al., 2011; Assis-Brasil et al., 2015).

Na literatura são descritos seis tipos clínico patológicos de sarcoide equino, sendo eles: oculto, verrucoso, nodular, fibroblástico, misto e maligno (Lunardi et al., 2013; Knottenbelt, 2019; Semik-Gurgul, 2020). A patogenia e epidemiologia desta neoplasia ainda não estão bem determinadas, porém, sabe-se que há relação direta com o papiloma vírus bovino (BPV) 1, 2, UEL-4 e mais recentemente com o BPV 13 o qual foi, também, identificado em lesões de sarcoide (Anjos et al., 2010; Knottenbelt, 2019; Szczerba-Turek et al., 2019; Semik-Gurgul, 2020). Em 2020, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) reorganizou a distribuição dos membros da família Papillomaviridae, agrupando os BPV-1, 2, 13 e 14 na mesma espécie, chamada de *Deltapapillomavirus 4* (ICTV, 2021).

Os BPVs, atuam por meio da ativação biológica do oncogêne E5, que é um dos principais oncopeptídeos que atuam na transformação das células normais do hospedeiro em células neoplásicas. Este oncogêne forma um complexo juntamente com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-β) e este complexo atua nos fibroblastos da pele, interferindo na mitogênese celular, o que contribui para a proliferação das células neoplásicas (Alcântara et al., 2015; Semik-Gurgul, 2020). O E5 atua, também, no complexo principal de histocompatibilidade (MHC-1) facilitando a evasão do sistema imunológico, permitindo assim que as células infectadas evitem a imunovigilância do hospedeiro, levando a transformação celular e proliferação tecidual, dando origem ao neoplasma (Semik-Gurgul, 2020).

O sarcoide equino ocorre em locais anatômicos mais suscetíveis a traumas recorrentes e de difícil cicatrização como: membros, cabeça, região periorbital, região ventral do abdômen, base da orelha, região axilar e inguinal. Além disso, sabe-se que não há predileção por sexo ou por raça, mas em algumas regiões ocorre com maior frequência em animais castrados e em raças mais prevalentes na região estudada. A faixa etária mais afetada é entre dois e nove anos (Knottenbelt, 2019), sendo

mencionada, também, a faixa etária entre três e seis anos (Semik-Gurgul, 2020) e, ainda, entre três e sete anos (Gomiero & Tostes, 2015).

Os sinais clínicos são inespecíficos e normalmente estão associados com a localização dos tumores. O diagnóstico é baseado na história clínica, epidemiologia, características macroscópicas e histológicas das lesões. Para caracterizar e determinar a presença de agentes infecciosos como os BPVs, é necessário auxílio de técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar o DNA e proteínas específicas destes agentes nas lesões.

Os objetivos deste trabalho foram estudar a epidemiologia e a distribuição das lesões de sarcoide equino recebidos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) em um período 20 anos, determinando os principais tipos histológicos que ocorrem nos equinos da região de influência do laboratório, complementar o diagnóstico empregando a IHQ, bem como identificar o papilomavirus envolvido nas lesões pela técnica de biologia molecular PCR.

2. Metodologia

Foram resgatados dos protocolos de necropsia no banco de dados do LRD/UFPel, os casos de sarcoide equino recebidos no período de 2000 a 2020. Foram coletadas informações referentes a localização do sarcoide, número de lesões em um mesmo equino e tipo clínico de sarcoide. Além disso, foram coletadas informações referentes a idade, a raça e ao sexo dos animais afetados. Os equinos foram classificados como potros (até 24 meses), adulto jovem (25 a 60 meses), adulto (61 meses a 10 anos) e idosos aqueles com mais de 10 anos. Em nenhum dos casos o diagnóstico atribuído pelo patologista que recebeu o material foi modificado.

Os blocos parafinados de cada um dos casos de sarcoide foram cortados em secções de 3-5µm de espessura, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente reavaliados em microscópio ótico. Foram avaliadas em cada tumor as características histológicas como: hiperqueratose, hiperplasia da epiderme, arranjo celular, ulceração e/ou crosta e infiltrado inflamatório. Esses achados associados as características macroscópicas permitiram determinar o tipo de sarcoide diagnosticado.

As amostras de sarcoides encaminhadas ao LRD/UFPel durante o ano 2021 (sete casos) foram divididas sendo uma parte mantida em congelamento e outra parte fixada em formalina 10% tamponada e processada rotineiramente para avaliação histológica. Os fragmentos congelados foram encaminhados ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPel), para identificar a presença de BPVs 1, 2, UEL-4 ou 13, através da técnica molecular de PCR. Em seis destes sete casos os tumores variavam de 2cm a 7,5cm de diâmetro e foram excisados completamente e a pele suturada, não ocorrendo recidiva em cinco deles até sete meses de acompanhamento. O sexto caso era um sarcoide recidivante. Não havia informações sobre o diâmetro e sobre a evolução do sétimo caso submetido a PCR.

Os sarcoides que foram submetidos a PCR para a detecção do BPV foram também selecionados para a realização da técnica de imuno-histoquímica, utilizado os anticorpos Vimentina para tecido mesenquimal e S100 para diferenciação de tumores de nervos e melanomas. Foram preparadas lâminas positivas (Dako, Flex, IHC Microscopic Slides) com cortes histológicos de 3µm, desparafinizadas e reidratadas em baterias de xilol e álcool. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi adicionado peróxido de hidrogênio 10%, diluído em metanol por 20 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada a recuperação antigênica por 40 minutos a 96°C (Dako Target Retrieval Solution Low pH). Foram adicionados os anticorpos primários nas diluições, S100P (ACI 3010 A, B 1:200), Vimentina (V9 1:200), ambos Biocare Medical. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 18 horas (overnight) a 4°C. Posteriormente foram incubadas com anticorpo secundário (gotas amarelas) e estreptavidina-peroxidase (gotas vermelhas) (Biocare Medical – kit MACH 4 Universal HPR-Polymer Detection System) por 20 minutos cada etapa, em seguida foi utilizado cromógeno para a revelação (3-amino-9-etilcarbazol AEC, K3469, DakoCytomation).

As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris (Procito), lavadas com água destilada e desidratadas em graduações crescentes de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan. Para o controle negativo foi utilizado PBS no lugar do anticorpo primário e como controle positivo foram utilizados fragmentos de intestino delgado. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e classificadas como positivas ou negativas.

2.1 Técnica de PCR

2.1.1 Extração de DNA

Foi preparada uma suspensão a partir da maceração de 100mg das amostras de tecidos em 1000 μ L de TE *buffer* (10 mM Tris-Hcl pH.8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0) adicionado a 100 μ L de SDS (10%) e 3 μ L de RNase (20 μ g/mL), sendo incubados por 30 minutos em banho-maria (37°C). Logo após, foram adicionados 100 μ L de Proteinase K (20 μ g/mL) e realizada a incubação desse material por 3 horas a 56°C ou até a total digestão do tecido. O DNA foi extraído em solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), com precipitação *overnight* a -20°C em etanol absoluto, ressuspendidos em água ultrapura e quantificados com *Qubit* (Invitrogen, Eugene, EUA) conforme recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo parte do gene L1 do BPV, utilizando o par de *primers* FAP59/FAP64 (Forsslund, 1999). As sequências dos *primers*, bem como o tamanho esperado do amplicon, podem ser visualizados na tabela 1. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 μ L, contendo uma unidade de *GoTaq® Colorless Master Mix* (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA), 3 μ L do DNA extraído e 0,4 μ M de cada *primer*. Uma amostra de tecido positiva para *Papillomavirus* bovino foi utilizada como controle da extração, enquanto DNA viral previamente extraído foi utilizado como controle positivo para a PCR. Ambos controles positivos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Dr Claudio Wageck Canal, UFRGS, RS. A amplificação foi realizada em termociclador nas condições 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C, 50°C e 72°C por 1min, com uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Brometo de Etídio (0,5mg/mL) e visualizados em transiluminador UV após a eletroforese (100V, 60min).

Tabela 1 - Sequência dos primers e tamanho esperado do amplicon da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
FAP59	5'TAACWGTIGGICAYCCWTATT3'	480
FAP64	5'CCWATATCWVHCATITCICCATC3'	

Fonte: Autores.

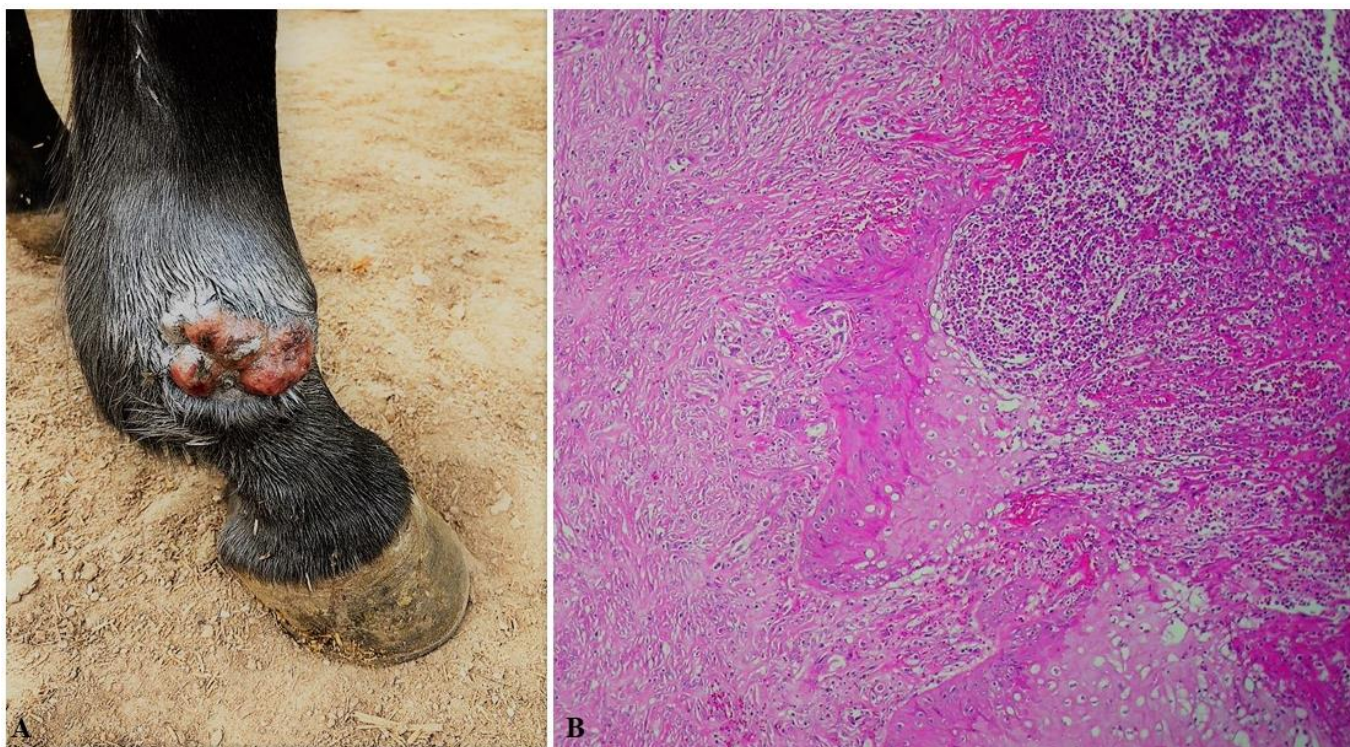
3. Resultados

3.1 Epidemiologia e patologia

No período estudado foram recebidos no LRD/UFPeL 2.331 materiais da espécie equina, dos quais 615 (26,38%), eram referentes a lesões que envolviam a pele desta espécie animal. Dos 615 materiais, 258 (41,95%) foram diagnosticados como sarcoide equino. Destes 258 casos 196 (75,96%) eram equinos da raça Crioula, 54 (20,93%) eram sem raça definida, 3 (1,17%) eram Quarto de Milha e 2 casos (0,77%) eram da raça PSI. Um caso de sarcoide (0,39%) foi diagnosticado na raça Percheron, um na raça Apaloosa e um na Árabe. Com relação ao sexo dos equinos afetados 140 (54,26%) ocorreram em fêmeas, 111 (43,02%) em machos e em 7 casos (2,72%) o sexo não estava informado no protocolo. Sarcoide afetou 17 potros (6,59%), 110 equinos adultos jovens (42,64%), 86 equinos adultos (33,33%), e 25 equinos idosos (9,69%). Em 20 casos (7,75%) não havia informação sobre a idade dos equinos afetados.

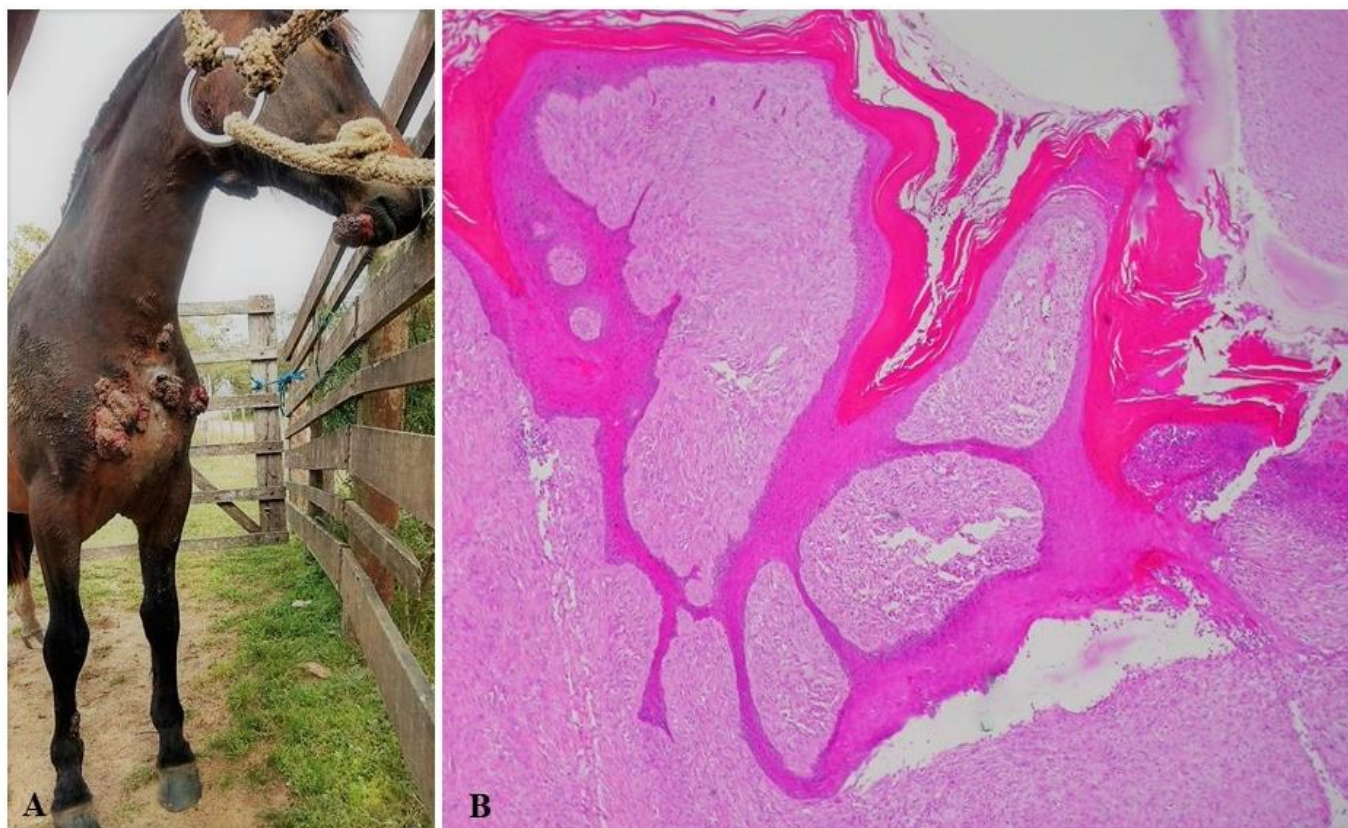
Dentre os 258 diagnósticos de sarcoide, foram localizados 231 blocos de parafina para a caracterização histológica. Com base no padrão macroscópico e histológico 108 (46,8%) eram do tipo fibroblástico (Figura 1A), 65 (28,1%) eram do tipo misto (Figura 2A e B), 46 (19,9%) do tipo verrucoso, 10 (4,3%) eram do tipo oculto e dois (0,9%) do tipo nodular. Dos 258 sarcoides diagnosticados 157 casos (61%) eram únicos e em 83 (32%) as lesões eram múltiplas. Em 18 casos (7%) não havia esta informação nos protocolos. O número de sarcoides de acordo com o tipo, considerando a característica único ou múltiplo é apresentado na Tabela 2.

Figura 1- 1A- Sarcoide tipo fibroblástico na porção distal do membro anterior direito de um equino. Observam-se áreas nodulares de alopecia e ulceração. 1B- Aspecto histológico do sarcoide fibroblástico. Observa-se área ulcerada à direita, hiperplasia do epitélio que se projeta para a derme onde há severa proliferação fibroblástica. [HE; obj.10x].



Fonte. Autores.

Figura 2- 2A- Sarcoide tipo misto na região demento e no peito e tecido proliferado de aspecto nodular e alopécico de um equino. Observam-se áreas nodulares com alopecia e ulceração. 2B- Aspecto histológico do sarcoide misto. Observa-se hiperplasia do epitélio (rete pegs) que se projeta para a derme formando ilhas de fibroblastos neoplásicos proliferados. [HE; obj.10x].



Fonte. Autores.

Tabela 2 - Número de cada tipo de sarcoide de acordo com a característica múltiplo ou único.

Característica	Tipo de sarcoide					Total
	Fibroblástico	Misto	Verrucoso	Nodular	Oculto	
Múltiplo	35	18	16	0	3	72
Único	67	40	27	2	7	143
NI	6	7	3			16

Fonte: Autores.

O maior número de sarcoides únicos foi encontrado nos membros, independentemente do tipo, enquanto que os tumores múltiplos foram observados preferentemente no tronco com lesões presentes também na cabeça e nos membros. O tipo nodular foi observado somente na apresentação única, um em membro e o outro na cabeça.

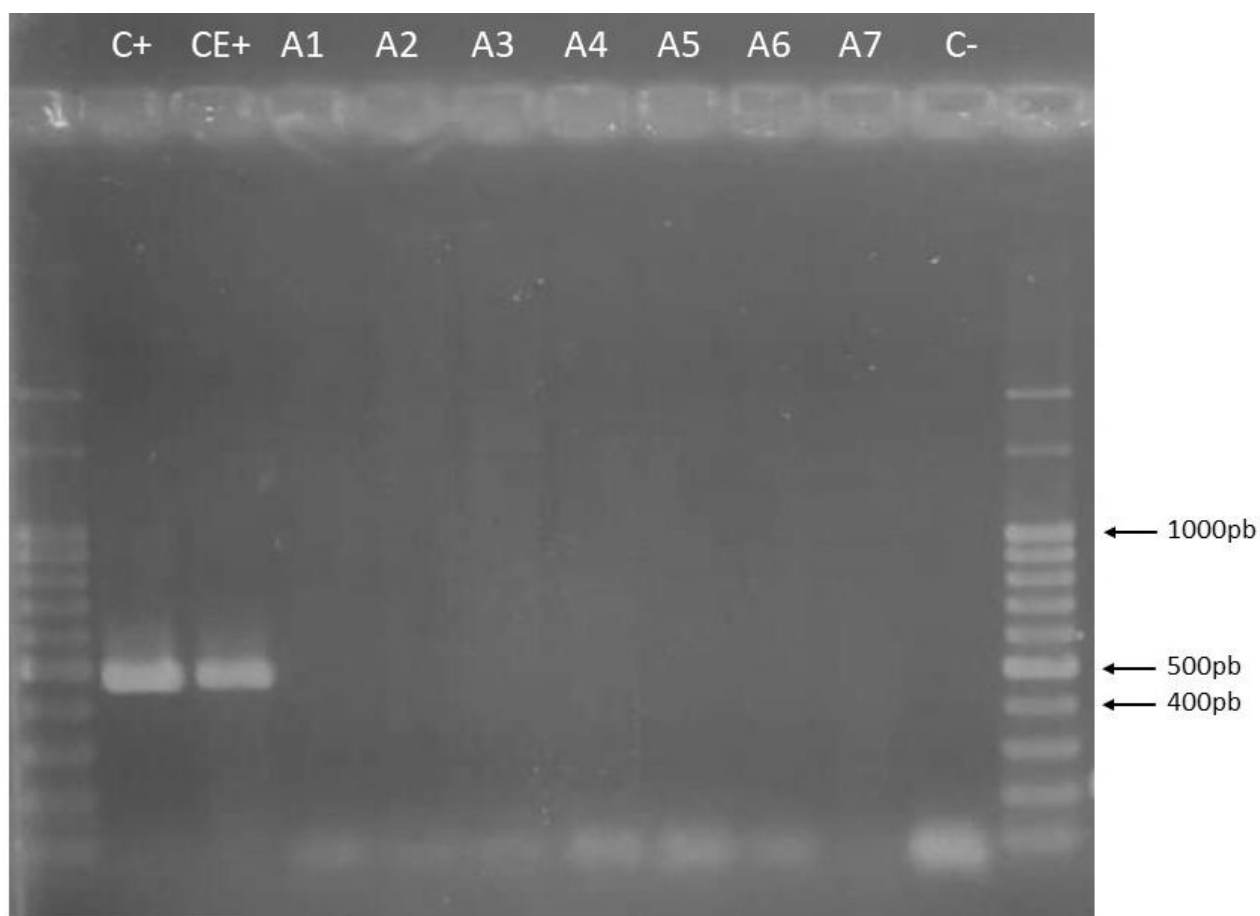
Em 76 casos de sarcoide único a evolução do tumor estava disponível no protocolo e foi variável de um a três meses em 45 casos. Nos demais casos houve variação observando-se 13 casos com evolução de quatro a seis meses. Em 18 casos a evolução foi acima de sete meses. A evolução dos sarcoides múltiplos foi resgatada em 23 protocolos, no entanto este dado refere-se apenas ao tumor encaminhado ao laboratório. Em 10 casos a evolução variou de um a três meses, em cinco casos variou de quatro a seis meses e em oito casos foi acima de sete meses.

Nos sete casos de sarcoides recebidos durante o ano 2021, que foram submetidos a PCR, os equinos foram acompanhados após a excisão cirúrgica da lesão por um período de sete meses e não houve recidivas em nenhum dos animais. Nestes casos os tumores mediam de 2,0cm a 7,5cm de acordo com o veterinário remetente. Nos demais casos não foi possível obter esta informação.

3.2. Extração do DNA e Imuno-histoquímica

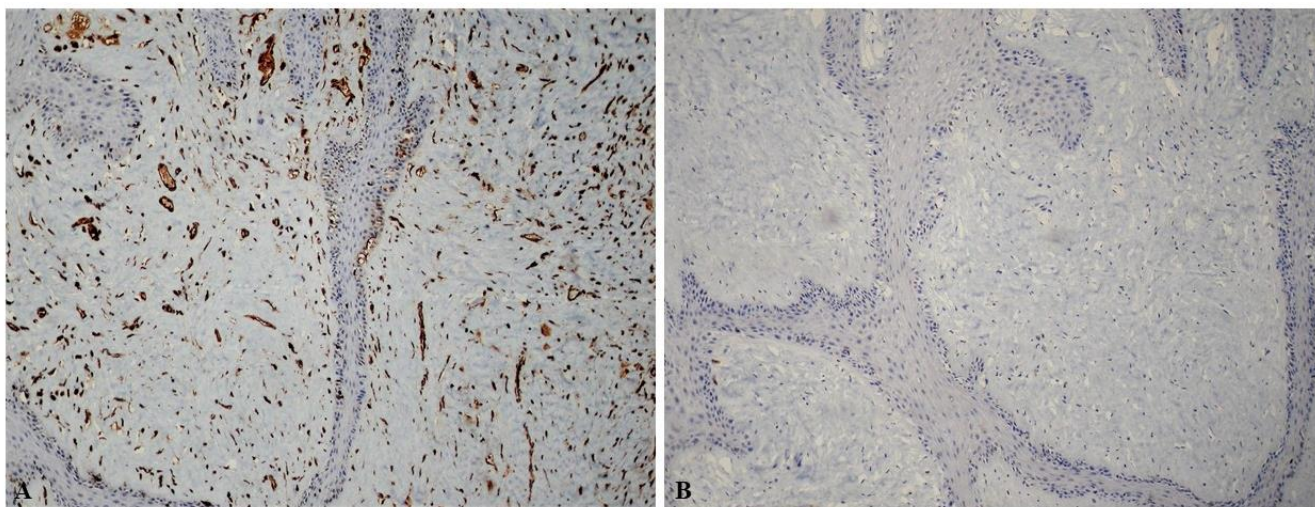
Nas amostras de tecido analisadas, não foi detectada amplificação do BPV pela PCR utilizando os *primers* degenerados FAP59/64 que possuem como alvo regiões relativamente conservadas do gene L1 (Figura 3). A imunohistoquímica foi positiva para vimentina (Figura 4A), e negativa para proteína S-100 (Figura 4B).

Figura 3 - Gel de Eletroforese. C+ Controle positivo; CE+ Controle positivo da extração; A1-A7; Amostras 1 até 7 e C- Controle negativo.



Fonte. Autores.

Figura 4- 4A- Imunohistoquímica de sarcoide tipo verrucoso apresentado reação positiva para vimentina (V9 1:200 Biocare Medical) [IHQ; obj. 10x]. 4B- Imunohistoquímica negativa para S100P ACI 3010 A, B 1:200 Biocare Medical). [IHQ; obj. 10x].



Fonte. Autores.

4. Discussão

O presente estudo revelou que sarcoide equino na Região Sul do Rio Grande do Sul representou mais de 40% das enfermidades tegumentares desta espécie animal em um período de 20 anos, sendo considerado como a mais importante dentre as doenças de pele dos equinos, do mesmo modo que é mencionado em outros trabalhos de estudos retrospectivos (Ramos et al., 2008; Marcolongo-Pereira et al., 2014; Assis-Brasil et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Bianchi et al., 2016). Percentuais de 32,9% e 33,5% de casos de sarcoide foram encontrados entre todas as doenças de pele diagnosticadas em dois estudos em diferentes regiões do Estado (Assis-Brasil et al., 2015; Bianchi et al., 2016). Dentre os tumores cutâneos este percentual chegou a 57,4% em um período de 11 anos (Silva et al., 2010).

Foi demonstrado que a raça Crioula é a mais frequentemente afetada, sendo encontrados percentuais de 77,5% dos casos (Brum et al., 2010) e 52% dos casos (Bianchi et al., 2016) nesta raça em trabalhos desenvolvidos no Rio Grande do Sul. No presente estudo foi encontrado um percentual de 75,9%, semelhante aos percentuais já descritos. Isso certamente deve-se ao fato de que esta é a raça de equinos mais criada no Estado. Nos Estados Unidos a raça mais frequentemente afetada foi a Quarto de Milha em um estudo retrospectivo de 12 anos (Angelos et al., 1988), embora com um total de materiais de equinos recebidos no Hospital ligeiramente inferior ao da raça Thoroughbred e o maior número de casos na raça Quarto de Milha foi atribuído à maior susceptibilidade genética nesta raça. No presente trabalho o número de materiais de equinos ou biopsias de tumores de equinos da raça Crioula é muito superior às demais raças e aos animais sem raça definida e, portanto, não é possível atribuir a maior frequência de sarcoide nestes animais à fatores genéticos.

O percentual de fêmeas afetadas foi ligeiramente superior ao de machos, demonstrando que o sexo aparentemente não interfere na ocorrência do sarcoide, conforme tem sido observado por outros autores (Brum et al., 2010; Bianchi et al., 2016). No presente trabalho equinos adultos jovens foram os mais afetados com quase metade dos casos, seguidos pelos equinos adultos. Na região central do Estado foi encontrado um percentual de 73% para equinos de um a cinco anos (Brum et al., 2010). Essas diferenças podem estar relacionadas ao número de equinos avaliados que no presente trabalho foi superior.

No presente trabalho observou-se que o maior número de casos era proveniente dos municípios de Pelotas e Capão do Leão, que são os municípios mais próximos ao Laboratório e por outro lado, municípios com maior número de equinos como Bagé e D. Pedrito (IBGE, 2017) tem um menor percentual na casuística do sarcoide. Uma razão para esse menor número de

casos ocorre, provavelmente, porque estes municípios estão localizados a maior distância, o que certamente dificulta a remessa de material para diagnóstico. Estes municípios tradicionalmente têm grandes criações de gado cujo manejo é feito por equinos utilizados para o trabalho, sendo de esperar-se que o número de casos de sarcoide fosse maior devido ao fator de risco pelo contato entre estas espécies. Nesta região existem, também, haras de criação de equinos PSI porém a doença foi observada somente em dois equinos desta raça em todo o período do estudo, demonstrando que o controle sanitário nestas propriedades é eficiente para evitar a disseminação do vírus. Por outro lado, são mencionados outros fatores de risco como a predisposição genética que parece ser importante para o desenvolvimento e gravidade das lesões de sarcoide (Knottenbelt, 2005; Bergvall, 2013). Foi demonstrado, também, que mesmo sem contato com bovinos o risco de um equino saudável adquirir a infecção pelo BPV de outro equino com sarcoide é o mesmo que se tiver contato com bovinos com papilomatose (Bogaert et al., 2008).

Embora a maioria dos relatos mencione a maior prevalência de tumores múltiplos (Brum et al., 2010; Bianchi et al., 2016), no presente trabalho foi observado que 61% dos diagnósticos foram de sarcoides únicos. Em um estudo no Nordeste os sarcoides únicos representaram 87,2% dos casos (Pessoa et al., 2014).

Observou-se uma tendência de evolução dos sarcoides tanto únicos como múltiplos entre um e três meses. Esse dado, no entanto, deve ser avaliado com cuidado, uma vez que não estava presente em todos os protocolos. Além disso, outros fatores podem interferir na evolução desses tumores. Em um estudo da evolução da doença em equinos da raça Franches Montagnes foi observado que o curso do sarcoide é notoriamente imprevisível e aparentemente independe da localização da lesão, tipo de lesão, idade e fatores ambientais (Berruex et al., 2016).

É mencionado que a recidiva de sarcoide é frequente e pode ocorrer em poucos dias, semanas, meses ou anos (Funicello & Roccabianca, 2020), no entanto os autores salientam que essas recidivas podem ser decorrentes da disseminação do tumor durante a cirurgia ou pela incompleta remoção da lesão. A indicação de tratamento cirúrgico somente em casos de tumores pequenos pode ser eficiente para evitar essas recidivas e melhorar o prognóstico de evolução do tumor. Neste trabalho em seis casos recebidos no ano 2021, em que os equinos foram tratados cirurgicamente não houve recidiva em sete meses de acompanhamento dos animais, sugerindo que a retirada completa dos tumores de até 7,5 cm no máximo pode ser eficiente para evitar as recidivas.

No presente trabalho ficou evidenciado que o tipo mais frequente de sarcoide observado na região foi o fibroblástico. Este é, também, o tipo mais frequentemente descrito em diversos relatos sobre a doença (Brum et al., 2010; Gomiero & Tostes, 2015; Berruex et al., 2016; Bianchi et al., 2016). Com relação aos demais tipos de sarcoide foi observado que o misto foi o segundo mais frequente seguido pelos tipos verrucoso e nodular. Isso foi observado, também, em um trabalho sobre sarcoide realizado na região central do Estado (Brum et al., 2010). Por outro lado, em um estudo no Paraná o segundo tipo mais frequente foi o verrucoso seguido pelo nodular (Gomiero & Tostes, 2015). Deve-se levar em conta que o número de casos de sarcoide estudado no Paraná foi bem menor (30 casos) do que o do presente relato, o que poderia influenciar nessa diferença de ocorrência.

A maioria dos sarcoide afetou os membros (37,2%) principalmente os posteriores, o que tem sido observado, também, por outros autores (Pessoa et al., 2014; Aragão et al., 2018). A maioria dos sarcoides múltiplos estava localizada no tronco e a maioria dos tumores únicos foi observada nos membros. Na região central do Estado a maioria dos tumores nos membros era múltipla (Brum et al., 2010). Não há uma explicação para essas variações de localização e multiplicidade dos tumores, sugerindo-se que não há relação direta entre estas duas características do sarcoide.

A imuno-histoquímica dos sete casos, negativa para a proteína S-100 e positiva para vimentina, permitiu diferenciar estes casos de melanoma e tumores da bainha de mielina respectivamente.

Apesar de diversos estudos demonstrarem a presença do vírus relacionada ao desenvolvimento das lesões (Lunardi et al., 2013; Alcântara et al., 2015), alguns autores defendem que a infecção pelo papilomavírus bovino seja não produtiva em equinos, devido ao fato de que o percentual de mRNAs de genes tardios representam menos que 0,3% dos BPV RNAs transcritos (Wilson et al., 2013). Em um estudo conduzido por Tura et al. (2021) não foi detectado a presença de DNA viral em células da epiderme

e da derme adjacentes as células neoplásicas positivas para BPV em sarcoides. Variações quanto ao tipo celular e tecidual com a presença de material genético viral, além da marcante diversidade genética dos BPVs também devem ser consideradas.

Trabalho utilizando outras tecnologias, como a amplificação por RCA (replicação por círculo rolante) e sequenciamento de alto rendimento (HTS) em amostras de papilomas de tetos bovinos permitiram a identificação de 11 BPVs conhecidos e 14 BPVs não descritos na literatura (Sauthier et al. 2021). Estes resultados demonstram que as técnicas convencionais de diagnóstico podem estar subestimando a diversidade genética desta família viral. No presente estudo, foram utilizados os primers degenerados FAP59/64, (amplamente utilizados na literatura científica), porém com limitações inerentes devido a diversidade genética dos BPV. A amplificação por RCA e sequenciamento de nova geração (NGS) nas amostras deste estudo poderiam, eventualmente, revelar a presença de DNA viral de outros tipos de BPV associados aos sarcoides.

4. Conclusão

O registro de 258 casos de sarcóide equino em um período de 20 anos permitiu estabelecer a epidemiologia dessa enfermidade na região Sul do Rio Grande do Sul. É a mais importante neoplasia da pele dos equinos afetando principalmente animais de dois a cinco anos, da raça Crioula, tanto machos como fêmeas, com lesões únicas distribuídas principalmente nos membros e lesões múltiplas, em menor número, observadas principalmente no tronco. A forma fibroblástica é a mais frequente seguida pelas formas mista, verrucosa, oculta e nodular. Concluiu-se também que em tumores de até 7,5cm a excisão cirúrgica completa pode ser eficiente para não haver recidiva em pelo menos sete meses.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código financeiro 001) pelo apoio científico, financeiro e bolsa de estudos. Agradecem, também, ao Prof. Dr. Claudio Wageck Canal do Depto. de Veterinária Preventiva e Patologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo controle positivo do DNA do papilomavírus.

Referências

Abreu, D.B., Cunha, M.E.N., Silva, E.N., Menezes, R.V., Ferreira, M.M., Araújo, A.L. & Ayres, M.C.C. (2018). Sarcóide recidivante em glande de um equino: Relato de caso. *Pubvet*, 12(2):1-7.

Alcântara, B.K., Alfieri, A.A., Headley, S.A., Rodrigues, W.B., Otonel, R.A.A., Lunardi, M. & Alfieri, A.F. (2015). Molecular characterization of bovine Deltapapillomavirus (BPV1, 2, and 13) DNA in equine sarcoids. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(4):431-436.

Angelos, J., Oppenheim, Y., Rebhun, W., Mohammed, H. & Antczak, D.F. (1988). Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Animal Genetics*, 19: 411-425.

Anjos, B.L., Silva, M.S., Diefenbach, A., Brito, M.F., Seppa, G.S. & Brum, M.C.S. (2010). Sarcóide equino associado ao papilomavírus bovino BR-Uel-4. *Ciência Rural*, 40(6): 1456-1459.

Aragão, A.T.I., Raiter, J., Machado, L.F.S., Oliveira, J.E.B.G., Gneiding, B. & Lucio, J. (2018). Dermatopathies in horses in the state of Santa Catarina. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 16(2):162003.

- Assis-Brasil, N.D., Marcolongo-Pereira, C., Stigger, A.L., Fiss, L., Santos, B.L., Coelho, A.C.B., Sallis, E.S.V., Fernandes, C.G. & Schild, A.L. (2015). Equine dermatopathies in southern Brazil: a study of 710 cases. *Ciência Rural*, 45(3): 519-524.
- Bergvall, K.E. (2013). Sarcoids. *Veterinary Clinics Equine*. 29. 657–671.
- Berruex, F., Gerber, V., Wohlfender, F.D., Burger, D. & Koch, C. (2016). Clinical course of sarcoids in 61 Franches-Montagnes horses over a 5 to 7 year period. *Veterinary Quarterly*. 36(4):189-196.
- Bianchi, M.V., Boos, G.S., Mello, L.S., Vargas, T.P., Sonne, L., Driemeier, D. & Pavarini, S.P. (2016). A Retrospective Evaluation of Equine Cutaneous Lesions Diagnosed in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44:1388.
- Bogaert, L., Martens, A., Poucke, M.V., Ducatelle, R., Cock, H.D., Dewulf, J., Baere, C.D., Peelman, L & Gasthuys, F. (2008) High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Veterinary Microbiology*, 129: 58–68.
- Brum, J.S., Souza, T.M. & Barros, C. S. L. (2010). Aspectos epidemiológicos e distribuição anatômica das diferentes formas clínicas do sarcoide equino no Rio Grande do Sul: 40 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(10):839-843.
- Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Stenquis, B. & Hansson, B.G. (1999). A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *Journal of General Virology*, 80: 2437–2443.
- Funciello, B. & Roccabianca, P. (2020). Equine Sarcoid. From the Edited Volume Equine Science by Dr. Catrin Rutland and Dr. Albert Rizvanov.
- Gaynor, A.M., Zhu, K.W., Dela Cruz, F.N., Jr Affolter, V.K. & Pesavento, P.A. (2015). Localization of Bovine Papillomavirus Nucleic Acid in Equine Sarcoids. *Veterinary pathology*, 53(3):567-73.
- Gomiero, R.L.S. & Tostes, R.A. (2015). Clinical, anatomopathological and epidemiologic aspects of equine sarcoid 30 case study. *Archives of Veterinary Science*, 20(2):64-75.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2017). Censo Agropecuário. Brasília, DF. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>. Acesso em 11/11/2021.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Poxviridae (ICTV). (2021) 9th report. EC 52, Washington (DC); ICTV [updated 2021 Mar; accessed 2021 Dec 23]. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae.
- Knottenbelt, D.C. (2005). A Suggested Clinical Classification for the Equine Sarcoid. (Ed). *Técnicas clínicas na prática equina*, 4th. Leahurst. 4: pp.278-295.

- Knottenbelt, D.C. (2019). The Equine Sarcoid Why Are There so Many Treatment Options? *Veterinary Clinics Equine*, 35:243–262.
- Lunardi, M., Alcântara, B.K., Otonel, R.A.A., Rodrigues, W.B., Alfieri, A.F. & Alfieri, A.A. (2013). Bovine Papillomavirus Type 13 DNA in Equine Sarcoids. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7):2167–2171.
- Marcolongo-Pereira, C., Estima-Silva, P., Soares, M.P., Sallis, E.V.S., Grecco, F.B., Raffi, M.B., Fernandes, C.G. & Schild, A.L. (2014). Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(3):205-210.
- Pessoa, A.F.A., Pessoa, C.R.M., Neto, E.G.M., Dantas, A.F.M. & Riet-Correa, F. (2014). Doenças de pele em equídeos no semiárido brasileiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(8):743-748.
- Pinheiro, M., Pimentel, M.M.L., Vago, P.B., Barrêto Junior, R.A. & Dias, R.V. da C. (2015). Sarcoide equino: revisão de literatura. *Arquivos de ciências veterinárias e zoologia*, 18(2):103-107.
- Quinn, G. (2003). Skin tumours, in the horse: Clinical presentation and management, p.476-483 (Eds), *The Veterinary Record/In Practice*. 25: 476-483.
- Ramos, A., Souza, T.A.B., Norte, D.M., Ferreira, J.L.M. & Fernandes, C.G. (2008). Tumores em animais de produção: aspectos comparativos. *Ciência Rural*, 38(1): 148-154.
- Sauthier, J.T., Daudt, C., Silva, F.R.C., Alves, C.D.B.T., Mayer, F.Q., Bianchi, R.M., Driemeier, D., Streit, R.S.A., Staats, C.C., Canal, C.W. & Weber, M.N. (2021). The genetic diversity of “papillomavirome” in bovine teat papilloma lesions. *Animal Microbiome*, 3: 51.
- Semik-Gurgul, E. (2020). Molecular approaches to equine sarcoids. *Equine veterinary journal*, 53:221–230.
- Silva, M.S., Weiss, M., Brum, M.C.S., Anjos, B.L., Torres, F.D., Weiblen, R. & Flores, E.F. (2010). Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22:603–606.
- Souza, T.M., Brum, J.S., Figuera, R.A., Brass, K.E. & Barros, C.S.L. (2011). Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(5):379-382.
- Szczerba-Turek, A., Siemionek, J., Ras, A., Bancercz-Kisiel, A., Platt-Samoraj, A., Lipczynska-Ilczuk, K. & Szweda, W. (2019). Genetic evaluation of bovine papillomavirus types detected in equine sarcoids in Poland. *Pol. Journal of Veterinary Science*, 22(1): 25–29.
- Tura, G., Savini, F., Gallina, L., Ragione, R.M., Durham, A.E., Mazzeschi, M., Lauriola, M., Avallone, G., Sarli, G., Brunetti, B., Muscatello, L.V., Girone, C. & Bacci, B. (2021). Fibroblast-associated protein-a expression and BPV nucleic acid distribution in equine sarcoids. *Veterinary Pathology*. XX(X).

Wilson, A.D., Armstrong, E.L.R., Gofton, R.G., Mason, J., De Toit, N. & Day, M.J. (2013). Characterisation of early and late bovine papillomavirus protein expression in equine sarcoids. *Veterinary Microbiology*, 23;162(2-4):369-380.

4 Considerações Finais

O presente trabalho demonstrou que na Região Sul do Rio Grande do Sul sarcoide equino é a mais importante neoplasia cutânea dos equinos. Observou-se que a doença ocorre principalmente em animais da raça Crioula, que é a mais numerosa na região e que equinos de 24 meses a cinco anos estão entre os mais frequentemente afetados. As lesões únicas são as mais numerosas e ocorrem nos membros. Foi possível sugerir que as lesões de sarcoide menores que 7,5 cm têm mais possibilidade de não recidivar após a excisão completa. O tipo mais frequentemente diagnosticado é o fibroblástico.

Referências

ABREU, D. B.; CUNHA, M. E. N.; SILVA, E. N.; MENEZES, R. V.; FERREIRA, M. M.; ARAÚJO, A. L.; AYRES, M. C. C. Sarcóide recidivante em glândula de um equino: Relato de caso. **PUBVET**, v.12, n.2, a25, p.1-7, 2018.

ALCÂNTARA, B. K.; ALFIERI, A. A.; HEADLEY, S. A.; RODRIGUES, W. B.; OTONEL, R. A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Molecular characterization of bovine *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13) DNA in equine sarcoids. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.4, p.431-436, 2015.

ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira e Zootecnia**, v.39, p.119-129, 2010.

ANGELOS, J.; OPPENHEIM, Y.; REBHUN, W.; MOHAMMED, H.; ANTCZAK, D. F. Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. **Animal Genetics**, v.19, p.411-425, 1988.

ANJOS, B. L.; SILVA, M. S.; DIEFENBACH, A.; BRITO, M. F.; SEPPA, G. S.; BRUM, M. C. S. Sarcóide equino associado ao papilomavírus bovino BR-Uel-4. **Ciência Rural**, v.40, n.6, p.1456-1459, 2010.

ARAGÃO, A. T. I.; RAITER, J.; MACHADO, L. F. S.; OLIVEIRA, J. E. B. G.; GNEIDING, B.; LUCIOLI, J. Dermatopathies in horses in the state of Santa Catarina. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.16, n.2, 2018.

ASSIS-BRASIL, N. D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; STIGGERI, A. L.; FISS, L.; SANTOS, B. L.; COELHO, A. C. B.; SALLIS, E. S. V.; FERNANDES, C. G.; SCHILD, A. L. Equine dermatopathies in southern Brazil: a study of 710 cases. **Ciência Rural**, v.45, n.3, p.519-524, 2015.

BENJAMIN, M. K. E.; DIPLOMATE, A. C. T. How to Treat Equine Sarcoids by Autologous Implantation. **Lameness Surgery**, v.54, 2008.

BERGVALL, Kerstin. Sarcoids. **Veterinary Clinic Equine**, v.29, p.657–671, 2013.

BERRUEX, F.; GERBER, V.; WOHLFENDER, F. D.; BURGER, D.; KOCH, C. Clinical course of sarcoids in 61 Franches-Montagnes horses over a 5 to 7 year period. **Veterinary Quarterl**, v.36, n.4, p.189-196, 2016.

BIANCHI, M. V.; BOOS, G. S.; MELLO, L. S.; VARGAS, T. P.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D.; PAVARINI, S. P. A Retrospective Evaluation of Equine Cutaneous Lesions Diagnosed in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, n.1388, 2016.

BOGAERT, L.; MARTENS, A.; DE BAERE, C.; GASTHUYS, F. Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. **Research in Veterinary Science**, v.79, p.253–258, 2005.

BOGAERT, L.; MARTENS, A.; POUCKE, M. V.; DUCATELLE, R.; COCK, H. D.; DEWULF, J.; BAERE, C. D.; PEELMAN, L.; GASTHUYS, F. High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. **Veterinary Microbiology**, v.29, p.58–68, 2008.

BOGAERT, L.; VAN HEERDEN, M.; DE COCK, H. E. V.; MARTENS, A.; CHIERS, K. Molecular and Immunohistochemical Distinction of Equine Sarcoid From Schwannoma. **Veterinary Pathology**, v.48, n.3, p.737-741, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Brasília: **MAPA**, 54 p 2016.

BRUM, J. S.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Aspectos epidemiológicos e distribuição anatômica das diferentes formas clínicas do sarcoide equino no Rio Grande do Sul: 40 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p.839-843, 2010.

FORSLUND, O.; ANTONSSON, A.; NORDIN, P.; STENQUIS, B.; HANSSON, B. G. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal of General Virology**, v.80, p.2437–2443, 1999.

FUNICIELLO, B.; ROCCABIANCA, P. Equine Sarcoid. From the Edited Volume Equine Science by Dr. Catrin Rutland and Dr. Albert Rizvanov. **Ciência Equina**. DOI: 10.5772/intechopen.91013. 2020.

GAYNOR, A. M.; ZHU, K. W.; DELA CRUZ, F. N.; AFFOLTER, V. K.; PESAVENTO, P. A. Localization of Bovine Papillomavirus Nucleic Acid in Equine Sarcoids. **Veterinary Pathology**, v.53, n.3, p.567-73, 2015.

GOMIERO, R. L. S.; TOSTES, R. A. Clinical, anatomopathological and epidemiologic aspects of equine sarcoid – 30 case study. **Archives of Veterinary Science**, v.20, n.2, p.64-75, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO de GEOGRAFIA e ESTATÍSTICA (IBGE). (2017). Censo Agropecuário. Brasília, DF. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>. Acesso em 11/11/2021.

INTERNATIONAL COMMITTEE on TAXONOMY of VIRUSES POXVIRIDAE (ICTV). (2021). 9th report. EC 52, Washington (DC); ICTV [updated 2021 Mar; accessed 2021 Dec 23]. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae.

JANDOVA, V.; KLUKOWSKA-RÖTZLER, J.; DOLF, G.; JANDA, J.; ROOSJE, P.; MARTI, E.; KOCH, C.; GERBER, V.; SWINBURNE, J. Whole genome scan identifies several chromosomal regions linked to equine sarcoids. **Schweiz. Archives Tierheilk**, v.154, n.1, p.19-25, 2012.

KAINZBAUER, C.; RUSHTON, J.; TOBER, R.; SCASE, T.; NELL, B.; SYKORA, S.; BRANDT, S. Bovine papillomavirus *type 1* and *Equus caballus* papillomavirus 2 in equine squamous cell carcinoma of the head and neck in a Connemara mare. **Equine Veterinary Journal**, v.44, p.112–115, 2012.

KARREM, H. M.; SALMAN, S. S. Molecular Phylogenetic Analysis of equine sarcoid. **Journal of Veterinary Research**, v.23, n.7, p.688-693, 2019.

KNOTTENBELT, Derek. A Suggested Clinical Classification for the Equine Sarcoid. (Ed). **Técnicas clínicas na prática equina**, 4th. Leahurst. 4: pp.278-295, 2005.

KNOTTENBELT, Derek. The Equine Sarcoid Why Are There so Many Treatment Options? **Veterinary Clinic Equine**, v.35, p.243–262, 2019.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Piracicaba. **ESALQ/USP**, 2006. 250p.

LUNARDI, M.; ALCÂNTARA, B. K.; OTONEL, R. A. A.; RODRIGUES, W. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine Papillomavirus Type 13 DNA in Equine Sarcoids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.7, p.2167–2171, 2013.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ESTIMA-SILVA, P.; SOARES, M. P.; SALLIS, E. V. S.; GRECCO, F. B.; RAFFI, M. B.; FERNANDES, C. G.; SCHILD, A. L. Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.3, p.205-210, 2014.

MARTI, E.; LAZARY, S.; ANTCZAK, D. F.; GERBER, H. Report of the first international workshop on equine sarcoid. **Equine veterinary journal**, v.25, n.5, p.397-407, 1993.

MAULDIN, E. A.; PETERS-KENNEDY, J. 2016. Skin and appendages. p.509 - 736. In: Jubb, Kennedy and Palmer's **Pathology of Domestic Animals**, Vol.1 6th ed. Elsevier, St Louis.

NASCIMENTO, Claudio. Silva. **A alterações cutâneas diagnosticadas em equinos na região de Cuiabá**. 46f. Dissertação. (Mestrado em Biociência Animal e Saúde Animal) Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2014. <<https://repositorio.pgsskroton.com/bitstream/123456789/558/1/Altera%C3%A7%C3%B5es%20cut%C3%A2neas%20diagnosticadas%20em%20equinos%20na%20regi%C3%A3o%20de%20Cuiab%C3%A1.pdf>>. Acesso em: 07 de Dez. 2021.

OGLUSZKA, M.; STARZYNSKI, R. R.; PIERZCHALA, M.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; RAS, A. Equine Sarcoids Causes, Molecular Changes, and Clinicopathologic Features: A Review. **Veterinary Pathology**, v.58, n.3, p.472-482, 2021.

PESSOA, A. F. A.; PESSOA, C. R. M.; NETO, E. G. M.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Doenças de pele em equídeos no semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileir**, v.34, n.8, p.743-748, 2014.

PINHEIRO, M.; PIMENTEL, M. M. L.; VAGO, P. B.; BARRÊTO, J.; RAIMUNDO, A.; DIAS, R. V. C. Sarcóide equino: revisão de literatura. **Arquivo Ciência Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.2, p.103-107, 2015.

QUINN, G. (2003). **Skin tumours, in the horse**: Clinical presentation and management, p.476-483 (Eds), The VeterinaryRecord/In Practice. n.25, p.476-483.

RAMOS, A.; SOUZA, T. A. B.; NORTE, D. M.; FERREIRA, J. L. M.; FERNANDES, C. G. Tumores em animais de produção: aspectos comparativos. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.148-154. 2008.

RICHTER, Gabriela. **Panorama da Equinocultura no Rio Grande do Sul: evolução de 2010 a 2016**. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Equina pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2017. <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/172296>> Acesso em: 07 de Dez. 2021.

ROTHACKER, C. C.; BOYLE, A. G.; LEVINE, D. G. Autologous vaccination for the treatment of equine sarcoids: 18 cases (2009–2014). **Canadian Veterinary Journal**, v.56, n.7, p.709-714, 2015.

SAUTHIER, J. T.; DAUDT, C.; SILVA, F. R. C.; ALVES, C. D. B. T.; MAYER, F. Q.; BIANCHI, R. M.; DRIEMEIER, D.; STREIT, R. S. A.; STAATS, C. C.; CANAL, C. W.; WEBER, M. N. The genetic diversity of “papillomavirome” in bovine teat papilloma lesions. **Animal Microbiome**, n.3, p.51, 2021.

SCOTT, D. W.; MILLER Jr, W. H. **Equine Dermatology**. W.B. Saunders, St Louis, 2003. p.698-795.

SEMIK-GURGUL, Ewelina. Molecular approaches to equine sarcoids. **Equine Veterinary Journal**, v.00, n.1, p.10. 2020.

SILVA, M. S.; WEISS, M.; BRUM, M. C. S.; ANJOS, B. L.; TORRES, F. D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n.22, p.603–606, 2010.

SOUZA, T. M.; BRUM, J. S.; FIGHERA, R. A.; BRASS, K. E.; BARROS, C. S. L. Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.5, p.379-382, 2011.

SPRENGER, L. K.; GABARDO, L. B.; RISOLIA, L. W.; MOLENTO, M. B.; SILVA, A. W. C.; SOUSA, R. S. Frequência de neoplasias cutâneas em equinos: estudo retrospectivo do laboratório de patologia veterinária da universidade federal do paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.3, p.81-86, 2014.

SZCZERBA-TUREK, A.; SIEMIONEK, J.; RAS, A.; BANCERZ-KISIEL, A.; PLATT-SAMORAJ, A.; LIPCZYNSKA-ILCZUK, K.; SZWEDA, W. Genetic evaluation of bovine papillomavirus types detected in equine sarcoids in Poland. Pol. **Journal of Veterinary Science**, v.22, n.1, p.25-29, 2019.

TURA, G.; SAVINI, F.; GALLINA, L.; RAGIONE, R. M.; DURHAM, A. E.; MAZZESCHI, M.; LAURIOLA, M.; AVALLONE, G.; SARLI, G.; BRUNETTI, B.; MUSCATELLO, L. V.; GIRONE, C.; BACCI, B. Fibroblast-associated protein-a expression and BPV nucleic acid distribution in equine sarcoids. **Veterinary Pathology**, XX, (X). 2021.

WILSON, A. D.; ARMSTRONG, E. L. R.; GOFTON, R. G.; MASON, J.; DE TOIT, N.; DAY, M. J. Characterisation of early and late bovine papillomavirus protein expression in equine sarcoids. **Veterinary Microbiology**, v.23, n.2-4, p.369-380, 2013.