SILMARA ROSSI

Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Eliana Reiko Matushima

SÃO PAULO

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1868
FMVZ

Rossi, Silmara

Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae) / Silmara Rossi. – São Paulo : S. Rossi, 2007.
104 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. *Chelonia mydas*. 2. Leucócitos. 3. Citometria de fluxo. 4. Perfil hematológico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do perfil hematológico e função celular de *Chelonia mydas* (Reptilia, *Chelonia*, *Cheloniidae*) com e sem fibropapilomatose do litoral norte do Estado de São Paulo", protocolo nº697/2005, utilizando 20 tartarugas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Blood profile and cell function of the *Chelonia mydas* (Reptilia, *Chelonia*, *Cheloniidae*) with and without fibropapillomatosis from São Paulo north coast", protocol number 697/2005, utilizing 20 tortoises, under the responsibility of Prof. Dr. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 19 de agosto de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matéria
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROSSI, Silmara

Título: Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas*
(LINNAEUS,1758) (Testudines, Cheloniidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Patologia Experimental e
Comparada da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____
Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____
Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Antonio e Maria de Lourdes,
por todo o apoio e incentivo durante a sua realização e
por toda a preocupação com a
minha educação desde a infância.

Dedico a todas as tartarugas marinhas,
especialmente à espécie *Chelonia mydas*,
por serem animais maravilhosos e por terem feito
parte dessa etapa importante de minha vida.

“Se as coisas continuarem do jeito que vão, um dia o mundo não terá mais répteis. Certas pessoas aceitarão tranquilamente essa situação, mas eu me inquieto diante de tal perspectiva. Os répteis constituem uma parte velha da natureza silvestre, o meio em que o homem obteve os nervos e os hormônios que os tornaram humanos. Se permitirmos que os répteis desapareçam, isso significará que estamos dispostos a deixar que toda natureza silvestre desapareça. Quando tal acontecer, já não seremos rigorosamente humanos.”

(Archie Carr e redatores da *Life*)

“As pessoas falam freqüentemente no maravilhoso
acontecimento da aparição do Homem
intelectual – mas a aparição
de insetos com outros sentidos é mais maravilhosa...
Diante da face da Terra coberta com as
mais belas savanas e florestas,
quem se atreve a dizer que a
intelectualidade é o único objetivo no mundo?”

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, Matu, por ter me aceitado no Programa de Pós-Graduação e por todos os seus ensinamentos. Muito obrigada pelos incentivos nos momentos difíceis, nos quais tudo parecia impossível... Obrigada pelas nossas conversas biológicas e médicas!

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Carlos Sá-Rocha por ter me apresentado ao citômetro de fluxo e por toda sua ajuda e apoio nas dúvidas e no desafio do desenvolvimento da metodologia proposta nesse trabalho.

Sou muito grata à Vanessa de Moura Sá-Rocha, por toda sua paciência e ensinamentos sobre a citometria de fluxo e sobre a metodologia desenvolvida. Muito obrigada pelo seu bom humor nas horas difíceis!

Agradeço aos meus ex-professores de Zoologia da Graduação: José Cláudio Höfling e Luiza Ishikawa Ferreira, por todos seus ensinamentos e apoio na minha decisão em estudar os animais...

Agradeço toda a equipe do Projeto Tamar-Ibama base de Ubatuba/SP, por permitirem a coleta das amostras e dos dados necessários. Agradecimentos especiais ao Max Rondon Werneck, veterinário da base, por toda sua ajuda e paciência durante as 11 coletas; ao José Henrique Becker, pelas conversas amigáveis e contribuições; à Suami Macedo; ao Bruno Giffoni e à Berenice Gallo. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria sido concluído! Agradeço também aos inúmeros estagiários do Projeto Tamar que estavam presentes durante as coletas e que se disponibilizaram a ajudar.

Agradeço a amiga Thaís Caroline Sanches por ter me recebido de braços abertos desde o meu primeiro contato no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), durante um estágio realizado em 2004. Obrigada por todos os seus ensinamentos sobre Hematologia e pelas inúmeras conversas.

Agradeço a minha amiga Deise R. G. Agnani por todo o incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho e pelas conversas sobre Mestrado e suas aflições... Muito obrigada pela sua amizade desde a época da Graduação e por me ouvir nas horas difíceis!

Muito obrigada à Adriana Rachel de Moraes Crété, amiga que me incentivou a entrar em contato com a Matu e que me hospedou nos meus primeiros dias em São Paulo. Muito obrigada pelas conversas até altas horas sobre os nossos ideais profissionais e pessoais...

Obrigada à Viviane Cristhiane Nemer, ex-residente do Departamento de Patologia, pelas conversas amigáveis durante o período em que moramos juntas. Muito obrigada pelo apoio que recebo até hoje!

Meus agradecimentos à Hellen Moretti por nossas conversas e por todos seus ensinamentos do idioma inglês.

Agradeço ao Luiz Fernando Larangeira Lopes, o Pikaxu, por toda sua ajuda na edição das fotos apresentadas nesse trabalho e por nossas inúmeras e bem humoradas conversas sobre Evolução das Aves (os “répteis glorificados”).

Agradecimentos ao colega colombiano, Elmer Alexander Genoy-Puerto, o Alex, por toda sua ajuda nos experimentos e nos ensinamentos sobre o idioma espanhol. ¡Muchas gracias!

Agradeço à amizade da Alessandra Caprara, apaixonada também pelas tartarugas marinhas, durante os primeiros momentos da realização desse trabalho. Muito obrigada por nossas conversas e risadas e por me acompanhar na primeira coleta em Ubatuba!

Muito obrigada à Juliana Anaya Sinhorini pelas conversas e pela participação divertidíssima em uma coleta no Projeto Tamar-Ibama em Ubatuba.

Agradeço à Renata Assis Casagrande, minha companheira de Mestrado desde 2005, pelas conversas filosóficas sobre nossas profissões, pelo período em que moramos juntas no Crusp (principalmente na “Nova Era” ...) e pelo período em que passamos juntas na “Escolinha do Tio Bauer” (sobrevivemos!).

Agradeço aos alunos de iniciação científica do LAPCOM: Marina de Oliveira César, Alice de Oliveira, Bruna Silva Miranda e Raoní Bertelli Canal. Agradeço especialmente Ticiane Zwarg por toda sua colaboração durante a realização dos experimentos e seu bom humor. Muito obrigada Tici, por sua amizade e constante disposição em aprender e trabalhar nas coletas e nos experimentos, além da ajuda em toda a análise estatística da Hematologia!

Muito obrigada à Josilene da Silva, companheira de profissão e de paixão pelas tartarugas marinhas, por nossas conversas e pelo tempo em que moramos no Crusp.

Meus agradecimentos ao técnico do LAPCOM, Igor M. Zimovski, pela ajuda nos experimentos.

Agradeço ao Bruno de Oliveira Ferronato pelas trocas de informações sobre os nossos experimentos.

Agradeço ao Marco Aurélio Gattamorta, companheiro de profissão, por todo seu apoio durante o breve estágio que realizei no LAPCOM e pela força que me forneceu quando decidi fazer o exame de seleção para o mestrado.

Sou muito grata à Sandra Freiburger Affonso, pela ajuda no início dos meus experimentos e pela disponibilidade constante em discutir os resultados.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, em especial à Denise Kinoshita, por toda sua disponibilidade em me ajudar nos experimentos e nas análises da citometria e à Andréia Latorre, pelas conversas e por todo o apoio.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia: Priscila, Magali e Ricardo (Jibóia) pelo apoio durante os experimentos.

Muito obrigada aos colegas e aos professores do Instituto de Biociências - Departamento de Zoologia, que me ajudaram muito durante a realização da minha monitoria na disciplina Vertebrados.

Agradecimentos ao Luiz Roberto Sardinha e à técnica Clara Maciel Cavalcanti, ambos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelas separações celulares no citômetro de fluxo modelo Vantage.

Muito obrigada à Silvia Bracale, secretária da Pós-Graduação em Patologia e Experimental e Comparada, pela ajuda nas questões burocráticas e também às secretárias do Departamento de Patologia (VPT) Cláudia e Cristina.

Agradecimentos especiais...

... aos meus pais, José Antonio e Maria de Lourdes, por todo o apoio durante a realização deste trabalho. Por terem compreendido todos os momentos em que estive ausente...

... à minha irmã Silvana que sempre me apoiou para que eu seguisse em busca da realização dos meus sonhos. Por todas as palavras de conforto e estímulo para que eu "continuasse a nadar"...

... ao meu músico favorito, Renato, por toda sua compreensão durante os períodos de ausência, por sua paciência e apoio nas horas difíceis e por ter mantido a música sempre presente na minha vida!

...às tartarugas verdes, maravilhosas...

... a Deus por mais essa oportunidade em minha vida.

RESUMO

ROSSI, S. **Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)** [Impact study of fibropapillomatosis in *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)]. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Chelonia mydas, denominada tartaruga verde, é uma tartaruga marinha que freqüenta o litoral brasileiro para alimentação e nidificação e é considerada em perigo de extinção pela IUCN (2006). A fibropapilomatose, doença caracterizada por tumores cutâneos benignos (fibropapilomas), é uma das mais importantes ameaças à sobrevivência dessa espécie. Pesquisas sugerem o envolvimento de agentes infecciosos virais em associação com fatores ambientais e genéticos. Foram estudadas 47 tartarugas provenientes do litoral do estado de São Paulo, sendo 18 sem fibropapilomas e 29 acometidas. Dados de biometria das tartarugas, quantidade, localização e tamanho dos tumores foram anotados. O objetivo do trabalho foi avaliar a função dos leucócitos sangüíneos e o perfil hematológico das tartarugas acometidas ou não. As células receberam estímulo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus* para avaliação da fagocitose e miristato-acetato de forbol (PMA) para avaliação do *burst* oxidativo. Foram identificadas três populações celulares: heterófilos, monócitos e linfócitos. Os monócitos foram as células responsáveis pela fagocitose e pelo *burst* oxidativo. Animais com fibropapilomas apresentaram intensidade de *burst* oxidativo basal e induzido por PMA maior. No entanto, animais sem fibropapilomas apresentaram maior intensidade de fagocitose (estimulada por *Saccharomyces cerevisiae*). Foi realizado hemograma completo e a análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre animais com e sem tumores, apenas para HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e os animais com fibropapilomatose apresentaram a menor média para esse parâmetro. A patogenia ainda é pouco elucidada, fato preocupante porque esta doença acomete muitas tartarugas jovens. Doenças relacionadas à poluição são um fator relevante para a redução populacional de animais e para o desequilíbrio dos ecossistemas.

Palavras-chave: *Chelonia mydas*, Leucócitos, Citometria de fluxo, Perfil hematológico.

ABSTRACT

ROSSI, S. **Impact study of fibropapillomatosis in *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae).** [Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)]. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Chelonia mydas, called green turtle, is a sea turtle that feeds and nests in brazilian coast and is considered endangered (Red List – IUCN, 2006). The fibropapillomatosis, disease characterized as benign cutaneous tumor (fibropapillomas), is a threat to *Chelonia mydas*. Studies suggest that fibropapillomatosis cause may be an association of virus, environmental and genetic factors. We studied 47 turtles from São Paulo north coast, twenty nine with fibropapillomas and 18 without this disease. The biometry of the turtles, quantity, localization and size of the tumors was registered. The goal of this work was to evaluate the leukocytes function and blood profile of the turtles with and without fibropapillomatosis. The cells were stimulated with *Saccharomyces cerevisiae* and *Staphylococcus aureus* to phagocytosis evaluation and phorbol miristate-acetate (PMA) to oxidative burst evaluation. Three populations cells were identified: heterophils, monocytes and lymphocytes. The monocytes were the responsible cells to phagocytosis and oxidative burst. The monocytes of the turtles with fibropapillomas displayed the higher oxidative burst fluorescence intensity (basal and stimulated). However, the monocytes of the turtles without fibropapillomas displayed the higher phagocytosis fluorescence intensity. The blood count and the statistics analysis were significant ($p < 0,05$) only for MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) among turtles with and without fibropapillomas, the animals with fibropapillomatosis showed the minor average. The pathogenesis of fibropapillomatosis is still unclear and is a threat to green turtle survive because this disease affect young green turtles. Diseases related with pollution are a relevant factor for the reduction of animal population and ecosystem unbalance.

Key-words: *Chelonia mydas*, Leukocytes, Flow Cytometer, Blood Profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Chelonia mydas</i> (macho).....	22
Figura 2	Distribuição das escamas da carapaça, do plastrão e da cabeça da espécie <i>Chelonia mydas</i>	24
Figura 3	Estruturas morfológicas externas da carapaça e do plastrão de uma tartaruga marinha.....	25
Figura 4	Estruturas da cabeça importantes para identificação.....	25
Figura 5	Praia Camburi em Ubatuba/SP.....	53
Figura 6	Praia Almada em Ubatuba/SP.....	53
Figura 7	Fibropapilomas encontrados nas tartarugas verdes capturadas no litoral do estado de São Paulo/SP, ago 2005 - nov 2006.....	60
Figura 8	Tartaruga extremamente debilitada acometida pela fibropapilomatose.....	61
Figura 9	Células encontradas no sangue de <i>Chelonia mydas</i> :: heterófilo (seta azul); linfócito (seta preta); trombócito (seta vermelha). Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100x.....	74
Figura 10	Células encontradas no sangue de <i>Chelonia mydas</i> :: eosinófilo (seta preta); hemácia (seta vermelha). Coloração: May-Grünwald-Giemsa , técnica de Rosenfeld, objetiva 100x.....	74
Figura 11	Monócito (centro) encontrado no sangue de <i>Chelonia mydas</i> ::. Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100x.....	74
Figura 12	Leucócitos obtidos pela utilização do Ficoll-Paque™ Plus®: eosinófilo (seta azul), heterófilo (seta vermelha), monócito (seta preta) e linfócito (seta verde). Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100X.....	76
Figura 13	Monócitos fagocitando Zymosan.....	76
Figura 14	Citograma do sangue de <i>C. mydas</i> obtido após utilização do Ficoll-Paque™ Plus, primeira calibração.....	78
Figura 15	Citograma do sangue <i>C. mydas</i> obtido após utilização do Ficoll-Paque™ Plus, segunda calibração.....	78
Figura 16	Populações de células do sangue de <i>C. mydas</i> obtidas com a utilização do Ficoll- Paque™ Plus.....	79
Figura 17	Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de <i>C. mydas</i> com fibropapilomatose.....	80
Figura 18	Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de <i>C. mydas</i> , com fibropapilomatose, estimulados pelo Zymosan.....	80
Figura 19	Histograma representando a intensidade de <i>burst</i> oxidativo basal dos monócitos de <i>C. mydas</i> , com fibropapilomatose.....	81
Figura 20	Histograma representando a intensidade de <i>burst</i> oxidativo induzido por PMA dos monócitos de <i>C. mydas</i> , com fibropapilomatose.....	81
Figura 21	Histograma representando a intensidade de fluorescência de	

	monócitos de <i>C. mydas</i> sem fibropapilomatose.....	81
Figura 22	Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de <i>C. mydas</i> , sem fibropapilomatose, estimulados pelo Zymosan.....	82
Figura 23	Histograma representando a intensidade de <i>burst</i> oxidativo basal os monócitos de <i>C. mydas</i> , sem fibropapilomatose.....	82
Figura 24	Histograma representando a intensidade de <i>burst</i> oxidativo induzido por PMA dos monócitos de <i>C. mydas</i> , sem fibropapilomatose.....	82
Figura 25	Histograma representando a intensidade de fluorescência dos monócitos de <i>C. mydas</i> , com fibropapilomatose.....	83
Figura 26	Histograma representando a intensidade de fluorescência dos monócitos de <i>C. mydas</i> com fibropapilomatose estimulados por SAPI..	83
Figura 27	Intensidade de fagocitose da população de monócitos do sangue de <i>C. mydas</i>	84
Figura 28	Intensidade de <i>burst</i> oxidativo basal da população de monócitos do sangue de <i>C. mydas</i>	84
Figura 29	Intensidade de <i>burst</i> oxidativo induzido por PMA da população de monócitos do sangue de <i>C. mydas</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de células obtidas de cada região após a separação pelo citômetro.....	50
Tabela 2	Biometria e massa corpórea das tartarugas verdes sem fibropapilomas, capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	54
Tabela 3	Biometria e massa corpórea das tartarugas verdes com fibropapilomas, capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	55
Tabela 4	Escores da quantidade dos fibropapilomas.....	56
Tabela 5	Escores do tamanho dos fibropapilomas.....	57
Tabela 6	Número de tartarugas verdes por escore da quantidade de tumores.....	57
Tabela 7	Quantidade e escores do tamanho dos fibropapilomas encontrados nas tartarugas verdes capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	58
Tabela 8	Área dos fibropapilomas por tartaruga verde	59
Tabela 9	Hemograma das tartarugas verdes sem fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.	63
Tabela 10	Hemograma das tartarugas verdes com fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.	64
Tabela 11	Leucograma das tartarugas verdes sem fibropapilomas (valor relativo - %) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	65
Tabela 12	Leucograma das tartarugas verdes com fibropapilomas (valor relativo - %) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	66
Tabela 13	Leucograma das tartarugas verdes sem fibropapilomas - valor absoluto (/mm ³) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	67
Tabela 14	Leucograma das tartarugas verdes com fibropapilomas - valor absoluto (/mm ³) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	68
Tabela 15	Contagem de trombócitos das tartarugas verdes sem fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	69
Tabela 16	Contagem de trombócitos das tartarugas verdes com fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006.....	70
Tabela 17	Hemograma e Leucograma das tartarugas verdes com fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006 relacionados aos escores de tamanho dos tumores	72
Tabela 18	Grupos de tartarugas verdes com e sem fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006,	

	de acordo com a gravidade da doença.....	73
Tabela 19	Contagem diferencial de leucócitos de <i>Chelonia mydas</i> com fibropapilomas após separação pelo Ficoll Paque Plus®	75
Tabela 20	Contagem diferencial de leucócitos de <i>Chelonia mydas</i> sem fibropapilomas após separação pelo Ficoll Paque Plus®	76
Tabela 21	Populações celulares obtidas pelo <i>Sorting</i> e confirmadas por microscopia óptica.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP: fosfatase ácida
Bas: basófilo
CAE: cloroacetato-esterase
CCC: comprimento curvilíneo da carapaça
CCP: comprimento curvilíneo do plastrão
Cel: célula
CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média
cm: centímetro
cm²: centímetro quadrado
cm³: centímetro cúbico
dL: decilitro
Eos: eosinófilo
Eritr: eritrócito
fL: ficolitro
FSC: *Forward Scatter Channel*
g: grama
GTFP: *green turtle fibropapilloma*
H₂O: água
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HCM: hemoglobina corpuscular média
Hb: hemoglobina
Ht: hematócrito
He: hemácia
Het: heterófilo
IUCN: *World Conservation Union*
kg: quilograma
KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico
LCC: largura curvilínea da carapaça
LCP: largura curvilínea do plastrão
Leu: leucócito
L: litro
Lin: Linfócito
MC: massa corpórea
μL: microlitro
mg: miligrama
mL: mililitro
mm³: milímetro cúbico
mM: milimolar
M: molar ou mol
Mon: monócito
NaCl: cloreto de sódio
Na₂SO₄: sulfato de sódio

Na₂HPO₄ × 12 H₂O: fosfato de sódio séc. dodeca-hidratado
NBE: alfa-naftil-butirato-esterase
NCC: células citotóxicas não específicas
NK: *Natural killer*
OH: radical hidroxila
O₂⁻: ânion superóxido
PAS: ácido periódico de Schiff
PBS: solução tampão fosfato salina
PCR: Reação de Amplificação pela Polimerase
PEIA: Parque Estadual Ilha Anchieta
pg: picograma
PI: iodeto de propídeo
PMA: miristato-acetato de forbol
Prot. Pl: proteína plasmática
q.s.p.: quantidade suficiente para
SAPI: *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídeo
SFB: Soro fetal bovino
SSC: *Side Scatter Channel*
Tart: tartaruga
Tromb: Trombócito
TSA: *tryptic soy Agar*
VCM: volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	<i>Chelonia mydas</i>	22
2.2	FIBROPAPILOMATOSE.....	28
2.3	ETIOLOGIA DA DOENÇA.....	30
2.4	HEMATOLOGIA.....	33
2.5	IMUNOLOGIA.....	35
2.6	CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	GERAIS.....	38
3.2	ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	MANEJO, SELEÇÃO DAS TARTARUGAS E LOCAIS DE CAPTURA.....	39
4.2	BIOMETRIA.....	40
4.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	40
4.4	AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO.....	41
4.5	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CELULAR.....	45
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	TARTARUGAS, LOCAIS E FORMAS DE CAPTURA.....	51
5.2	BIOMETRIA.....	54
5.3	FIBROPAPILOMAS.....	56
5.4	HEMATOLOGIA.....	62
5.5	FUNÇÃO CELULAR.....	75
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXO	100

1 INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas realizam eficientes funções ecológicas sendo muito importantes no equilíbrio do ecossistema marinho, pois contribuem para a saúde e manutenção dos recifes de corais, estuários e praias arenosas (ECKERT et al., 2000). Desta forma, protegendo-as protegem-se os mares e as áreas costeiras (FRAZIER, 1999).

O vínculo entre humanos e tartarugas marinhas está efetivado há muito tempo, desde que o homem se estabeleceu nas regiões costeiras e iniciou várias atividades nos oceanos. Durante inúmeras gerações, as comunidades costeiras dependeram das tartarugas marinhas e de seus ovos para obtenção de proteínas e outros produtos e em muitas regiões do mundo essa prática ainda continua (ECKERT et al., 2000). Desta forma, durante o século XX a caça predatória desses animais contribuiu consideravelmente para a redução populacional de várias espécies.

Devido ao complexo ciclo de vida das tartarugas marinhas é extremamente necessário um plano de manejo e conservação para que os longos anos de declínio populacional se revertam. No Brasil, o Projeto Tamar-Ibama tem realizado atividades com o objetivo de conservação das espécies de tartarugas marinhas que freqüentam o litoral brasileiro. As espécies encontradas no Brasil são: *Chelonia mydas* (tartaruga verde), *Caretta caretta* (tartaruga cabeçuda), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente), *Lepidochelys olivacea* e *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro).

A história natural da tartaruga verde é difícil de ser estudada, pois os recém-eclodidos e jovens movem-se entre habitats de alimentação durante o desenvolvimento e os adultos migram entre locais de alimentação e reprodução por centenas ou milhares de quilômetros (BOWEN et al., 1992). Ainda há o fato de que apenas as fêmeas, assim como ocorre nas demais espécies de tartarugas marinhas, retornam às praias (deslocamento realizado para a nidificação).

Atualmente uma doença denominada fibropapilomatose tem contribuído para a redução da população de *Chelonia mydas* significativamente, uma vez que acomete quase exclusivamente essa espécie. Fato que agrava a sobrevivência desta espécie considerada em perigo de extinção pela *World Conservation Union* (IUCN, 2006).

Tem sido cada vez mais comum encontrar tartarugas verdes com papilomas ou fibropapilomas distribuídos pelo corpo. Dados obtidos da base do Tamar em Ubatuba - São Paulo, indicam o aumento da prevalência de 0 para 24%, no período de 1986 a 1998. Na área de Vitória - Espírito Santo, o número de casos já chegou a 40% em 2000 (BAPTISTOTTE et al., 2001).

As informações sobre a fibropapilomatose em tartarugas marinhas sugerem origem viral (HERBST et al., 1998), mas o desenvolvimento demográfico, as atividades industriais e agrônomicas em ambientes próximos às praias, às baías e aos lagos podem contribuir para o aumento da doença (BALAZS, 1991; ADNYANA; LADDs; BLAIR, 1997). A influência do meio ambiente sobre o estabelecimento da doença também foi levantada após estudos realizados na Flórida (EHRHART, 1991) e no Havaí (BALAZS, 1991), sugerindo o envolvimento de poluentes tóxicos e de biotoxinas, fatores também descritos por Adnyana, Ladds e Blair (1997). Estudos realizados em Baja California indicam que os efeitos do desenvolvimento econômico nos ecossistemas costeiro e marinho são ainda desconhecidos (GARDNER et al., 2003).

Os fibropapilomas podem interferir na hidrodinâmica e motilidade desses animais comprometendo a alimentação (ADNYANA; LADDs; BLAIR, 1997). Há estudos que registraram a remissão dos tumores, aumento de seus tamanhos e surgimento de novas formações. A fibropapilomatose é considerada uma doença debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998) e uma das mais importantes ameaças à sobrevivência da tartaruga verde. Atualmente é a maior responsável pela mortalidade e morbidade dessa espécie nas ilhas havaianas (WORK ; BALAZS, 1997).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Chelonia mydas*

Chelonia mydas (Figura 1) pertence à família Cheloniidae, sendo encontrada nos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (ERNST; BARBOUR, 1989). Representantes dos Oceanos Atlântico e Pacífico ocidental possuem até 230 kg e menor massa no Oceano Índico e no Caribe (PRITCHARD; MORTIMER, 2000).

A carapaça possui coloração negra nos filhotes, café nos indivíduos imaturos e apresenta muita variação nos adultos, sendo geralmente café, amarelo creme (PRITCHARD; MORTIMER, 2000) ou tons que variam do oliva ao marrom (ERNST; BARBOUR, 1989). A forma é oval e a margem ocasionalmente ondulada. Na carapaça encontram-se quatro pares de escudos costais. O plastrão possui cor branca nos filhotes e amarela nos adultos.

Fonte: Pritchard, 1979

Figura 1 – *Chelonia mydas* (macho)

A identificação dessa espécie é possível analisando-se estruturas morfológicas da carapaça, do plastrão e da cabeça (Figuras 2 a 4).

A cabeça possui forma arredondada com largura de até 15 cm, quatro pares de escamas pós-orbitais (PRITCHARD; MORTIMER, 2000), um par de escamas pré-frontais (Figura 4) e uma mandíbula serrilhada (ERNST; BARBOUR, 1989). A figura 3 demonstra a organização e a denominação dos escudos da carapaça e do plastrão de uma tartaruga marinha (PRITCHARD; MORTIMER, 2000).

A história natural da tartaruga verde é muito difícil de ser estudada por causa das longas escalas de tempo e espaço envolvidas. Os recém-eclodidos e jovens movem-se entre habitats de alimentação durante o desenvolvimento e os adultos migram entre locais de alimentação e reprodução por centenas ou milhares de quilômetros, sendo assim os movimentos de ambos são difíceis de serem acompanhados em ambiente marinho (BOWEN et al., 1992).

O acasalamento ocorre no mar durante a estação reprodutiva. A corte pode ser realizada por vários machos simultaneamente (de um a cinco). O macho posiciona-se em cima da fêmea, utilizando suas unhas presentes nas nadadeiras anteriores para segurar-se na carapaça dela (ERNST; BARBOUR, 1989).

As áreas de nidificação da espécie *Chelonia mydas* são: Costa Rica, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Veracruz e Quintana Rôo (México), Ilha Ascension, Ilha Mona, Ilha das Aves, Trindade, Dry Tortugas, Ilha das Mulheres, Ilha do Cabo Verde, Flórida, Geórgia, Bermuda, Alta Vela, Ilha Cayman, Cuba e Brasil (ERNST; BARBOUR, 1989).

Após a eclosão dos ovos, os filhotes das tartarugas marinhas iniciam uma fase pelágica que se acredita durar vários anos. Nessa fase encontram-se associadas a mantos de *Sargassum* que se formam próximos às principais correntes. Os filhotes realizam uma deriva passiva ocasionada pelas correntes no período imediato ao da eclosão dos ovos. Essa fase pelágica inicial é denominada “ano perdido” e varia de acordo com a espécie, sendo que a tartaruga verde permanece na fase pelágica até cerca de 20 a 30 cm de comprimento retilíneo de carapaça. (MEYLAN; MEYLAN, 2000).

Fonte: Pritchard e Mortimer (2000).

Figura 2 – Distribuição das escamas da carapaça, do plastrão e da cabeça da espécie *Chelonia mydas*

Fonte: Pritchard e Mortimer (2000)

Figura 3 – Estruturas morfológicas externas da carapaça e do plastrão de uma tartaruga marinha

Legenda - pf: escudos pré-frontais; po: escudos pós-orbitais; nares: narinas; r: ranfoteca

Fonte: Pritchard e Mortimer (2000).

Figura 4 – Estruturas da cabeça importantes para identificação da espécie *Chelonia mydas*

Há propostas do conceito de “habitats de desenvolvimento”, zonas nas quais encontram-se tartarugas imaturas. Podem consistir de um ou de uma série de habitats, geralmente áreas de alimentação costeiras nas quais as tartarugas encontram-se durante seu desenvolvimento até a fase adulta. Os momentos de entrada e saída desses habitats parecem estar relacionados com intervalos de tamanho bem definidos para algumas espécies. É comum capturar repetidas vezes a mesma tartaruga na mesma área ao longo de vários anos, sugerindo uma certa residência nesses locais por um certo período de tempo (MEYLAN; MEYLAN, 2000).

2.1.1 Evolução

O provável ancestral das tartarugas marinhas pertence ao grupo *Cotylosauria* e é o *Eunotosaurus africanus*, fóssil classificado como elo perdido entre os cotylossauros ou raiz dos répteis e das tartarugas verdadeiras. Essa espécie é conhecida pelos fósseis incompletos do sul da África e que datam do Permiano. Possui cerca de 4 a 5 polegadas e 8 costelas expandidas como nas tartarugas atuais. Atualmente o fóssil pode ser encontrado no Museu Britânico (PRITCHARD, 1979).

Sete espécies de tartarugas marinhas, representantes de duas famílias - *Cheloniidae* e *Dermocheliidae*, são os únicos elementos modernos que sobreviveram ao que foi uma ampla e diversa radiação do grupo *Cryptodira*. Essas sete espécies atuais são *Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii*, *Natator depressus* e *Dermochelys coriacea*. Há uma outra tartaruga que frequenta o Oceano Pacífico denominada *Chelonia agassizii*, reconhecida por alguns especialistas como uma oitava espécie. No entanto, estudos recentes levando em consideração sua morfologia, genética e composição bioquímica sugerem que possa ser uma subespécie de *Chelonia mydas* (MEYLAN; MEYLAN, 2000).

As espécies atuais de tartarugas marinhas formam um grupo monofilético da subordem *Cryptodira*, ou seja, derivam de um ancestral comum que não originou nenhum outro ramo de tartaruga existente. A subordem *Cryptodira*

inclui as tartarugas que fecham suas mandíbulas por meio de músculos que se contraem sobre uma cartilagem na câmara óptica e as que retraem suas cabeças sobre um plano vertical adquirindo uma forma em “S” entre as placas sobre o ombro (MEYLAN; MEYLAN, 2000).

2.1.2 Ordem Testudines e família Cheloniidae

A Ordem Testudines é composta por répteis que possuem carapaça e crânio anapsido. Atualmente encontram-se tartarugas em todos os continentes, exceto na Antártica. As espécies marinhas ocorrem predominantemente em águas tropicais dos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (ERNST; BARBOUR, 1989).

Essa ordem foi dividida em três subordens: a extinta Amphichelydia e as atuais Cryptodira e Pleurodira (PRITCHARD, 1979). A Subordem Cryptodira, cujos ancestrais datam do Jurássico (ERNST; BARBOUR, 1989), inclui as tartarugas dominantes no mundo atualmente (PRITCHARD, 1979). É considerado o grupo mais avançado de tartarugas apresentando dez famílias, incluindo as das tartarugas marinhas. A Subordem Pleurodira, considerada a mais primitiva apresenta apenas duas famílias (ERNST; BARBOUR, 1989).

As famílias, cujas tartarugas marinhas estão classificadas e que estão inseridas na Subordem Cryptodira, são Cheloniidae e Dermocheliidae (PRITCHARD, 1979).

A Família Cheloniidae possui 4 gêneros atuais: *Chelonia*, *Caretta*, *Lepidochelys* e *Eretmochelys*. Os gêneros extintos *Allopleuron*, *Catapleura*, *Glaucochelone*, *Glyptochelone*, *Peritresius* e *Tomochelone* e os gêneros atuais *Chelonia* e *Caretta* são conhecidos pelos depósitos encontrados na Europa e América do Norte que datam do Cretáceo Superior (ERNST; BARBOUR, 1989).

A família Dermocheliidae inclui uma única espécie: *Dermochelys coriacea* (PRITCHARD, 1979; ERNST; BARBOUR, 1989).

2.2 FIBROPAPILOMATOSE

Os fibropapilomas são neoplasias benignas de origem epitelial que vêm afetando tartarugas marinhas de várias regiões do mundo, como Estados Unidos, Caribe e Brasil. A fibropapilomatose, conhecida como *Green Turtle Fibropapilloma* (GTFP), é caracterizada por tumores cutâneos múltiplos (HERBST, et al., 1998), sendo raro os casos de animais com apenas um único tumor. Os fibropapilomas podem interferir na hidrodinâmica e motilidade desses animais, comprometendo conseqüentemente a alimentação (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997), sendo considerada doença debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998). Exames físicos revelam que a tartaruga afetada apresenta rachaduras na carapaça e no plastrão tornando-os menos rígidos (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990). Os animais acometidos podem apresentar distúrbios de flutuação, caquexia, hipoproteinemia, desbalanço eletrolítico, uremia e elevação de enzimas hepáticas (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990). O curso clínico e a duração da doença são pouco compreendidos. Sabe-se, entretanto, que há casos de remissão dos tumores, bem como de aumento do tamanho destes e surgimento de novas formações. O curso clínico pode ainda se manter estável (EHRHART; SINDLER; WITHERINGTON, 1986; JACOBSON et al., 1989; EHRHART, 1991).

A GTFP é considerada uma das mais importantes ameaças à sobrevivência da tartaruga verde, sendo atualmente, a maior responsável pela mortalidade e morbidade dessa espécie nas ilhas havaianas (WORK; BALAZS, 1997).

A ocorrência de fibropapilomas foi observada e registrada em estudos realizados por Luckes (1938) e Smith e Coates (1938) nas tartarugas das águas costeiras dos EUA e vem sendo relatada com frequência crescente a partir de 1986.

A fibropapilomatose é uma doença debilitante, que pode provocar a morte e acomete tartarugas marinhas principalmente da espécie *Chelonia mydas*, representando importante ameaça a esta espécie. Antes de 1982 não havia registro de GTFP nas tartarugas capturadas na Flórida e desde então o número de casos tem crescido consideravelmente (JACOBSON et al., 1989), registros apontam que mais de

50% das tartarugas capturadas nessa região possuem a doença (BRILL et al., 1995), segundo Ehrhart (1991) e Lackovich et al. (1999) a variação pode ser de 0 a 72,5%. No Havaí a variação é de 1 a 92% (BALAZS, 1991), na Austrália de 0 a 70% (LIMPUS; MILLER, 1994; AGUIRRE et al., 1999) e em média 21,5% na Indonésia (ADNYANA et al., 1997).

Têm sido observadas lesões como a GTFP também nas espécies *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* (HERBST, 1994), *Natator depressus* (LIMPUS; MILLER, 1994) e *Eretmochelys imbricata* (D'AMATO; NETO, 2000), sendo a doença confirmada, até então, por exames histopatológicos nas espécies *Caretta caretta* (HARSHBARGER, 1991) e *Eretmochelys imbricata* (D'AMATO; NETO, 2000).

No Brasil, os primeiros estudos realizados com o objetivo de elucidar a etiologia dos tumores em tartarugas marinhas foram realizados por Matushima no período de 1995-1996 (Projeto Fapesp nº 95/3573-1), 1998-1999 (Projeto Fapesp nº 98/2147-7), em 2003 (Tese de Livre Docência) e 2005-2007 (Projeto Fapesp nº 05/13218-5). Nestes estudos foram coletadas amostras dos tecidos tumorais para a realização de exames histopatológicos, imuno-histoquímicos, ultra-estruturais e moleculares, e sangue para análises hematológicas, bioquímicas e moleculares (MATUSHIMA et al., 1999,2001; MATUSHIMA, 2003).

Os fibropapilomas podem ter até 30 cm de diâmetro (LACKOVICH et al., 1999), podendo estar presentes em nadadeiras, olhos, base da cauda, regiões oral, cervical, inguinal, axilar e carapaça (JACOBSON et al., 1989; HERBST, 1994). Os tumores oculares variam de 2 a 4 cm de diâmetro podendo obstruir completamente a visão (JACOBSON et al., 1989; BROOKS et al., 1994), enquanto que os tumores orais podem obstruir a glote, levando os animais acometidos à morte (BALAZS et al., 1998).

Assim sendo, estes tumores representam importante ameaça à sobrevivência das tartarugas afetadas em meio natural. Podem provocar emaciação, inabilidade de natação e locomoção, impedir a apreensão de alimentos, dificultar a fuga de predadores e também prejudicar a respiração. No entanto, estudos realizados nas ilhas hawaianas obtiveram resultados que não suportaram a hipótese de que a presença da GTFP diminui a capacidade respiratória (BRILL et al., 1995). Os tumores

cutâneos possuem textura lisa a verrucosa, podem ser sésseis ou pedunculados e as maiores formações podem estar ulceradas e necróticas (JACOBSON et al., 1989).

As células do estrato espinhoso e de camadas mais externas da epiderme apresentam-se hipertróficas e com vacúolos citoplasmáticos, podendo conter inclusões intranucleares eosinofílicas ou basofílicas. As figuras mitóticas são mais freqüentes na epiderme, sendo raras na derme (JACOBSON et al., 1991; LACKOVICH et al., 1999).

A localização dos fibropapilomas é variável, sendo registrados na região da cabeça, pescoço, axilas e nadadeiras anteriores através de estudos em ilhas hawaianas (AGUIRRE et al., 1998). Na Indonésia estudos apontaram presença de tumores maiores na região corporal posterior, como por exemplo ao redor da cloaca e entre a cloaca e o final do plastrão. Podem crescer também na região ao redor dos olhos (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997) e nas suturas entre os escudos adjacentes (JACOBSON et al., 1989; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997).

2.3 ETIOLOGIA DA DOENÇA

Herpesvírus tem sido associado a doenças severas de quelônios como jabutis e tartarugas, causando conjuntivite, estomatite, traqueíte e pneumonia em espécies de jabutis denominadas *Testudo hermanni*, *T. graeca* e *T. horsfieldi* (CURRY et al., 2000). Também está relacionado com lesões de trato gastrointestinal, cérebro e pulmões em *Malacochersus tornieri* e *Testudo horsfieldii* (UNE et al., 1999). Dessa forma, um herpesvírus também tem sido associado à fibropapilomatose das tartarugas marinhas das espécies *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* e *Lepidochelys olivacea* (CURRY et al., 2000).

Várias famílias de vírus como Herpesviridae, Papovaviridae, Poxviridae, Adenoviridae e Retroviridae são conhecidas por causarem lesões proliferativas e tumores (HERBST, 1994; ORÓS et al., 1998). Entretanto, não houve

indicação da presença de papilomavírus em nenhuma amostra de fibropapiloma de *Chelonia mydas* analisada por PCR (Reação de Amplificação pela Polimerase) em estudos realizados por Brown, Lackovich e Klein (1999).

Herbst e Klein (1995) demonstraram que os tumores podem ser transmitidos para animais não afetados através da inoculação de homogenados celulares de fibropapilomas, fato compatível com a presença de um agente infeccioso. Esta parece ser também a explicação mais plausível para o surgimento e a disseminação da doença em tartarugas mantidas em cativeiro (HERBST, 1994). Curry et al. (2000) também identificaram herpesvírus em indução experimental de fibropapilomatose em tartarugas verdes.

Jacobson et al. (1991) observaram partículas virais sugestivas de herpesvírus em fibropapilomas de tartarugas. Partículas semelhantes também já foram observadas em tartarugas-verdes com doenças cutâneas, conjuntivite, traqueíte e pneumonia (REBELL; RYWLIN; HAINES, 1975; JACOBSON et al., 1986). Recentemente Drury, Gough e Jessop (1998) demonstraram a presença de partículas herpesvírus-like e papilomavírus-like em quelônios.

Outros estudos, baseados em técnica de PCR, vêm implicando o herpesvírus na patogenia e etiologia da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* (QUACKENBUSH et al., 1999,1998; LACKOVICH et al., 1999) e em *Lepidochelys olivacea* (CURRY et al., 2000).

Sabe-se que a doença está relacionada a um alfa-herpesvírus denominado *chelonid FP-associated herpesvirus* (C-FP-HV), o qual está presente em 100% das ocorrências naturais e em 100% dos tumores induzidos por inoculação em tartarugas mantidas em cativeiro. Foram identificadas quatro variantes distintas para o C-FP-HV denominadas "A", "B", "C" e "D" em três localidades: *Florida west central coast*, *Florida Keys & Bay* e *Indian River Lagoon*. A variante "A" foi encontrada em *C. mydas* das três áreas estudadas e *C. caretta* da *Florida Keys & Bay*; a variante "B" apenas em *C. mydas* da área denominada *Indian River Lagoon*; a variante "C" em *C. mydas*, *C. caretta* (*Florida Keys & Bay*) e *L. olivacea* (*Florida west central coast*); e a variante "D" apenas em um único espécime de *C. caretta* da área *Florida Keys & Bay* (ENE et al., 2005). De acordo com Brown, Lackovich e Klein (1999), o *chelonian*

herpesvírus associado com fibropapilomas em *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* e *Lepidochelys olivacea* é um candidato a agente etiológico da fibropapilomatose. Para Herbst e Klein (1995) está claro que o fator etiológico primário em GTFP é um agente infeccioso.

Ene et al. (2005) afirmam que é de suma importância a determinação de duas questões: em que fase do ciclo de vida as tartarugas são infectadas e em que localização geográfica a infecção ocorre.

A habilidade do herpesvírus em ser transmitido entre as tartarugas marinhas no oceano é, provavelmente, influenciada pela habilidade deste agente em manter a infecção por longos períodos de tempo no ambiente marinho (CURRY et al., 2000). A distribuição das variantes genéticas do C-FP-HV no ambiente marinho pode fornecer informações importantes para se elucidar a localização e o estágio do ciclo de vida em que as tartarugas são infectadas (ENE et al., 2005).

Cabe ressaltar que há um consenso de que a etiologia da GTFP está associada a vários fatores concorrentes e não somente a um agente primário. Sabe-se que a intensa infecção parasitária por trematódeos cardiovasculares debilita severamente o hospedeiro, o que poderia dificultar sua defesa contra a fibropapilomatose (JACOBSON et al., 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; AGUIRRE et al., 1998). Fatores ambientais como raios ultravioleta e agentes poluentes podem vir a causar alterações no sistema imunológico ou terem efeito carcinogênico (ANANTHASWAMY; PIERCEALL, 1990; WEISBURGER, 1989). Foi sugerido que em águas rasas, onde as tartarugas verdes se alimentam, ocorreria uma exposição maior aos raios UV. No entanto, os raios solares não parecem ser tão influentes na ocorrência da GTFP, já que a prevalência da doença varia muito em locais próximos com as mesmas características. Já foi demonstrado que a prevalência da GTFP em ambientes marinhos que sofrem com o impacto da atividade humana é maior (HERBST, 1994). Há hipóteses de que os contaminantes químicos induzam o vírus latente à infecção ou também que tais contaminantes causem imunossupressão, facilitando o desenvolvimento ou persistência da fibropapilomatose. Muitos contaminantes químicos são conhecidos por causarem supressão do sistema imunológico (HERBST; KLEIN, 1995). No entanto, poucos são os trabalhos

comparando os níveis de contaminantes químicos nestes ambientes a outros onde a prevalência da GTFP seja menor. Assim, não existem maiores evidências de que estes sejam os agentes primários da doença (HERBST, 1994).

2.4 HEMATOLOGIA

Estudos sobre morfologia e citoquímica de células sangüíneas realizados com *Chelonia mydas* clinicamente normais, imaturas, em boa condição física e sem fibropapiloma no Havaí, indicaram cinco tipos de leucócitos: linfócitos, monócitos, heterófilos, basófilos e eosinófilos, além de trombócitos e eritrócitos. Assim como ocorre em muitos répteis terrestres e marinhos, os linfócitos foram os mais numerosos no sangue das tartarugas verdes (WORK et al., 1998).

As características morfológicas ultra-estruturais dos linfócitos encontrados em *Chelonia mydas* são núcleo com muita heterocromatina, citoplasma com muita mitocôndria, retículo endoplasmático e pequenos grânulos elétron-densos (WORK et al., 1998).

Os monócitos das tartarugas verdes se diferenciam citoquimicamente das outras células através da fosfatase ácida (ACP) e do ácido periódico de Schiff (PAS). Em microscopia óptica observa-se o núcleo corado por azul-púrpura como ocorreu nos linfócitos, o citoplasma contendo vacúolos de vários tamanhos não sendo observados grânulos azurofílicos. Através da microscopia eletrônica observam-se mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e pequenos grânulos densos (WORK et al., 1998).

Os heterófilos das tartarugas verdes foram identificados por alfa-naftil-butirato-esterase (NBE) e ácido periódico de Schiff (PAS). Os heterófilos de répteis e aves possuem um desenvolvimento análogo aos neutrófilos de mamíferos e são classificados dessa forma por apresentarem grânulos citoplasmáticos vermelhos.

Observações ultra-estruturais indicam a presença de poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático (WORK et al., 1998).

Os basófilos são raros em tartarugas verdes, talvez por causa da região geográfica na qual encontram-se, do clima ou da idade (WORK et al., 1998). Além disso, para tartarugas mantidas em cativeiro fatores como dieta alimentar, estado de saúde, atividade e estresse podem alterar a composição sangüínea, por exemplo alimentação a base de camarão implica em baixo valor de potássio no plasma (BOLTEN; BJORN DAL, 1992).

Os eosinófilos estão diretamente ligados às infecções parasitárias. Os eosinófilos são identificados citoquimicamente por cloroacetato-esterase (CAE). Foram classificados em dois tipos de acordo com o tamanho e forma do núcleo: um menor com núcleo denso e bem definido de coloração azul-púrpura e outro maior com núcleo amorfo também de coloração azul-púrpura, ambos com grânulos citoplasmáticos. Apresentam características morfológicas similares em microscopias óptica e eletrônica, sendo que retículo endoplasmático, mitocôndrias e complexo de Golgi são muito notáveis nos eosinófilos menores (WORK et al., 1998).

Os trombócitos, ao microscópio óptico, também se apresentam similares aos de outros répteis. No entanto, estudos posteriores não apontam a presença destas células em *Lepidochelys kempi*. Em *Chelonia mydas* há uma certa dificuldade em se diferenciar trombócitos de basófilos. Por outro lado, os trombócitos de outros répteis podem ser difíceis de serem distinguidos de linfócitos. Desta forma, os trombócitos são diferenciados dos linfócitos pela alfa-naftil-butirato-esterase (NBE) e ácido periódico Schiff (PAS) (WORK et al., 1998).

Os eritrócitos observados têm forma oval e núcleo de coloração azul-púrpura. Muitos eritrócitos apresentam pequenas inclusões citoplasmáticas amorfas próximas ao núcleo ou ao pólo da célula. Tais inclusões foram consideradas organelas em degeneração (WORK et al., 1998).

Estudos realizados com tartarugas verdes acometidas pela GTFP indicaram que estes animais possuíam diminuição no número de linfócitos, eosinófilos e basófilos, aumento de heterófilos e monócitos e hipoproteinemia (CRAY et al., 2001), observada também em estudos realizados por Norton et al. (1990).

Resultados similares foram obtidos por Work e Balazs (1999b) na região do Havaí, sendo observada uma diminuição progressiva de linfócitos e eosinófilos e aumento progressivo de heterófilos conforme o aumento da gravidade da doença; os basófilos apresentaram pouca variação e os monócitos foram encontrados em maior número nos animais mais acometidos pela GTFP. O aumento do número de monócitos pode ser atribuído pela inflamação crônica causada pela gravidade do tumor. A heterofilia e a linfopenia foram atribuídas pelo estresse e imunossupressão causados pela doença. Além disso, os animais acometidos podem apresentar anemia não-regenerativa que também pode ser causada pela infecção por hemoparasitas, observada nos animais analisados (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; WORK; BALAZS, 1999a).

2.5 IMUNOLOGIA

As tartarugas verdes parecem ser capazes de apresentar resposta humoral, sendo que estresse e nutrição são importantes efetores da resposta imunológica. A alteração da função imunológica pode representar o estágio final da doença (CRAY et al., 2001).

Os neutrófilos produzem certas espécies reativas do oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$), ânion superóxido (O_2^-) e oxigênio *singlet* (importantes oxidantes microbicidas, mediadores da inflamação e da lesão tecidual) durante o metabolismo de células aeróbicas ou como produto de secreção de fagócitos ativados, resultado de uma sequência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo (SILVA, 2003). Além dos neutrófilos, os macrófagos também exibem atividade de *burst* oxidativo como indicador da atividade bactericida e morte tóxica dependente de oxigênio pelos organismos patogênicos. Em carpas (*Cyprinus carpio*) os neutrófilos dos rins exibem uma atividade citotóxica espontânea envolvendo peróxido de hidrogênio que causa lise de células tumorais (PASTORET et al., 1998).

A citotoxicidade é o principal mecanismo de defesa dos vertebrados contra infecções virais e tumores. Tal mecanismo é mediado por leucócitos como *natural killer* (NK) em mamíferos ou células citotóxicas não específicas (NCC) em peixes teleósteos (CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 1999).

2.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo permite a análise e medida simultânea das características das células suspensas em um sistema de fluxo. Este sistema faz com que as células passem por uma fonte luminosa a laser, gerada pela excitação de um laser de argônio (as células são conduzidas através de um sistema contínuo de fluidos). Ao passarem por essa fonte luminosa, ocorre o registro da fluorescência das células por um leitor óptico. Um sistema eletrônico converte os sinais ópticos em sinais eletrônicos possibilitando a leitura por um computador. As análises são feitas célula por célula e justamente por esse motivo, a citometria tem sido amplamente utilizada nas pesquisas biológicas e médicas, como instrumento de diagnóstico sendo capaz de analisar, entre outros componentes, linfócitos, monócitos, granulócitos e macrófagos.

A análise de fagócitos é muito importante, pois a fagocitose e o *burst* oxidativo dos neutrófilos e macrófagos representa uma sequência de eventos para a morte intracelular de bactérias. A citometria de fluxo representa grande vantagem em relação às técnicas anteriormente utilizadas para a avaliação da capacidade fagocítica, pois é possível discriminar as populações celulares com maior velocidade e menor quantidade de células. Além disso, concomitantemente à fagocitose é possível medir-se o *burst* oxidativo gerado por estímulos solúveis, bactérias ou fungos. Através da citometria de fluxo o *burst* oxidativo pode ser monitorado quantitativamente (SILVA, 2003). O PMA (miristato-acetato de forbol), considerado um bom indicador do metabolismo celular e atividade bactericida (STOSIK et al., 2002), e o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (SAPI) estimulam os

leucócitos polimorfonucleares a formarem e liberarem peróxido de hidrogênio em taxas correlacionadas àquelas associadas com a fagocitose. A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerada um parâmetro de avaliação da ativação de fagócitos (SILVA, 2003).

3 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram determinados conforme a hipótese inicial: Os animais acometidos pela fibropapilomatose apresentam condições hematológicas diferentes dos que não são acometidos, além de apresentarem deficiência na função dos leucócitos sangüíneos.

3.1 GERAIS

- Avaliar as condições hematológicas através do hemograma completo de tartarugas marinhas com e sem fibropapilomas;
- Avaliar a função celular dos leucócitos sangüíneos de tartarugas marinhas com e sem fibropapilomas, por citometria de fluxo, através de provas de função celular como a fagocitose induzida por Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) Bio Particles[®], Alexa Fluor[®] 594 conjugate e *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) e o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por miristato-acetato de forbol (PMA).

3.2 ESPECÍFICOS

- Definir uma metodologia a fim de permitir a análise da função celular de leucócitos sangüíneos de tartarugas marinhas pela técnica da citometria de fluxo;
- Realizar possíveis comparações no perfil hematológico e função celular entre tartarugas com e sem fibropapilomas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANEJO, SELEÇÃO DAS TARTARUGAS E LOCAIS DE CAPTURA

As tartarugas verdes, *Chelonia mydas*, utilizadas no estudo foram capturadas em diversas praias da cidade de Ubatuba. O município de Ubatuba localiza-se no Litoral Norte do Estado de São Paulo (Latitude 45°, 26', 13", Latitude sul. Longitude 45°, 4', wgr). Essa região foi selecionada devido à presença constante de tartarugas verdes jovens que freqüentam a área costeira para alimentarem-se. Ocasionalmente algumas tartarugas foram provenientes de praias de outras regiões como Guarujá (SP) (Latitude: 24.02 S. Longitude: 46.25 W), São Sebastião (SP) (Latitude: 23.50 S. Longitude: 45.18 W), e Ilha Bela (SP) (Latitude: 23° 46. Longitude: 45° 21).

As tartarugas foram capturadas incidentalmente em redes de pesca ou resgatadas de encalhes de praia e entregues aos técnicos do Projeto Tamar-Ibama Base de Ubatuba/SP. Apenas um espécime foi apreendido pelo Ibama em cativeiro na cidade de Paraty (RJ) (Latitude: 23:13:04 S. Longitude: 44:42:47 W). Após a captura, os animais foram mantidos em cativeiro até estarem aptos para a soltura novamente. Os casos que exigiram a manutenção em cativeiro foram variados, como por exemplo: presença de fibropapilomas, distúrbios de flutuação, massa corpórea abaixo da média, presença de ectoparasitas ou demais indicações que impedissem a devolução imediata do animal ao habitat.

Para a obtenção das amostras sangüíneas e dos dados de biometria foi realizada apenas contenção física das tartarugas. O manejo foi realizado em sala específica na base do Projeto Tamar-Ibama com infra-estrutura adequada.

Foram estudadas tartarugas com e sem fibropapilomas.

4.2 BIOMETRIA

Foram coletados dados biométricos como massa corpórea, comprimento e largura da carapaça, comprimento e largura do plastrão de cada animal. Além disso, foram anotadas ausência ou presença dos fibropapilomas, além da quantidade, tamanho e localização dos mesmos. Para medir os fibropapilomas foi utilizado paquímetro manual e para os dados biométricos fita métrica e balança específica.

Todos esses dados foram anotados em fichas de campo individuais juntamente com demais informações, como data, local e forma de captura.

Não foi possível determinar o sexo das tartarugas estudadas, pois não apresentavam dimorfismo sexual externo.

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Foram coletadas amostras sangüíneas de 47 espécimes, sendo 29 com fibropapilomas e 18 não acometidas pela doença.

A punção venosa foi realizada no seio venoso cervical, tendo o osso occipital como referência para sua localização. Esta região foi selecionada após criteriosa avaliação (OWENS; RUIZ, 1980; SAMOUR et al., 1984; PAGE; MAUTINO, 1990; GOTTDENKER; JACOBSON, 1995). Um volume sangüíneo de aproximadamente 10 mL de cada animal foi colhido após assepsia do local com álcool iodado. Estudos revelam que se pode colher um volume de sangue das tartarugas marinhas entre 5,2% a 7,9% da massa corpórea do animal (MCARTHUR; WILKINSON; MEYER, 2004).

O sangue obtido foi colocado em tubos devidamente identificados contendo heparina sódica BD®, pois o EDTA causa hemólise em amostras sangüíneas

de quelônios (MCARTHUR; WILKINSON; MEYER, 2004). Os tubos permaneceram sob refrigeração até o processamento laboratorial na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Uma alíquota foi separada logo após a colheita, sem anticoagulante, para confecção de extensões sangüíneas. O tempo entre coleta e processamento não ultrapassou 24 horas.

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO

A avaliação do perfil hematológico foi realizada pelas seguintes análises:

4.4.1 Determinação do Volume Globular ou Hematócrito (Ht)

O volume globular consiste no volume de hemácias da amostra sangüínea, ou seja, é o volume ocupado pelas hemácias em determinada quantidade de sangue.

Cerca de dois terços de um tubo capilar foi preenchido com a amostra, sendo vedado com uma massa própria e colocado em uma centrífuga de microhematócrito. Após centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos foi realizada a leitura com o auxílio de um cartão de hematócrito.

4.4.2 Contagem Total de Células Vermelhas

Esse procedimento foi realizado em câmara de Neubauer. Foram colocados num tubo de ensaio 4 mL de diluente isotônico Natt e Herrick (1952) e 20

μL da amostra de sangue com heparina, utilizando-se pipeta automática própria. A solução foi homogeneizada e a câmara de Neubauer preenchida para a contagem, em microscópio óptico, num aumento de 400 vezes. O cálculo utilizado para obtenção do número de hemácias por milímetro cúbico foi realizado de acordo com a seguinte fórmula, levando-se em conta que a diluição utilizada foi 1:200:

n° de hemácias contadas $\times 200 \times 10 \times 5$,
sendo que 200 refere-se à diluição, 10 à altura da câmara e
5 à área contada.

4.4.3 Hemoglobina (Hb)

A concentração de hemoglobina sangüínea foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, que constitui uma forma de avaliação do transporte do oxigênio pelo organismo e também de seu aproveitamento pelos vários tecidos.

Para realizar a determinação da hemoglobina foi utilizado um kit comercial da empresa Labtest[®] reagentes.

Num tubo de ensaio foi adicionado 5 mL do reagente de cor preparado anteriormente e 20 μL da amostra de sangue com heparina com o auxílio de uma pipeta automática. A solução foi homogeneizada e centrifugada, com o intuito de provocar a lise das hemácias, retirando seus núcleos da mistura de sangue com o reagente de cianometahemoglobina. A fração utilizada para análise foi o sobrenadante, fornecendo assim, um valor mais apurado da concentração de hemoglobina.

As leituras foram realizadas no analisador LABQUEST, da empresa LABTEST[®] Diagnóstica Ltda, utilizando-se como branco água destilada. O analisador foi ajustado a 100% de transmissão, em 540 nm. Além da absorbância também foi fornecido pelo aparelho o valor de hemoglobina em g/dL.

4.4.4 VCM, HCM e CHCM (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média, respectivamente)

Esses valores foram calculados da seguinte maneira:

- Volume Corpuscular Médio: $VCM = Ht \times 10/He$.
- Hemoglobina Corpuscular Média: $HCM = Hb \times 10/He$.
- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média: $CHCM = Hb \times 100/Ht$.

4.4.5 Contagem total de Leucócitos

Foi realizada na câmara de Neubauer. O diluidor utilizado para contagem de leucócitos foi o mesmo utilizado para contagem de hemácias, ou seja, solução de Natt e Herrick (1952). A mesma câmara de Neubauer utilizada para contagem de hemácias foi também utilizada para a contagem de leucócitos, diferindo apenas quanto à área de contagem.

Assim, o cálculo para estabelecimento do número de leucócitos foi:

n° de leucócitos $\times 200 \times 10 \times \frac{1}{4}$,
 sendo 200 referente à diluição, 10 referente à altura da câmara
 e $\frac{1}{4}$ à área contada

4.4.6 Contagem diferencial de Leucócitos

Foi realizada por meio das extensões sangüíneas feitas no momento da colheita das amostras sangüíneas.

A coloração das extensões foi May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld (1947) com algumas modificações. Sobre as lâminas foi colocado 1 mL do

corante, deixando agir por 4 minutos. Decorrido este tempo foram adicionados 2 mL de água deionizada sobre a extensão (sem remover o corante), deixando agir por 14 minutos. Por fim as lâminas foram lavadas com água corrente e colocadas para secar em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em microscópio óptico na objetiva com aumento de 100X. Por meio dessa contagem, foram avaliadas as seguintes células: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Foi possível também avaliar a morfologia das hemácias.

4.4.7 Contagem de Trombócitos

Os répteis não possuem fragmentos citoplasmáticos como as plaquetas dos mamíferos, mas sim, trombócitos nucleados com participação na coagulação sangüínea. São geralmente encontrados agregados em extensões sangüíneas. A técnica que foi utilizada para contagem deste tipo celular foi realizada a partir da contagem do número de trombócitos em cada 1000 hemácias contadas. O cálculo final está demonstrado a seguir:

$$\frac{\text{nº de trombócitos} \times \text{He}}{1000}$$

4.4.8 Proteína Plasmática Total

Foi calculada após o cálculo do hematócrito, utilizando o plasma contido no tubo capilar. Este procedimento foi realizado quebrando-se cuidadosamente o capilar com a finalidade de separar o volume de hemácias e o de leucócitos do plasma, sendo este último colocado sobre a lâmina do refratômetro,

previamente calibrado com água destilada. A proteína plasmática foi lida na coluna da esquerda deste aparelho, sendo que o valor obtido possui a unidade g/dL.

4.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CELULAR

A avaliação da função celular de leucócitos sangüíneos foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACs Calibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems®, San José, CA, USA, acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple®. Os dados coletados foram analisados pelo software Cell Quest Pró (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

Para o desenvolvimento da metodologia adequada para a avaliação da função celular foram utilizadas amostras sangüíneas de 37 espécimes (21 com FP e 16 sem FP).

4.5.1 Preparação das amostras após a colheita do sangue

Logo após a colheita do sangue, o mesmo foi acondicionado em tubos, devidamente identificados, contendo heparina sódica. Foram realizados inúmeros testes para determinar a melhor maneira de se processar o sangue após a sua colheita. Sendo assim, foi determinado que após a obtenção do sangue 1 mL de cada amostra seria adicionado a tubos Falcon® contendo 3 mL de RPMI Gibco® para a manutenção da viabilidade celular. O transporte foi feito sob refrigeração até os laboratórios da USP para o processamento das amostras.

4.5.2 Obtenção de leucócitos para análise no citômetro

4.5.2.1 Obtenção através de gradiente de densidade com Ficoll-Paque™ Plus Amersham Biosciences®

Para obtenção dos leucócitos pelo método de separação por gradiente de densidade, utilizando Ficoll-Paque™ Plus, foram utilizadas duas densidades desse reagente previamente preparadas: 1,070 g/mL e 1,055 g/mL. Os experimentos com Ficoll-Paque™ Plus foram realizados com amostras sangüíneas de 34 espécimes (21 com FP e 13 sem FP).

Num tubo de ensaio Falcon® de 15 mL foram colocados 4 mL de Ficoll-Paque™ Plus na densidade 1,070 g/mL e logo em seguida foram adicionados 4 mL de Ficoll-Paque™ Plus na densidade 1,055 g/mL escorrendo pela parede do tubo inclinado.

Imediatamente após a adição da segunda densidade de Ficoll, foram adicionados lentamente 4 mL de sangue diluído no RPMI escorrendo pela parede do tubo inclinado. Foi realizada centrifugação, em centrífuga refrigerada Sanyo® modelo Harrier 18/80, durante 45 minutos a 450 x g numa temperatura de 18°C.

Após a centrifugação foi observado um anel e/ou aglomerados de leucócitos formados entre as duas densidades de Ficoll.

O anel e/ou os aglomerados de leucócitos foram removidos com o auxílio de pipeta Pasteur e colocados num tubo Falcon® de 15 mL contendo 10 mL de PBS 1x. Foi realizada centrifugação a fim de eliminar os resíduos de Ficoll que é nocivo às células. A centrifugação foi realizada na mesma centrífuga descrita anteriormente por 10 minutos, a 18°C, 300 x g.

O sobrenadante formado foi eliminado e ao *pellet* formado foram adicionados 10 mL de PBS e uma nova centrifugação, como descrita no parágrafo anterior, foi realizada para potencializar a remoção do Ficoll das amostras.

O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* resultante foi adicionado 1 mL de PBS. Esse *pellet* agrupa os leucócitos que serão posteriormente submetidos aos estímulos para avaliação da fagocitose e *burst* oxidativo.

Foi realizada a contagem dos leucócitos viáveis em todo o retículo central da câmara de Neubauer, utilizando Azul de Tripan como indicador das células mortas (10 µL da amostra - 90 µL de Azul de Tripan). Para a realização dos estímulos é necessário que haja no mínimo 95% de viabilidade celular.

4.5.3 Preparação das amostras para avaliação da fagocitose e *burst* oxidativo

Após a determinação da porcentagem de viabilidade celular, as suspensões foram ajustadas a uma concentração de 4×10^6 leucócitos/mL de amostra. Para isso foi necessário calcular o volume de cada amostra de modo a conter essa concentração de células.

Foi organizada uma seqüência de tubos identificados com letras de “A” a “E” com o seguinte conteúdo:

- Tubo “A”: suspensão de leucócitos em PBS (Controle).
- Tubo “B”: leucócitos + DCFH (Avaliação do metabolismo basal).
- Tubo “C”: leucócitos + DCFH + PMA (Estímulo químico para avaliação do *burst* oxidativo).
- Tubo “D”: leucócitos + DCFH + Zymosan (Estímulo biológico para avaliação do *burst* oxidativo).
- Tubo “E”: leucócitos + Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae* Bio Particles®, Alexa Fluor® 594 conjugate) ou leucócitos + SAPI (*Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo) para avaliação da fagocitose.

Feita a organização dos tubos, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 50 minutos, sendo que a cada 10 minutos foi necessária agitação manual dos tubos.

Após a incubação, os estímulos foram interrompidos com 2 mL de EDTA 3 mM gelado em cada tubo. Foi realizada centrifugação por 8 minutos, a 18°C, 300 x g.

O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 500 µL de PBS 1x em cada tubo. Por fim, foi realizada a aquisição no citômetro.

Cada amostra foi adquirida uma única vez no citômetro.

4.5.4 Determinação das populações celulares por citometria de fluxo

Foi necessária a realização de um *sorting* para determinação das populações de leucócitos analisadas no citômetro.

A preparação das amostras após a colheita do sangue foi a mesma descrita no item 4.5.1.

4.5.4.1 Obtenção dos leucócitos

Os leucócitos foram obtidos pelo método de separação por gradiente de densidade, utilizando Ficoll-Paque™ Plus®. Foram utilizadas duas densidades desse reagente: 1,070 g/mL e 1,055 g/mL.

Num tubo de ensaio Falcon® de 15 mL foram colocados 4 mL de Ficoll 1,070 g/mL e logo em seguida foram adicionados 4 mL de Ficoll 1,055 g/mL escorrendo pela parede do tubo inclinado.

Imediatamente após a adição da segunda densidade de Ficoll, foram adicionados lentamente os 4 mL de sangue diluído no RPMI escorrendo pela parede

do tubo inclinado. Foi realizada centrifugação, em centrífuga refrigerada Sanyo[®] modelo Harrier 18/80, durante 45 minutos a 450 x g numa temperatura de 18°C.

Após a centrifugação foi observado um anel e/ou aglomerados de leucócitos formados entre as duas densidades de Ficoll.

O anel e/ou os aglomerados de leucócitos foram removidos com o auxílio de pipeta Pasteur e colocados num tubo Falcon[®] de 15 mL contendo 10 mL de PBS 1x. Foi realizada centrifugação a fim de eliminar os resíduos de Ficoll que é nocivo às células. A centrifugação foi realizada na mesma centrífuga descrita anteriormente por 10 minutos, a 18°C, 300 x g.

O sobrenadante formado foi eliminado e ao *pellet* formado foram adicionados 10 mL de PBS e uma nova centrifugação, como descrita no parágrafo anterior, foi realizada para potencializar a remoção do Ficoll das amostras.

O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* resultante foi adicionado 1 mL de PBS 1x estéril enriquecido com 1% de soro bovino fetal (SFB).

Foi realizada a contagem das células viáveis em todo o retículo central da câmara de Neubauer (10 µL da amostra - 90 µL de Trypan Blue). A suspensão de células foi passada em agulha 23G (25x6) para eliminar partículas que pudessem impedir o sistema de fluxo no citômetro.

Foi calculado o volume de cada amostra de modo que houvesse 3×10^6 leucócitos/mL.

As células foram mantidas em PBS 1x estéril enriquecido com 1% de SFB durante toda aquisição no citômetro para manter a viabilidade das células.

4.5.4.2 Aquisição no citômetro

Foi utilizado citômetro modelo FACs Vantage Becton Dickinson Immunocytometry Systems[®], San José, CA, USA, acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple[®]. As suspensões foram recolhidas em tubos de ensaio contendo 1000 µL de meio RPMI 1640.

De algumas amostras foi possível obter mais de um tubo contendo a concentração de 3×10^6 células/mL.

Foram determinadas e separadas em tubos individuais 3 populações de células denominadas **R1**, **R2** e **R3**. A tabela 1 demonstra as amostras submetidas ao *sorting* e o número de células obtidas na separação de acordo com a região.

Tabela 1 – Número de células obtidas de cada região após a separação pelo citômetro

Região ou Gate	T35	T35 + T47	T47	T19	T20	T21
R1	415.000	-----	400.000	312.960	196.000	225.622
R2	4.695	13.528	-----	14.382	8.132	11.345
R3	508.000	175.563	-----	179.533	514.814	74.574

T19, T20 e T21: tartarugas com fibropapilomas.

Para obtenção de um número razoável de células para a confecção das lâminas, foi feita a somatória de R1 de cada amostra num único tubo, R2 em outro e R3 em outro. As lâminas foram confeccionadas em centrífuga citológica Fanem® modelo 248 e coradas pela técnica de Rosenfeld.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise dos resultados do perfil hematológico foi aplicado o 2 *Sample t* para os valores que apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) assumindo igual variância e Man-Whitney para os valores não paramétricos ($p < 0,05$).

Para analisar o perfil hematológico de acordo com o grau de acometimento pela fibropapilomatose e de acordo com os escores para tamanho dos fibropapilomas, foi utilizada análise ANOVA *one-way* (teste paramétrico) e Kruskal-Wallis (não paramétrico).

Para a análise da função celular foi utilizado o programa Instat® para Windows® utilizando o *Test t*.

5 RESULTADOS

5.1 TARTARUGAS, LOCAIS E FORMAS DE CAPTURA

As tartarugas foram capturadas em diversos locais no litoral do estado de São Paulo. As formas de captura foram variadas, de acordo com a praia e o dia da captura. Os locais e formas de captura estão no quadro 1. As figuras 5 e 6 demonstram duas praias em Ubatuba/SP, nas quais ocorreram capturas de tartarugas verdes.

(Continua)

Tartarugas	Locais de captura	Formas de captura
T1	Praia Almada	Rede de espera
T2	Praia Almada	Rede de espera
T3	...	...
T4	...	...
T5	...	...
T6	Praia Flamengo	Rede de tróia
T7	...	...
T8	Praia Almada	Rede de espera
T9	Praia Ubatumirim	Rede de espera
T10	Praia Itaguá	Rede de arrasto de praia
T11	Praia Camburi	Cerco flutuante
T12	São Sebastião	Encontrada boiando
T13	Ilha Bela – Praia do Pinto	Encalhe de praia
T14	Paraty	Apreendida pelo IBAMA em cativeiro
T15	Praia Almada	Rede de espera
T16	Praia da Enseada	Encalhe de praia
T17	Praia Perequê-Açu	Captura intencional por mergulho livre
T18	Praia Camburi	Cerco flutuante
T19	Praia Almada	Rede de espera de fundo
T20	Praia Almada	Rede de espera de superfície
T21	Praia Bonete	Cerco flutuante
T22	Praia Bonete	Cerco flutuante
T23	Praia Almada	Rede de espera

(Continua)

(Conclusão)		
Tartarugas	Locais de captura	Formas de captura
T24	Praia Lagoinha	Rede de emalhe de superfície
T25	Saco da Ribeira	Capturada flutuando
T26	Praia Camburi	Rede de emalhe de superfície
T27	Praia do Cedro	Cerco flutuante
T28	Praia do Cedro	Cerco flutuante
T29	Praia Perequê-Açu	Capturada por anzol
T30	Praia do Lázaro	Rede de espera
T31	Praia do Lázaro	...
T32	Guarujá	...
	Parque Estadual Ilha	
T33	Anchieta (PEIA) – Praia do Leste	Cerco flutuante
T34	Praia Almada	Rede de espera
T35	Praia Bonete	Cerco flutuante
T36	Praia Bonete	Cerco flutuante
T37	Praia Bonete	Cerco flutuante
T38	Praia Bonete	...
T39	Saco da Ribeira	Rede de emalhe
T40	PEIA – Praia do Sul	Cerco flutuante
T41	Praia Itaguá	Rede de emalhe de superfície
T42	Praia do Cedro	...
T43	Praia Lagoinha	Rede de emalhe de superfície
T44	Praia do Cedro	Rede de emalhe
T45	Praia Bonete	Cerco flutuante
T46	Praia Bonete	Cerco flutuante
T47	Guarujá	...

...: Dado não disponível

Quadro 1 – Locais e formas de captura das tartarugas verdes provenientes do litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Figura 5 – Praia Camburi em Ubatuba/SP

Figura 6 – Praia Almada em Ubatuba/SP

5.2 BIOMETRIA

Foram anotados dados de comprimento e largura da carapaça e do plastrão e massa corpórea das tartarugas capturadas. Os animais foram divididos em dois grupos conforme a presença ou ausência de fibropapilomas.

5.2.1 Biometria das tartarugas sem fibropapilomas

As tartarugas sem fibropapilomas foram agrupadas na tabela 2, na qual encontram-se seus dados de biometria.

Tabela 2 – Biometria e massa corpórea das tartarugas verdes sem fibropapilomas, capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tartarugas	CCC (cm)	LCC (cm)	CCP (cm)	LCP (cm)	MC (Kg)
T3	34,2	31,0	29,3	25,3	4,0
T4	36,2	33,0	29,5	28,3	6,0
T5	42,0	37,0	32,5	30,5	7,0
T12	43,0	38,0	31,5	33,5	10,0
T13	35,5	31,0	27,0	24,5	5,0
T17	36,5	33,5	28,5	23,5	5,0
T25	38,0	34,0	30,0	26,0	4,0
T26	52,0	50,0	28,0	26,7	17,0
T27	32,3	29,2	28,5	26,0	4,5
T28	34,5	31,0	26,8	24,5	5,5
T32	34,0	30,5	27,5	24,0	4,0
T33	37,5	34,0	31,5	27,8	6,0
T35	35,5	32,0	27,0	25,2	5,0
T36	43,5	40,0	34,2	32,3	10,0
T37	41,0	38,0	32,5	30,0	8,5
T38	35,7	33,0	28,5	25,5	6,0
T44	37,0	34,0	...	...	5,0
T47	35,0	34,0	30,0	26,0	5,0
Média	37,967	34,622	29,576	27,035	6,528
Desvio padrão	4,758	4,818	2,202	2,949	3,206

...: Dado não disponível

5.2.2 Biometria das tartarugas com fibropapilomas

A tabela 3 contém os dados de biometria das tartarugas com fibropapilomas.

Tabela 3 – Biometria e massa corpórea das tartarugas verdes com fibropapilomas, capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tartarugas	CCC (cm)	LCC (cm)	CCP (cm)	LCP (cm)	MC (Kg)
T1	30,5	28,5	24,5	23,5	3,0
T2	39,0	35,0	25,8	25,8	5,5
T6	38,0	35,5	29,8	26,5*	7,0
T7	41,5	37,5	34,7	29,9	5,0
T8	39,2	36,0	32,5	29,0	7,5
T9	42,5	39,0	34,5	30,2	9,5
T10	42,0	37,0	33,5	31,5	7,0
T11	56,0	52,5	44,5	40,0	17,0
T14	34,0	30,0	28,0	23,5	3,5
T15	39,5	37,0	33,0	30,5	8,0
T16	44,0	41,0	34,0	31,0	7,0
T18	68,5	63,0	55,0	46,5	35,0
T19	42,5	36,5	46,0	41,5	8,5
T20	41,0	36,0	34,5	30,5	7,5
T21	58,0	53,0	46,5	42,5	23,0
T22	57,0	50,0	46,5	40,0	16,0
T23	40,5	38,0	32,5	28,5	8,0
T24	39,5	35,0	32,0	29,5	8,0
T29	36,5	33,0	30,5	25,9	6,5
T30	49,5	45,0	38,5	35,0	13,0
T31	47,0	44,5	39,0	34,5	13,5
T34	39,5	36,0	31,5	28,5	7,0
T39	33,5	31,0	26,0	22,2	4,0
T40	64,5	61,5	52,2	44,5	30,0
T41	39,5	34,5	~32,0*	28,3	7,0
T42	49,0	45,5	38,5	34,5	13,0
T43	47,0	42,0	36,0	32,0	10,0
T45	56,0	50,0	44,0	38,5	20,0
T46	35,0	31,0	28,0	26,0	5,0
Média	44,490	40,500	36,143	32,279	10,862
Desvio padrão	9,393	8,910	7,982	6,599	7,722

* Comprimento aproximado devido à presença de FP dificultando a mensuração.

5.3 FIBROPAPILOMAS

As formações observadas apresentaram variação quanto ao aspecto, à coloração, à localização, ao tamanho e à quantidade. Com relação à coloração, foi observada uma variação de esbranquiçada à enegrecida, passando por tons de rosa claro, rosa escuro e cinza. Algumas das formações, devido à vascularização intensa de seu estroma e de traumas sofridos pelos animais, apresentaram-se ulceradas e com hemorragias (Figura 7). Alguns animais apresentam-se extremamente debilitados e não conseguem sobreviver (Figura 8).

Com relação à localização, as formações distribuíram-se pelas nadadeiras anteriores e posteriores, cabeça, regiões cervical, inguinal, axilar e pericloacal, nas pálpebras, córnea e entre os escudos córneos. A maior parte dos tumores foi encontrada na região das nadadeiras anteriores seguida pela região das nadadeiras posteriores.

Foram determinados escores para quantidade e tamanho dos fibropapilomas. Foram determinados 8 escores para a quantidade (Tabela 4) e oito para tamanho (Tabela 5).

Tabela 4 - Escores da quantidade dos fibropapilomas

Escore	Quantidade
1	1 – 20
2	21 – 40
3	41 – 60
4	61 – 80
5	81 – 100
6	101 – 120
7	120 – 140
8	Acima de 140

Tabela 5 - Escores do tamanho dos fibropapilomas

Escore	Tamanho
1	FP $\leq$ 1 cm
2	1 cm < FP $\leq$ 5 cm
3	5 cm < FP $\leq$ 10 cm
4	10 cm < FP $\leq$ 15 cm
5	15 cm < FP $\leq$ 20 cm
6	20 cm < FP $\leq$ 25 cm
7	25 cm < FP $\leq$ 30 cm
8	FP > 30 cm

Das vinte e sete tartarugas que tiveram seus tumores quantificados e mensurados, cerca de 33,33% foram incluídas no escore 1 e 29,63% no escore 2 (Tabela 6). A quantidade de tumores/tartaruga variou de 4 a 129 tumores, numa média de 43,96 (Tabela 7). Não foi possível determinar o número e conseqüentemente o tamanho dos fibropapilomas das tartarugas T7 e T8.

Quanto ao tamanho, foram catalogados tumores classificados nos quatro primeiros escores: 1, 2, 3 e 4, compreendidos entre 0,2 cm e 13,0 cm de diâmetro.

Foram obtidas medidas de largura e comprimento de cada tumor, que ao serem multiplicadas resultaram na área do fibropapiloma em cm². Somando todas as áreas dos tumores existentes em cada tartaruga, obteve-se a área total de fibropapiloma por animal (Tabela 8).

Tabela 6 - Número de tartarugas verdes por escore da quantidade de tumores

Escore	Número de tartarugas
1	9 (33,33%)
2	8 (29,63%)
3	1 (3,70%)
4	4 (14,81%)
5	3 (11,11%)
6	1 (3,70%)
7	1 (3,70%)
8	-

-: Valor numérico nulo

Tabela 7 – Quantidade e escores do tamanho dos fibropapilomas encontrados nas tartarugas verdes capturadas no litoral do Estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tartarugas	Nº de FP	Escore			
		(1) ≤ 1 cm	(2) $1 \text{ cm} < \text{FP} \leq 5 \text{ cm}$	(3) $5 \text{ cm} < \text{FP} \leq 10 \text{ cm}$	(4) $10 \text{ cm} < \text{FP} \leq 15 \text{ cm}$
T1	12	10	2	-	-
T2	63	15	45	3	-
T6	84	32	50	1	1
T7	...	...	...	...	...
T8	...	...	...	...	...
T9	23	5	15	3	-
T10	16	8	8	-	-
T11	85	82	3	-	-
T14	5	4	1	-	-
T15	33	6	24	3	-
T16	66	9	56	1	-
T18	13	-	13	-	-
T19	38	5	32	1	-
T20	39	7	30	2	-
T21	106	60	44	2	-
T22	34	13	19	2	-
T23	30	10	20	-	-
T24	16	3	13	-	-
T29	4	3	1	-	-
T30	37	4	33	-	-
T31	17	9	8	-	-
T34	10	1	9	-	-
T39	57	16	40	-	1
T40	129	101	28	-	-
T41	36	16	20	-	-
T42	84	24	60	-	-
T43	70	19	48	2	1
T45	2	1	-	1	-
T46	78	43	35	-	-
Média	43,96	19,85	24,88	1,91	1
Desvio padrão	34,05	25,15	18,27	0,83	0

...: Dado não disponível

-: Valor numérico nulo

Tabela 8 – Área dos fibropapilomas de cada tartaruga verde

Tartarugas	Quantidade	Área (cm ²)
T1	12	2,90
T2	63	181,82
T6	84	146,53
T9	23	222,13
T10	16	16,75
T11	85	17,99
T14	5	1,72
T15	33	131,76
T16	66	207,54
T18	13	49,30
T19	38	120,46
T20	39	135,01
T21	106	113,23
T22	34	105,27
T23	30	81,68
T24	16	28,51
T29	4	0,93
T30	37	98,31
T31	17	24,19
T34	10	21,83
T39	57	113,73
T40	129	62,63
T41	36	64,96
T42	84	117,09
T43	70	239,10
T45	2	13,08
T46	78	51,99

Figura 7 – Fibropapilomas encontrados nas tartarugas verdes capturadas no litoral do estado de São Paulo/SP, ago 2005 – nov 2006

Figura 8 - Tartaruga extremamente debilitada acometida pela fibropapilomatose

5.4 HEMATOLOGIA

Foi realizado hemograma completo, leucograma e contagem de trombócitos para avaliar o perfil hematológico das tartarugas.

As análises foram realizadas de acordo com a presença ou ausência de fibropapilomas e para isso os animais foram divididos em dois grupos.

5.4.1 Hemograma

Foi avaliado pelos seguintes parâmetros: hematócrito; contagem total de eritrócitos e leucócitos; dosagem de hemoglobina; cálculo de VCM, HCM e CHCM e dosagem de proteína plasmática.

5.4.1.1 Hemograma das tartarugas sem fibropapilomas

A tabela 9 contém os dados referentes ao hemograma das tartarugas sem fibropapilomas.

Tabela 9 - Hemograma das tartarugas verdes sem fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tart	Data da colheita	Ht (%)	Eritr (10 ⁵ /mm ³)	Leu (/mm ³)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Prot. Pl. (g/dL)
T3	22/08/05	17	3,60	9500	4,80	47,22	13,33	28,24	3,40
T4	22/08/05	35	2,20	3500	10,40	159,09	47,27	29,71	5,20
T5	23/08/05	10	2,50	4000	3,50	40,00	14,00	35,00	2,00
T12	31/10/05	27	7,40	8000	8,20	36,49	11,08	30,37	6,00
T13	31/10/05	34	4,10	2500	9,60	82,93	23,41	28,24	3,70
T17	13/02/06	23	2,10	2000	5,80	109,52	27,62	25,22	3,40
T25	25/05/06	18	2,60	4000	5,60	69,23	21,54	31,11	3,60
T26	25/05/06	29	6,20	10000	11,60	46,77	18,71	40,00	6,00
T27	25/05/06	27	5,60	5500	9,10	48,21	16,25	33,70	5,00
T28	25/05/06	36	5,30	1500	8,80	67,92	16,60	24,44	4,00
T32	22/06/06	15	2,30	4500	4,50	65,22	19,57	30,00	3,00
T33	22/06/06	34	2,70	2000	10,10	125,93	37,41	29,71	6,40
T35	21/07/06	29	3,00	14500	7,90	96,67	26,33	27,24	5,30
T36	21/07/06	32	4,20	12500	10,10	76,19	24,05	31,56	5,00
T37	21/07/06	38	5,70	11500	11,10	66,67	19,47	29,21	5,00
T38	21/07/06	35	2,10	5000	10,50	166,67	50,00	30,00	5,20
T44	03/10/06	32	3,90	7500	8,20	82,05	21,03	25,63	6,20
T47	07/11/06	27	4,80	6000	6,90	56,25	14,38	25,56	5,00
Média		27,67	3,91	6588	8,15	80,16	23,45	29,72	4,63
Desvio padrão		8,07	1,62	3870	2,45	38,32	11,07	3,82	1,24

5.4.1.2 Hemograma das tartarugas com fibropapilomas

A tabela 10 contém os dados referentes ao hemograma das tartarugas com fibropapilomas.

Tabela 10 - Hemograma das tartarugas verdes com fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tart	Data da colheita	Ht (%)	Eritr (10 ⁵ /mm ³)	Leu (/mm ³)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Prot. Pl. (g/dL)
T1	22/08/05	27	4,30	7000	7,10	62,79	16,51	26,30	5,00
T2	22/08/05	17	2,70	12500	3,80	62,96	14,07	22,35	5,20
T6	23/08/05	25	5,40	5500	7,50	46,30	13,89	30,00	3,60
T7	23/08/05	30	7,90	3000	9,60	37,97	12,15	32,00	6,20
T8	23/08/05	22	4,60	9500	6,90	47,83	15,00	31,36	5,40
T9	23/08/05	18	2,70	9000	5,50	66,67	20,37	30,56	5,40
T10	30/10/05	30	4,80	6000	8,60	62,50	17,92	28,67	5,00
T11	31/10/05	28	4,60	1000	8,30	60,87	18,04	29,64	4,00
T14	13/02/06	33	5,00	3500	9,10	66,00	18,20	27,58	5,00
T15	13/02/06	25	4,10	5000	6,80	60,98	16,59	27,20	4,60
T16	13/02/06	5	8,00	1000	1,60	6,25	2,00	32,00	2,80
T18	13/02/06	29	3,00	5500	8,90	96,67	29,67	30,69	6,00
T19	29/03/06	23	2,40	2000	6,60	95,83	27,50	28,70	5,20
T20	29/03/06	30	4,50	5000	8,20	66,67	18,22	27,33	4,90
T21	26/04/06	34	5,90	12000	9,10	57,63	15,42	26,76	6,00
T22	26/04/06	28	7,90	6500	7,20	35,44	9,11	25,71	5,40
T23	25/05/06	25	5,30	3000	7,10	47,17	13,40	28,40	5,80
T24	25/05/06	20	4,50	3000	5,20	44,44	11,56	26,00	5,20
T29	22/06/06	22	3,00	6500	6,30	73,33	21,00	28,64	5,00
T30	22/06/06	17	2,60	9500	4,70	65,38	18,08	27,65	5,10
T31	21/07/06	11	1,90	9500	2,80	57,89	14,74	25,45	4,80
T34	21/07/06	24	3,50	2000	6,80	68,57	19,43	28,33	6,40
T39	05/09/06	24	4,00	15500	10,10	60,00	25,25	42,08	4,40
T40	05/09/06	44	7,00	3000	11,60	62,86	16,57	26,36	7,30
T41	05/09/06	18	3,70	5000	5,00	48,65	13,51	27,78	5,80
T42	03/10/06	28	2,70	4000	6,30	103,70	23,33	22,50	6,40
T43	03/10/06	16	1,80	7500	4,30	88,89	23,89	26,88	4,60
T45	07/11/06	22	3,40	9000	6,30	64,71	18,53	28,64	5,60
T46	07/11/06	30	6,60	13000	8,30	45,45	12,58	27,67	4,20
Média		24,31	4,41	6379	6,88	60,84	17,12	28,39	5,18
Desvio padrão		7,56	1,78	3784	2,22	19,71	5,62	3,52	0,91

5.4.2 Leucograma

Os valores relativos do leucograma das tartarugas foram obtidos por meio de contagem no microscópio óptico em objetiva de 100x. Foram encontrados os seguintes leucócitos: heterófilos (Figura 9), eosinófilos (Figura 10), linfócitos (Figura 9) e monócitos (Figura 11).

5.4.2.1 Leucograma das tartarugas sem fibropapilomas (valor relativo)

A tabela 11 contém os dados das tartarugas sem fibropapilomas.

Tabela 11 - Leucograma das tartarugas verdes sem fibropapilomas (valor relativo - %) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tart	Data da colheita	Het (%)	Eos (%)	Bas (%)	Mon (%)	Lin (%)
T3	22/08/05	85	1	-	3	11
T4	22/08/05	96	-	-	4	-
T5	23/08/05	74	4	-	6	16
T12	31/10/05	75	3	-	7	15
T13	31/10/05	71	8	-	18	3
T17	13/02/06	37	4	-	2	57
T25	25/05/06	65	7	-	15	13
T26	25/05/06	86	-	-	5	9
T27	25/05/06	90	4	-	3	3
T28	25/05/06	75	7	-	5	13
T32	22/06/06	73	7	-	4	16
T33	22/06/06	90	-	-	2	8
T35	21/07/06	86	1	-	1	12
T36	21/07/06	85	-	-	4	11
T37	21/07/06	78	-	-	14	8
T38	21/07/06	70	1	-	2	27
T44	03/10/06	83	-	-	4	13
T47	07/11/06	80	-	-	14	6
Média		77,72	2,61	-	6,28	13,39
Desvio padrão		13,03	2,95	-	5,21	12,47

-. Valor numérico nulo

5.4.2.2 Leucograma das tartarugas com fibropapilomas (valor relativo)

Os valores relativos do leucograma das tartarugas com fibropapilomas estão na tabela 12. Não foi possível realizar a contagem da T16, pois havia poucos leucócitos na extensão sangüínea.

Tabela 12 - Leucograma das tartarugas verdes com fibropapilomas (valor relativo - %) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 - nov 2006

Tart	Data da colheita	Het (%)	Eos (%)	Bas (%)	Mon (%)	Lin (%)
T1	22/08/05	73	2	-	13	12
T2	22/08/05	85	3	-	1	11
T6	23/08/05	80	2	-	4	14
T7	23/08/05	77	-	-	17	6
T8	23/08/05	87	8	-	4	1
T9	23/08/05	84	10	-	3	3
T10	30/10/06	92	-	-	5	3
T11	31/10/06	74	1	-	22	3
T14	13/02/06	59	1	-	15	25
T15	13/02/06	65	4	-	12	19
T16	13/02/06	...	...	...	...	...
T18	13/02/06	90	-	-	6	4
T19	29/03/05	53	22	-	8	17
T20	29/03/05	55	1	-	21	23
T21	26/04/06	75	1	-	7	17
T22	26/04/06	86	2	-	5	7
T23	25/05/06	57	3	-	16	24
T24	25/05/06	53	19	-	6	22
T29	22/06/06	69	-	-	3	28
T30	22/06/06	74	6	-	1	19
T31	21/07/06	69	2	-	4	25
T34	21/07/06	82	2	-	7	9
T39	05/09/06	88	2	-	3	7
T40	05/09/06	49	-	-	9	42
T41	05/09/06	71	3	-	0	26
T42	03/10/03	77	1	-	9	13
T43	03/10/06	86	4	-	2	8
T45	07/11/06	83	-	-	6	11
T46	07/11/06	60	3	-	14	23
Média		73,32	3,61	-	7,96	15,07
Desvio padrão		12,71	5,30	-	6,06	9,82

-. Valor numérico nulo

...: Dado não disponível

5.4.2.3 Leucograma das tartarugas sem fibropapilomas (valor absoluto)

Os valores absolutos do leucograma das tartarugas sem fibropapilomas (Tabela 13), foram obtidos por meio de contagem no microscópio óptico em objetiva de 100x e cálculo de acordo com o número total de leucócitos /mm³.

Tabela 13 - Leucograma das tartarugas verdes sem fibropapilomas - valor absoluto (/mm³) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 - nov 2006

Tart	Data da colheita	Het (/mm ³)	Eos (/mm ³)	Bas (/mm ³)	Mon (/mm ³)	Lin (/mm ³)
T3	22/08/05	8075	95	-	285	1045
T4	22/08/05	3360	-	-	140	-
T5	23/08/05	2960	160	-	240	640
T12	31/10/05	6000	240	-	560	1200
T13	31/10/05	1775	200	-	450	75
T17	13/02/06	740	80	-	40	1140
T25	25/05/06	2600	280	-	600	520
T26	25/05/06	8600	-	-	500	900
T27	25/05/06	4950	220	-	165	165
T28	25/05/06	1125	105	-	75	195
T32	22/06/06	3285	315	-	180	720
T33	22/06/06	2250	-	-	50	200
T35	21/07/06	12470	145	-	145	1740
T36	21/07/06	10625	-	-	500	1375
T37	21/07/06	8970	-	-	920	1610
T38	21/07/06	3500	50	-	100	1350
T44	03/10/06	6225	-	-	300	975
T47	07/11/06	4800	-	-	840	360
Média		5128,33	105,00	-	338,33	789,44
Desvio padrão		3402,37	108,67	-	267,50	550,18

-: Valor numérico nulo

5.4.2.4 Leucograma das tartarugas com fibropapilomas (valor absoluto)

Os valores absolutos do leucograma das tartarugas com fibropapilomas (Tabela 14), foram obtidos por meio de contagem no microscópio óptico em objetiva de 100x e cálculo de acordo com o número total de leucócitos/mm³. Não foi possível realizar a contagem da T16, pois havia poucos leucócitos na extensão sangüínea.

Tabela 14 - Leucograma das tartarugas verdes com fibropapilomas - valor absoluto (/mm³) capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 - nov 2006

Tart	Data da colheita	Het (/mm ³)	Eos (/mm ³)	Bas (/mm ³)	Mon (/mm ³)	Lin (/mm ³)
T1	22/08/05	5110	140	-	910	840
T2	22/08/05	10625	375	-	125	1375
T6	23/08/05	4400	110	-	220	770
T7	23/08/05	2310	-	-	510	180
T8	23/08/05	8265	760	-	380	95
T9	23/08/05	7560	900	-	270	270
T10	30/10/06	5520	-	-	300	180
T11	31/10/06	740	10	-	220	30
T14	13/02/06	2065	35	-	525	875
T15	13/02/06	3250	200	-	600	950
T16	13/02/06	...	...	...	...	...
T18	13/02/06	4950	-	-	330	220
T19	29/03/05	1060	440	-	160	340
T20	29/03/05	2750	50	-	1050	1150
T21	26/04/06	9000	120	-	840	2040
T22	26/04/06	5590	130	-	325	455
T23	25/05/06	1710	90	-	480	720
T24	25/05/06	1590	570	-	180	660
T29	22/06/06	4485	-	-	195	1820
T30	22/06/06	7030	570	-	95	1805
T31	21/07/06	6555	190	-	380	2375
T34	21/07/06	1640	40	-	140	180
T39	05/09/06	13640	310	-	465	1085
T40	05/09/06	1715	-	-	315	1470
T41	05/09/06	3550	150	-	-	1300
T42	03/10/03	3080	40	-	360	520
T43	03/10/06	6450	300	-	150	600
T45	07/11/06	7470	-	-	540	990
T46	07/11/06	7800	390	-	1820	2990
Média		4996,79	211,43	-	424,46	938,75
Desvio padrão		3169,96	246,07	-	369,81	744,39

-: Valor numérico nulo

...: Dado não disponível

5.4.3 Contagem de trombócitos

A contagem de trombócitos foi realizada observando-se as extensões sangüíneas. Alguns trombócitos apresentaram-se na forma arredondada (ativada) parecendo-se com os linfócitos e outros na forma oval. Muitas vezes estavam aglomerados e quando se encontravam desta forma, não foram quantificados.

5.4.3.1 Contagem de trombócitos das tartarugas sem fibropapilomas

A tabela 15 representa os valores relativos e absolutos de trombócitos das tartarugas sem fibropapilomas.

Tabela 15 - Contagem de trombócitos das tartarugas verdes sem fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tart.	Data da Coleta	Valor relativo (nº em 1000 He)	Valor absoluto (10 ³ /mm ³)
T3	22/08/05	23	8,28
T4	22/08/05	20	4,40
T5	23/08/05	51	12,75
T12	31/10/05	39	28,86
T13	31/10/05	66	27,06
T17	13/02/06	3	6,30
T25	25/05/06	53	13,78
T26	25/05/06	29	17,98
T27	25/05/06	54	30,24
T28	25/05/06	56	29,68
T32	22/06/06	44	10,12
T33	22/06/06	31	8,37
T35	21/07/06	32	9,60
T36	21/07/06	35	14,70
T37	21/07/06	27	15,39
T38	21/07/06	23	4,83
T44	03/10/06	39	15,21
T47	07/11/06	21	10,08
Média		35,89	14,87
Desvio padrão		15,90	8,60

5.4.3.2 Contagem de trombócitos das tartarugas com fibropapilomas

A tabela 16 representa os valores relativos e absolutos das tartarugas com fibropapilomas. Não foi possível determinar o número de trombócitos da T16.

Tabela 16 - Contagem de trombócitos das tartarugas verdes com fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006

Tart.	Data da Coleta	Valor relativo (nº em 1000 He)	Valor absoluto (10 ³ /mm ³)
T1	22/08/05	10	4,30
T2	22/08/05	58	15,66
T6	23/08/05	28	15,12
T7	23/08/05	35	27,65
T8	23/08/05	37	17,02
T9	23/08/05	56	15,12
T10	30/10/05	52	24,96
T11	31/10/05	29	13,34
T14	13/02/06	38	19,00
T15	13/02/06	33	13,53
T16	13/02/06	...	...
T18	13/02/06	24	7,20
T19	29/03/06	32	7,68
T20	29/03/06	38	17,10
T21	26/04/06	63	31,27
T22	26/04/06	41	32,39
T23	25/05/06	32	16,96
T24	25/05/06	44	19,80
T29	22/06/06	58	17,40
T30	22/06/06	64	16,64
T31	21/07/06	51	9,69
T34	21/07/06	39	13,65
T39	05/09/06	44	17,60
T40	05/09/06	39	27,30
T41	05/09/06	19	4,56
T42	03/10/06	49	13,23
T43	03/10/06	59	10,62
T45	07/11/06	5	1,70
T46	07/11/06	19	12,54
Média		39,14	15,82
Desvio Padrão		15,49	7,71

...:Dado não disponível

5.4.4 Hemograma e Leucograma das tartarugas com fibropapilomas relacionados aos escores de tamanho dos tumores

Foram determinados 8 escores para tamanho dos fibropapilomas (tabela 5). No entanto, os tumores dos animais estudados não ultrapassaram o tamanho de 13 cm, sendo classificados apenas nos escores de 1 a 4. Isso permitiu a análise do hemograma e do leucograma das tartarugas de acordo com o tamanho dos tumores (Tabela 17). As tartarugas que possuíam tumores classificados nos dois primeiros escores, foram incluídas apenas no escore 2; as que apresentavam tumores classificados nos escores 1, 2 e 3 foram incluídas apenas no escore 3; e por fim as que classificaram-se nos quatro escores foram incluídas no escore 4 apenas. Não houve animal incluído no escore 1. O animal identificado como T16, extremamente debilitado, não fez parte das estatísticas para contagem de trombócitos e diferencial de leucócitos, pois não foi possível analisar a extensão sangüínea deste animal (poucas células na lâmina). Os animais identificados como T7 e T8 não fizeram parte dessa análise, pois não foi possível determinar o número e tamanho de seus fibropapilomas.

Tabela 17 - Hemograma e Leucograma das tartarugas verdes com fibropapilomas, capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006, relacionados aos escores de tamanho dos tumores

Parâmetros	Escore		
	2 (n = 15)	3 (n = 9)*	4 (n = 3)
CCC (cm)	44,77 ± 11,07	46,61 ± 7,96	39,50 ± 6,87
Ht (%)	25,73 ± 7,79	22,44 ± 8,53	21,67 ± 4,93
Eritr (10 ⁵ /mm ³)	4,17 ± 1,46	4,62 ± 2,18	3,73 ± 1,81
Leu (/mm ³)	5466,67 ± 3242,94	6888,89 ± 4068	9500,00 ± 5291,50
Hb (g/dL)	7,07 ± 2,18	6,12 ± 2,27	7,30 ± 2,91
VCM (fL)	64,41 ± 17,01	57,46 ± 24,61	65,06 ± 21,74
HCM (pg)	17,64 ± 4,64	15,76 ± 7,16	21,01 ± 6,20
CHCM (g/dL)	27,44 ± 1,95	27,69 ± 2,79	32,99 ± 8,03
Prot. Pl. (g/dL)	5,40 ± 0,88	5,01 ± 0,92	4,20 ± 0,53
Het (/mm ³)	3836,00 ± 2262,89	5913,13 ± 3329,98	8163,33 ± 4852,43
Eos (/mm ³)	148,33 ± 200,48	276,88 ± 293,93	240,00 ± 112,69
Mon (/mm ³)	416,67 ± 444,16	488,75 ± 331,33	278,33 ± 165,40
Lin (/mm ³)	1065,67 ± 877,38	946,25 ± 596,39	818,33 ± 246,09
Tromb (10 ³ /mm ³)	14,71 ± 6,69	16,81 ± 10,55	14,45 ± 3,54

Os números em cada categoria correspondem à média e ao desvio padrão

* Para contagem de trombócitos e diferencial de leucócitos: escore 3 (n=8), pois o animal identificado como T16 não fez parte das estatísticas para esses parâmetros.

5.4.5 Hemograma e Leucograma das tartarugas com e sem fibropapilomas de acordo com o grau de acometimento pela doença

Os animais foram separados em quatro grupos conforme a ausência da fibropapilomatose (Grupo 0) e sua presença de acordo com o grau de acometimento (Grupos de 1 a 3).

O grau de acometimento da doença foi determinado calculando-se a área de tumores por tartaruga. Inicialmente foi determinada a área de cada tumor, multiplicando-se sua largura e seu comprimento. Depois foi feita a somatória de todos os valores obtidos (Tabela 8) obtendo-se a área de tumor por animal.

Os animais acometidos foram divididos em três grupos de acordo com o grau de acometimento: 1 (leve, para área até 50 cm²), 2 (moderado, para área entre 51 e 100 cm²) e 3 (grave, para área acima de 101 cm²) Pertencem ao grupo 1 os animais identificados como: T1, T10, T11, T14, T18, T24, T29, T31, T34 e T45; ao grupo 2 os animais: T23, T30, T40, T41 e T46; e ao grupo 3 os animais de números: T2, T6, T9, T15, T16, T19, T20, T21, T22, T39, T42 e T43. As tartarugas identificadas como T7 e T8 não foram incluídas em nenhum grupo porque não foi possível determinar a quantidade e conseqüentemente os tamanhos dos tumores. Não foi possível determinar o número de trombócitos e efetuar a contagem diferencial do animal cuja identificação é T16, pois havia poucas células na extensão sangüínea dificultando e impedindo sua análise. Os valores de hemograma e leucograma estão distribuídos na tabela 18.

Tabela 18 – Grupos de tartarugas verdes com e sem fibropapilomas capturadas no litoral do estado de São Paulo, ago 2005 – nov 2006, de acordo com a gravidade da doença

Parâmetros	0 (n = 18)	1 (n = 10)	2 (n = 5)	3 (n = 12)*
CCC (cm)	37,97 ± 4,76	44,95 ± 11,88	45,80 ± 11,70	44,25 ± 7,41
Ht (%)	27,67 ± 8,07	24,60 ± 6,29	26,80 ± 10,99	22,75 ± 7,76
Eritr (10 ⁵ /mm ³)	3,91 ± 1,62	3,80 ± 1,00	5,04 ± 1,88	4,34 ± 2,09
Leu (/mm ³)	6361,11 ± 3876,04	5300,00 ± 2869,40	6800,00 ± 4309,87	7125,00 ± 4390,72
Hb (g/dL)	8,15 ± 2,45	6,94 ± 1,95	7,34 ± 2,81	6,42 ± 2,36
VCM (fL)	80,16 ± 38,32	65,78 ± 13,26	53,90 ± 9,44	62,61 ± 26,51
HCM (pg)	23,45 ± 11,07	18,56 ± 4,70	14,83 ± 2,37	17,47 ± 7,29
CHCM (g/dL)	29,72 ± 3,82	27,99 ± 1,66	27,57 ± 0,74	28,51 ± 5,17
Prot pl (g/dL)	4,63 ± 1,23	5,20 ± 0,67	5,64 ± 1,14	4,88 ± 0,98
Het (/mm ³)	5128,33 ± 3402,37	4012,50 ± 2333,27	4361,00 ± 2899,88	6127,73 ± 3807,89
Eos (/mm ³)	105,00 ± 108,67	98,50 ± 178,42	240,00 ± 234,31	270,45 ± 247,63
Mon (/mm ³)	338,33 ± 267,50	372,00 ± 234,10	542,00 ± 738,62	415,00 ± 301,68
Lin (/mm ³)	789,44 ± 550,18	817,00 ± 765,88	1657,00 ± 842,49	868,64 ± 526,64
Tromb (10 ³ /mm ³)	14,87 ± 8,60	13,11 ± 7,40	15,60 ± 8,23	17,21 ± 7,77

Os números em cada categoria correspondem à média e ao desvio padrão.

* A T16, incluída no grupo 3, não fez parte das estatísticas para contagem de trombócitos e diferencial de leucócitos.

Figura 9 - Células encontradas no sangue de *Chelonia mydas*:: heterófilo (seta azul); linfócito (seta preta); trombócito (seta vermelha). Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100X

Figura 10 - Células encontradas no sangue de *Chelonia mydas*:: eosinófilo (seta preta); hemácia (seta vermelha). Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100X

Figura 11 - Monócito (centro) encontrado no sangue de *Chelonia mydas*::. Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100X

5.5 FUNÇÃO CELULAR

Foram realizadas provas de fagocitose e *burst* oxidativo basal e induzido para a avaliação da função celular. Além disso, foram confeccionadas lâminas para observação dos leucócitos obtidos com a utilização do Ficoll-Paque™ Plus e lâminas após os estímulos para a identificação e verificação da morfologia celular.

5.5.1 Leucócitos obtidos com a utilização do Ficoll-Paque™ Plus

Para determinação das células obtidas com a utilização do Ficoll-Paque™ Plus, foram confeccionadas lâminas em centrífuga citológica Fanem® modelo 248 com as amostras antes (Figura 12) e após serem submetidas ao estímulo (Figura 13).

As células foram posteriormente quantificadas em microscópio óptico em aumento de 1000X. No caso de algumas amostras não foi possível contar 100 leucócitos, devido à dificuldade de se encontrar células morfologicamente reconhecíveis (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 - Contagem diferencial de leucócitos de *Chelonia mydas* com fibropapilomas após separação pelo Ficoll-Paque™ Plus

Amostra	Monócitos	Linfócitos	Heterófilos	Eosinófilos	Total
T19	29	6	65	0	100
T20	32	15	13	0	60
T21	82	18	0	0	100
T31	48	14	10	28	100
T34	31	8	61	0	100
T39	84	6	10	0	100
T40	35	40	25	0	100
T41	35	1	19	0	55
Média	47	13,5	25,38	3,5	
Desvio Padrão	22,95	12,09	24,35	9,90	

Tabela 20 - Contagem diferencial de leucócitos de *Chelonia mydas* sem fibropapilomas após separação pelo Ficoll-Paque™ Plus

Amostra	Monócitos	Linfócitos	Heterófilos	Eosinófilos	Total
T35	10	5	85	0	100
T36	78	7	15	0	100
T37	84	3	13	0	100
T38	51	17	16	16	100
Média	55,75	8	32,25	4	
Desvio padrão	33,71	6,22	35,19	8

Figura 12 - Leucócitos obtidos pela utilização do Ficoll-Paque™ Plus®: eosinófilo (seta azul), heterófilo (seta vermelha), monócito (seta preta) e linfócito (seta verde). Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100X.

5.5.2 Fagocitose realizada por monócitos

A figura 13 demonstra monócitos que apresentavam Zymosan em seus citoplasmas.

Figura 13 - Monócitos fagocitando Zymosan. Seta: Zymosan livre e fagocitado pelo monócito. Coloração: May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld, objetiva 100X.

5.5.3 Populações celulares obtidas com a utilização do Ficoll-Paque™ Plus e separadas pelo citômetro FACS Vantage

A realização do *sorting* no citômetro FACS Vantage permitiu a determinação e confirmação das populações de células observadas e distribuídas no citograma SSC x FSC (Side Scatter Channel x Forward Scatter Channel), obtido pelo programa Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry Systems) versão para Macintosh®. Após a separação das populações em tubos de ensaio distintos, foram realizadas lâminas em centrífuga citológica que foram posteriormente coradas pela técnica de Rosenfeld e observadas em microscopia óptica (Tabela 21).

Tabela 21 - Populações celulares obtidas pelo *sorting* e confirmadas por microscopia óptica

Populações celulares	R1	R2	R3
Monócitos	12	3	52
Linfócitos	77	4	40
Heterófilos	-	10	6
Eosinófilos	-	1	-
Granulócitos não identificados	1	-	-
Trombócitos	10	-	2
Total	100	18	100

5.5.4 Células sangüíneas no citômetro de fluxo

A representação das células sangüíneas de *Chelonia mydas* no citômetro de fluxo pode ser observada nas figuras 14 e 15 que demonstram citogramas SSC x FSC (Side Scatter Channel x Forward Scatter Channel) obtido pelo programa Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry Systems) versão para Macintosh®.

Figura 14 - Citograma do sangue de *C. mydas* obtido após utilização do Ficoll-Paque™ Plus®, primeira calibração

Figura 15 - Citograma do sangue *C. mydas* obtido após utilização do Ficoll-Paque™ Plus®, segunda calibração

5.5.5 Populações celulares determinadas pelo *sorting*

As populações adquiridas foram identificadas como R1, R2 e R3, sendo que R1 continha 77% de linfócitos, R2 alguns granulócitos e R3 52% de monócitos

(Tabela 21). A figura 16 demonstra um citograma com as populações separadas pelo *sorting*.

Figura 16 – Populações de células do sangue de *C. mydas* obtidas com a utilização do Ficoll-Paque™ Plus

5.5.6 Fagocitose e *burst* oxidativo

Foi possível analisar as populações dos experimentos dos meses de julho e setembro do ano de 2006, pelo fato da metodologia estar bem definida. A fagocitose e o *burst* oxidativo foram avaliados pelos histogramas obtidos pelo programa Cell Quest Pro® e pelas análises estatísticas. As figuras 17 e 21 representam a intensidade de fluorescência de monócitos (de tartarugas com e sem fibropapilomatose respectivamente) não estimulados. A intensidade de fluorescência dos monócitos (das tartarugas com e sem fibropapilomatose respectivamente) que receberam o estímulo pelo Zymosan está representada nas figuras 18 e 22. A intensidade de *burst* oxidativo basal dos monócitos de tartarugas acometidas ou não pela doença está representada nas figuras 19 e 23. A intensidade de *burst* oxidativo induzido por PMA está representada nas figuras 20 e 24. Os resultados obtidos pelo *sorting* somados às análises da intensidade de fluorescência

das células, possibilitaram a confirmação de que os monócitos são as células responsáveis pelo *burst* oxidativo e pela fagocitose.

A utilização de SAPI demonstrou que este estímulo não se tornou eficaz para que as células realizassem fagocitose (Figuras 25 e 26), por outro lado o Zymosan se mostrou um bom estimulante para esta função celular (Figuras 18 e 22).

Nos histogramas representados pelas figuras 17 e 21, na escala logarítmica aleatória observa-se a intensidade de auto-fluorescência do monócito no intervalo de 10^0 a 10^1 . Quando estimulada pelo Zymosan (Figuras 18 e 22) a intensidade de fluorescência aumenta consideravelmente.

O metabolismo basal dos monócitos está representado nas figuras 19 e 23. Quando estas células foram estimuladas pelo PMA (para avaliação do *burst* oxidativo por um estímulo químico), observa-se nitidamente um aumento na intensidade de fluorescência (Figuras 20 e 24)

Figura 17 - Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de *C. mydas* com fibropapilomatose

Figura 18 - Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de *C. mydas*, com fibropapilomatose, estimulados pelo Zymosan

Figura 19 - Histograma representando a intensidade de *burst* oxidativo basal dos monócitos de *C. mydas*, com fibropapilomatose

Figura 20 - Histograma representando a intensidade de *burst* oxidativo induzido por PMA dos monócitos de *C. mydas*, com fibropapilomatose

Figura 21 - Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de *C. mydas* sem fibropapilomatose

Figura 22 - Histograma representando a intensidade de fluorescência de monócitos de *C. mydas*, sem fibropapilomatose, estimulados pelo Zymosan

Figura 23 - Histograma representando a intensidade de *burst* oxidativo basal dos monócitos de *C. mydas*, sem fibropapilomatose

Figura 24 - Histograma representando a intensidade de *burst* oxidativo induzido por PMA dos monócitos de *C. mydas*, sem fibropapilomatose

Figura 25 – Histograma representando a intensidade de fluorescência dos monócitos de *C. mydas*, com fibropapilomatose

Figura 26 – Histograma representando a intensidade de fluorescência dos monócitos de *C. mydas* com fibropapilomatose estimulados por SAPI

5.5.7 Intensidade de fluorescência

Foi obtida analisando as estatísticas e compondo gráficos pelo programa Prisma®. Nas figuras 27, 28 e 29 estão representadas as intensidades de fluorescência de acordo com os estímulos aplicados.

As análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa entre animais com e sem fibropapilomas para a avaliação da fagocitose e *burst* oxidativo (basal e induzido).

5.5.1 Intensidade de fagocitose da população de monócitos utilizando Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*) Bio Particles®, Alexa Fluor® 594 conjugate como estímulo

Figura 27 - Intensidade de fagocitose da população de monócitos do sangue de *C. mydas*

5.5.2 Intensidade de *burst* oxidativo basal da população de monócitos

Figura 28 - Intensidade de *burst* oxidativo basal da população de monócitos do sangue de *C. mydas*

5.5.3 Intensidade de *burst* oxidativo induzido por PMA da população de monócitos

Figura 29 - Intensidade de *burst* oxidativo induzido por PMA da população de monócitos do sangue de *C. mydas*

6 DISCUSSÃO

A determinação de escores para quantidade e tamanho dos fibropapilomas permitiu uma análise mais aprofundada do perfil hematológico e da função celular, assim como na pesquisa realizada por Work e Balazs (1999b). Esses autores determinaram 4 escores para o tamanho dos fibropapilomas classificados com as letras A, B, C e D (A para tumores medindo menos de 1 cm de diâmetro; B para os compreendidos entre 1 cm e 4 cm; C para os que encontraram-se acima de 4 cm e até 10 cm; e finalmente D para tumores maiores que 10 cm). Desta forma, foi realizada classificação das tartarugas de acordo com quantidade e tamanho dos tumores. Das 29 tartarugas acometidas pela doença, não foi possível determinar a quantidade e tamanho dos fibropapilomas de dois animais (T7 e T8).

Para a quantidade de fibropapilomas foram determinados 8 escores (identificados por números de 1 a 8) descritos na tabela 4. O número de tumores/tartaruga variou de 4 a 129 tumores, numa média de 43,96. Foram classificados animais nos sete escores, sendo que 33,33% dos animais foram classificados no escore 1 e 29,63% no escore 2. O restante das tartarugas foi distribuído nos escores numerados de 3 a 7.

Para tamanho dos tumores foram determinados oito escores numerados de 1 a 8 (Tabela 5). Foram catalogados animais com tumores classificados apenas nos 4 primeiros escores: 1, 2, 3 e 4, compreendidos entre 0,2 cm e 13,0 cm de diâmetro. Das vinte e sete tartarugas com tumores classificados nos escores, apenas três possuíam tumores classificados no escore 4. A média de tumores classificados no escore 1 foi de 19,85 próxima à média para o escore 2 que foi de 24,88 e bem distante das médias para escores 3 (1,91) e 4 (1).

Assim como realizado por Work e Balazs (1999b) os animais também foram classificados de acordo com o grau de acometimento da doença (quando existente), sendo numerados de 0 a 3 (0 para animais não afetados; 1 para grau leve; 2 para moderado e 3 para grave). Com relação ao tamanho dos animais, a menor média foi para os não acometidos. Foi observado o menor valor para hematócrito nos

animais de grau grave, sendo que no estudo realizado por Work e Balazs (1999b) foi observada diminuição progressiva do escore 0 ao 3. Não houve progressivo decréscimo na contagem absoluta de leucócitos como descrito por estes autores e sim um aumento no escore 3, sendo observada diminuição apenas no escore 1. Para dosagem de hemoglobina, observou-se que o maior valor foi para o grupo de tartarugas sem fibropapilomas e o menor para o de grau grave. A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) se manteve sem muitas alterações de acordo com a ausência e a gravidade da doença. O volume corpuscular médio (VCM) foi maior no escore 2 e a hemoglobina corpuscular média (HCM) teve diminuição progressiva dos animais não acometidos aos de grau moderado e aumento nos de grau grave. Houve aumento progressivo de dosagem de proteína plasmática do escore 0 ao 2 e diminuição no escore 3. Os animais sem fibropapilomas e os de grau leve apresentaram menores contagens absolutas de eosinófilos, enquanto os animais classificados nos graus moderado e grave apresentaram contagens mais elevadas, isso contradiz o que Work e Balazs (1999b) propuseram: uma diminuição progressiva na contagem dos eosinófilos de acordo com o aumento da gravidade da doença. Além disso, como observado no estudo destes autores, os animais de grau moderado apresentaram maiores índices para contagem absoluta de linfócitos e os de grau grave apresentaram menores índices para contagem de monócitos e maiores índices para contagem de heterófilos. As análises estatísticas demonstraram que apenas os eosinófilos apresentaram diferença significativa entre os grupos, sendo que os animais mais acometidos (graus moderado e grave) apresentaram contagens mais elevadas. Os valores de linfócitos e CCC beiraram a significância estatística apresentando diferenças estatísticas entre os quatro grupos.

Foi analisado, também, o hemograma e leucograma das tartarugas com fibropapilomas de acordo com o tamanho dos fibropapilomas. Os animais foram classificados apenas nos escores 2, 3 e 4. Observou-se uma diminuição do CCC, Ht, contagem de eritrócitos, dosagem de proteína plasmática, contagem de monócitos e linfócitos e aumento no número total de leucócitos e heterófilos nos animais classificados no escore 4. A análise estatística demonstrou significância apenas para os valores de heterófilos.

É importante comentar que existem inúmeros fatores que podem afetar os valores do perfil hematológico e conseqüentemente da função celular das tartarugas marinhas, tais como: local anatômico da punção venosa; idade das tartarugas; mecanismo de termorregulação; sexo (MCARTHUR; WILKINSON; MEYER, 2004), os machos normalmente possuem contagens mais altas que as fêmeas; estado nutricional; condições ambientais; estação do ano e temperatura ambiente (o número de células aumenta antes do inverno e vai diminuindo progressivamente durante essa estação, estando baixo no início do verão). No entanto, esses fatores não foram levados em consideração nesse trabalho.

Os eosinófilos observados nas extensões sangüíneas possuem grânulos citoplasmáticos arredondados e de coloração rosa intenso diferenciando-se dos heterófilos que possuem grânulos em forma de bastonete. De acordo com estudos realizados com a tartaruga marinha da espécie *Lepidochelys kempii*, muitos eosinófilos descritos pela microscopia óptica poderiam ser heterófilos (WORK et al., 1998). Os eosinófilos não foram observados em todas as amostras. A literatura descreve dois tipos de acordo com o tamanho e a forma do núcleo: um menor com núcleo denso e bem definido de coloração azul-púrpura e outro maior com núcleo amorfo também de coloração azul-púrpura, ambos com grânulos citoplasmáticos (WORK et al., 1998). Células similares foram encontradas em diversas amostras como demonstrado na figura 10.

Em microscopia óptica observou-se o núcleo de monócitos e linfócitos corado por azul-púrpura como descrito por Work et al. (1998). No citoplasma dos monócitos não foram observados grânulos azurofílicos, assim como no trabalho de WORK et al. em 1998.

Não foram encontrados basófilos em nenhuma amostra sangüínea de *Chelonia mydas*. São células raras nesta espécie e o motivo ainda é incerto, podendo ser por causa da região geográfica na qual se encontram, do clima ou da idade (WORK et al., 1998).

Ao contrário do que descreve Work et al. em 1998, os trombócitos de *Chelonia mydas*, ao microscópio óptico, não se confundem morfológicamente com os basófilos e sim com os linfócitos. A diferenciação deve ser feita considerando a

coloração do citoplasma, a forma da célula e do núcleo. A coloração do citoplasma é hialina nos trombócitos e azulada nos linfócitos. A forma da célula e do núcleo dos linfócitos é geralmente arredondada com o núcleo ocupando quase todo o citoplasma, em alguns casos foi possível observar pseudópodes. No caso dos trombócitos, apresentam-se ligeiramente arredondados ou na forma oval dependendo do grau de ativação dos mesmos (tempo de colheita do sangue influencia a forma destas células).

Como descrito por Work et al. (1998), os eritrócitos observados têm forma oval e núcleo de coloração azul-púrpura. Também foram observadas pequenas inclusões citoplasmáticas amorfas próximas ao núcleo ou ao pólo da célula, sendo consideradas organelas em degeneração por Work et al. (1998).

Estudos realizados com tartarugas verdes acometidas pela GTFP indicaram que estes animais possuíam diminuição de linfócitos, eosinófilos e basófilos, aumento de heterófilos e monócitos e hipoproteinemia (CRAY et al., 2001), observada também em estudos realizados por Norton et al. (1990). Resultados similares foram obtidos por Work e Balazs (1999b) na região do Havaí, observada a diminuição progressiva de linfócitos e eosinófilos e aumento progressivo de heterófilos conforme o aumento da gravidade da doença, os basófilos apresentaram pouca variação e os monócitos foram encontrados em maior número nos animais mais acometidos pela GTFP. O aumento do número de monócitos pode ser atribuído pela inflamação crônica causada pela gravidade do tumor. A heterofilia e a linfopenia foram atribuídas pelo estresse e imunossupressão causados pela doença. Além disso, os animais acometidos podem apresentar anemia não-regenerativa que também pode ser causada pela infestação por hemoparasitas, observada nos animais analisados (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; WORK; BALAZS, 1999a).

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre animais com e sem fibropapilomatose apenas para HCM, sendo que os animais sem fibropapilomatose apresentaram a maior média para esse parâmetro.

O transporte das amostras sangüíneas em meio de cultura RPMI 1640 Gibco® se tornou extremamente eficaz para a manutenção da viabilidade celular, permitindo que os leucócitos respondessem aos estímulos aplicados.

A obtenção dos leucócitos por meio de hemólise não foi eficaz para o sangue de *Chelonia mydas*, pois os núcleos das hemácias impediram a análise adequada dos leucócitos (em experimentos preliminares). Por outro lado, a utilização de Ficoll-Paque™ Plus nas densidades de 1,055 g/dL e 1,070 g/dL foram eficazes para a separação de células mononucleares e heterófilos, propiciando a análise no citômetro de fluxo. Affonso (2006) para analisar leucócitos sangüíneos de peixes da espécie *Centropomus parallelus*, também utilizou este reagente nas mesmas densidades apresentando eficácia na análise dos resultados.

As análises dos experimentos de julho e setembro do ano de 2006 foram realizadas separadamente, pois os *dot plots* apresentaram-se muito diferentes de um experimento ao outro.

Os monócitos responderam ao estímulo do Zymosan para avaliação da fagocitose, mas não responderam ao estímulo do *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI). Isso pode ter ocorrido devido ao fato dos monócitos de tartarugas marinhas, especificamente, não reconhecerem a esta bactéria e, portanto não reagirem ao seu estímulo. Tal fato ocorreu no estudo de Affonso (2006) com *Centropomus parallelus*.

De acordo com análises nos histogramas e nas lâminas confeccionadas, as células responsáveis pelas respostas a todos os estímulos aplicados foram os monócitos. Estas células responderam aos estímulos aplicados para avaliação de *burst* oxidativo e fagocitose. Nas lâminas observaram-se claramente monócitos com Zymosan em seus citoplasmas. Não houve significância para os resultados de intensidade de fluorescência entre tartarugas com e sem fibropapilomas apesar de se observar um aumento de intensidade de *burst* oxidativo basal e induzido por PMA nos animais com fibropapilomas. Observou-se também uma intensidade de fagocitose ligeiramente maior nos animais sem fibropapilomas no primeiro experimento e consideravelmente menor no segundo. Esses resultados podem corroborar com as informações obtidas na literatura de que animais com fibropapilomatose apresentam um quadro de imunossupressão, propiciando o surgimento de tal doença.

7 CONCLUSÕES

A fibropapilomatose foi observada em tartarugas com comprimento e largura curvilíneos de carapaça variados, cujas médias foram ligeiramente maiores do que animais sem os tumores. A média da massa corpórea dos animais acometidos foi cerca de duas vezes maior do que a média para animais sem fibropapilomas.

A determinação do sexo não foi possível porque todos as tartarugas estudadas foram consideradas jovens, não apresentando dimorfismo sexual externo.

A avaliação macroscópica dos fibropapilomas demonstrou que a coloração variou de rosa à negra, a textura de lisa à verrucosa e o tamanho de 0,2 a 13,0 cm. A quantidade por animal variou de apenas 2 a 129 fibropapilomas.

A análise estatística para o perfil hematológico demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos apenas para HCM, sendo que os animais com fibropapilomatose apresentaram a menor média para esse parâmetro.

O meio de cultura RPMI 1640 manteve a viabilidade celular dos leucócitos sangüíneos e o Ficoll-Paque™ Plus nas densidades 1,055 g/dL e 1,070 g/dL separou três populações distintas de células: monócitos, linfócitos e heterófilos.

O *sorting* foi eficaz para a confirmação de três populações separadas por tamanho e complexidade.

As células responsáveis pelas respostas aos estímulos aplicados foram os monócitos.

Os monócitos responderam ao estímulo químico pelo PMA para avaliação de *burst* oxidativo e o Zymosan estimulou a fagocitose destas mesmas células.

Não houve diferença significativa entre animais acometidos ou não para a avaliação da função celular (fagocitose e *burst* oxidativo - induzido ou basal).

A fibropapilomatose permanece ainda pouco elucidada apesar dos inúmeros estudos no mundo todo. Essa situação é preocupante, uma vez que esta doença é considerada uma das causas de redução populacional de *C. mydas* juntamente com a captura incidental. Deve-se levar em consideração que tartarugas

jovens acometidas muitas vezes não sobrevivem à fase adulta e conseqüentemente deixam de contribuir para a perpetuação da espécie.

O desequilíbrio ambiental cada vez maior é um grande responsável pela perda de hábitat dos animais e esta perda é a principal causa de extinção de espécies. Doenças possivelmente relacionadas à poluição, como no caso da fibropapilomatose, conferem mais um fator relevante para a redução populacional de animais e conseqüentemente no agravamento do desequilíbrio dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS

ADNYANA, W.; LADDS, P. W.; BLAIR, D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 10, p. 737-742, 1997.

AFFONSO, S. F. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (POEY, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo**. 2006. 116f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

AGUIRRE, A. A.; SPRAKER, T. R.; BALAZS, G. H.; ZIMMERMAN, B. Spirorchids and fibropapillomas in green turtles from the Hawaiian Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 1, p. 91-98, 1998.

AGUIRRE, A. A.; LIMPUS, C. L.; SPRAKER, T. R.; BALAZS, G. H. Survey of fibropapillomatosis and other potencial diseases in marine turtles from Moreton Bay, Queensland, Australia. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON THE SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 19., 1999, Texas. **Proceedings...**

ANANTHASWAMY, H. N.; PIERCEALL, W. E. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. **Photochemistry Photobiology**, v. 52, p. 1119-1136, 1990.

BALAZS, G. H.; MURAKAWA, S. K. K.; ELLIS, D. M.; AGUIRRE, A. A. Manifestation of fibropapillomatosis of green turtles at Kaneohe Bay in the Hawaiian islands. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON THE SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 18., 1998, Mexico. **Proceedings...**, p. 3-7.

BALAZS, G. H. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. In: BALAZS, G. H., POOLEY, S. G. (Ed.) **Research plan for marine turtle fibropapilloma**. U. S. Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-156, 1991, p. 47-57.

BAPTISTOTTE, C.; SCALFONE, J. T.; GALLO, B. M. G.; SANTOS, A. S., CASTILHOS, J. C.; LIMA, E. H. S.M.; BELLINI, C.; BARATA, P. C. R.. Prevalence of sea turtle fibropapillomatosis in Brazil. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA

TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 21., 2001, Philadelphia.
Proceedings..., p. 24-28.

BOLTEN, A. B.; BJORNDALE, K. A. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 3, p. 407-413, 1992.

BOWEN, B. W.; MEYLAN, A. B.; ROSS, J. P.; LIMPUS, C. J.; BALAZS, G. H.; AVISE, J. C. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. **Evolution**, v. 46, n. 4, p. 865-881, 1992.

BRILL, R. W.; BALAZS, G. H.; HOLLAND, K. N.; CHANG, R. K. C.; SULLIVAN, S.; GEORGE, J. C. Daily movements, habitat use, and submergence intervals of normal and tumor-bearing juvenile green turtles (*Chelonia mydas* L.) within a foraging area in the Hawaiian islands. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 185, p. 203-218, 1995.

BROOKS, D. E.; GINN, P. E.; MILLER, T. R.; BRAMSON, L.; JACOBSON, E. R. Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 335-339, 1994.

BROWN, D. R.; LACKOVICH, J. K.; KLEIN, P. A. Further evidence for the absence of papillomaviruses from sea turtle fibropapillomas. **Veterinary Record**, v. 145, p. 616-617, 1999.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 161-171, 1999.

CURRY, S. S.; BROWN, D. R.; GASKIN, J. M.; JACOBSON, E. R.; EHRHART, L.M.; BLAHAK, S.; HERBST, L.H.; KLEIN, P.A. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtle after exposure to seawater. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 4, p. 792-797, 2000.

CRAY, C.; VARELLA, R.; BOSSART, G. D.; LUTZ, P. Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 32, n. 4, p. 436-440, 2001.

D'AMATO, A.F.; MORAES-NETO, M. First documentation of fibropapillomas verified by histopathology in *Eretmochelys imbricata*. **Marine Turtle Newsletter**, v. 89, p. 12, 2000.

DRURY, S. E. N.; GOUGH, S. M.; JESSOP, M. Detection of herpesvirus-like and papillomavirus-like particles associated with diseases of tortoises. **Veterinary Record**, v. 143, p. 639, 1998.

ECKERT, K., L. ; BJORDNAL, K. A. ; ABREU-GROBOIS, F. A. ; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Pennsylvania: Consolidated Grafic Communications, 2000. n. 4, 265 p.

EHRHART, L. M. Fibropapillomas in green turtles of the Indian River lagoon, Florida: distribution over time and area. **NOAA-TM-NMFS-SWFSC-156**, p. 59-61, 1991.

EHRHART, L. M.; SINDLER, R. B.; WITHERINGTON, B. E. **Preliminary investigation of papillomatosis in green turtles: phase I - frequency and effects on turtles in the wild and in captivity. Contract no. 40- GENF-6-00601, Final Report to U.S. Local: Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Miami Laboratory, 46 p., 1986.**

ENE, A.; SU, M.; LEMAIRE, S.; ROSE, C.; SCHAFF, S; MORETTI, R.; LENZ, J.; HERBST, L. H.. Distribution of chelonid fibropapillomatosis associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 3, p. 489-497, 2005.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989.

FRAZIER, J. G. Conserving sea turtles and other natural resources. **Proceedings of the Thirteenth Annual SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION**, 13., 1999, Georgia. **Proceedings...**, 23-27.

GARDNER, S. C.; PIER, M. D.; WESSELMAN, R.; JUÁREZ, J. A. Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1082-1089, 2003.

GOTTDENKER, N. L.; JACOBSON, E. R. Effect of veinpuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 1, p. 19-21, 1995.

HARSHBARGER, J. C. Sea turtle fibropapilloma cases in the registry of tumors in lower animals. **NOAA-TM-NMFS-SWFSC-156**, p. 63-70, 1991.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal Immunology Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HERBST, L. H. Fibropapillomatosis of marine turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 389-425, 1994.

HERBST, L. H.; KLEIN, P. A. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 4, p. 27-30, 1995.

HERBST, L. H.; GREINER, E. C.; EHRHART, L. M.; BAGLEY, D. A.; KLEIN, P.A. Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and fibropapillomatosis in green turtles from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 3, p. 496-507, 1998.

IUCN. **2006 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 20 de Maio de 2007.

JACOBSON, E. R.; GASKIN, J. M.; ROELKE, M.; GREINER, E. C.; ALLEN, J. Conjunctivitis, tracheitis and pneumonia associated with herpesvirus infection in green sea turtles. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 9, p. 1020-1023 (November 1), 1986.

JACOBSON, E. R.; MANSELL, J. L.; SUNDBERG, J. P.; HAJAR, L.; REICHMANN, M. M.; EHRHART, L. M.; WALSH, M.; MURRU, F. Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal Comparative Pathology**, v. 101, p. 39-52, 1989.

JACOBSON, E. R.; BUERGELT, C.; WILLIAMS, B.; HARRIS, R. K. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 1991.

LACKOVICH, J. K.; BROWN, D. R.; HOMER, B. L.; GARBER, R. L.; MADER, D. R.; MORETTI, R. H.; PATTERSON, A. D.; HERBST, L. H.; OROS, J.; JACOBSON, E. R.; CURRY, S. S.; KLEIN, P. A. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 37, p. 89-97, 1999.

LIMPUS, C. J.; MILLER, J. D. The occurrence of cutaneous fibropapillomas in marine turtles in Queensland. In: JAMES, R. (compiler) Proc. Australia in green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: part of a panzootic? **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 70-78, 1994.

LUCKES, B. Studies on tumors in cold-blooded vertebrates. **Annual Report of the Tortugas Laboratory of the Carnegie Institute**, Washington, D.C. p. 92-94, 1938.

MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. **Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles**. Blackwell, 2004.

MATUSHIMA, E. R. Fibropapilomas em tartarugas marinhas: aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais. 2003. 111 f. Tese (Livre-Docente em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MATUSHIMA, E. R.; LONGATTO-FILHO, A.; DI LORETTO, C.; KANAMURA, C. T.; RAMOS, M. C. C.; SINHORINI, I. L.; GALLO, B. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological, ultrastructural and immunohistochemical study in brazilian specimens. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 2, p. 51 – 54, 2001.

MATUSHIMA, E. R.; LONGATTO-FILHO, A.; DI LORETTO, C.; KANAMURA, C. T.; GALLO, B.; BAPTISTOTTE, C. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological and immunohistochemical study in brazilian specimens. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE CONSERVATION AND BIOLOGY, 19. 1999, Texas. **Proceedings...**, p. 237 – 239. U. S. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC – 443.

MEYLAN, A. B.; MEYLAN, P. A. Introducción a la evolución, historias de vida y Biología de las tortugas marinas. In: ECKERT, K., L.; BJORDNAL, K. A. ; ABREU-GROBOIS, F. A. ; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Pennsylvania: Consolidated Grafic Communications, 2000. nº 4, p. 3-8.

NATT, M. P.; HERRICK, G. A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1952.

NORTON, T. M.; JACOBSON, E. R.; SUNDBERG, J. P. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 2, p. 265-270, 1990.

ORÓS, J.; RODRÍGUES, J. L.; DÉNIZ, S.; FERNANDEZ, L.; FERNÁNDEZ, A. Cutâneos poxvirus-like infection in a captive Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). **Veterinary Record**, v. 143, p. 508-509, 1998.

OWENS, D.W. ; RUIZ, G. New methods for obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. **Herpetologica**, v. 36, n. 1, p.17-20, 1980.

PAGE, C.D.; MAUTINO, M. Clinical management of tortoises. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, n. 2, p. 221-8, 1990.

PASTORET, P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.;GOVAERTS, A. (Ed.). **Handbook of Vertebrate Immunology**. Academic Press, California, 1998.

PRITCHARD, P. C. H. **Encyclopedia of turtles**. T.F.H. Publ., Inc., Neptune, New Jersey, 1979.

PRITCHARD, P. C. H.; MORTIMER, J. A. Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Espécies. **Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas**, n. 4, p. 23-41, 2000.

QUACKENBUSH, S. L.; WORK, T. M.; BALAZS, G. H.; CASEY, R. N.; ROVNAK, J.; CHAVES, A.; TOIT, L.; BAINES, J. D.; PARRISH, C. R.; BOWSER, P. R.; CASEY, J. W. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. **Virology**, v. 246, p. 392-399, 1998.

QUACKENBUSH, S. L.; LIMPUS, C. J.; AGUIRRE, A. A.; SPRAKER, T. R.; BALAZS, G. H.; CASEY, R. N.; CASEY, J. W. Prevalence and phylogeny of herpesvirus sequences from normal and fibropapilloma tissues of green and loggerhead turtles sampled at Moreton Bay, Australia. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 19., 1999, Texas. **Proceedings...**

REBELL, G.; RYWLIN, A.; HAINES, H. A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of the green sea turtles in Aquaculture. **American Journal Veterinary Research**, v. 36, n. 8, p. 1975.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancromáticos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

SAMOUR, H. J.; RISLEY, D.; MARCH, T.; NIEVA, O.; JONES, D. M. Blood sampling techniques in Reptiles. **Veterinary Record**, v. 114, p. 4722-4726, 1984.

SILVA, F. R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SMITH, G. M.; COATES, C. W. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles *Chelonia mydas*. **Zoologica**, v. 23, p. 93-98, 1938.

STOSIK, M.; DEPTULA, W.; WIKTOROWICZ, K.; TRAVNICEK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. Respiratory burst in neutrophilic granulocytes of carps (*Cyprinus carpio*): cytometric studies. **Veterinary Medicine**, v. 47, n. 1, p. 17-20, 2002.

UNE, Y.; UEMURA, K.; NAKANO, Y.; KAMIIE, J.; ISHIBASHI, T.; NOMURA, Y. Herpesvirus infection in tortoises (*Malacochersus tornieri* and *Testudo horsfieldii*). **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 624-627, 1999.

WEISBURGER, E. K. Chemical carcinogenesis in experimental animals and humans. In: SIRICA, A.E. (Ed). The pathobiology of neoplasia. **Plenum Press**, N. Y, p. 39-56, 1989.

WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Causes of green turtle (*Chelonia mydas*) morbidity and mortality in Hawaii. In: ANNUAL SYMPOSI IN THE SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 17., 1997, Florida. **Proceedings...**

WORK, T. M.; RASKIN, R. E.; BALAZS, G. H.; WHITTAKER, S. D. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 10, p. 1252-1257, 1998.

WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Quantification of tumor severity and hematology in green turtles afflicted with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands. In: ANNUAL SEA TURTLE SYMPOSIUM, 19., 1999, Texas, Proceedings...,

WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Relating Tumor Score to Hematology in Green Turtles with Fibropapillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 804-807, 1999. (b)

ANEXO A - REAGENTES E SOLUÇÕES

- Metanol PA (Merck®);
- solução corante May-Grünwald (Merck®)-Giemsa (corante de Rosenfeld);
- reagente Natt & Herrick;
- reagente de cor para hemoglobina (Labtest®);
- *phosphate-buffered saline* (PBS);
- solução salina (NaCl 0,2%);
- solução salina (NaCl 1,6%);
- iodeto de propídeo (PI) (Sigma®);
- meio de cultura RPMI 1640 Gibco®;
- Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences®);
- azul de Tripan 0,4% (Sigma®);
- miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem®);
- DCFH (2'7' diclorofluorisceína) (Molecular Probes®);
- *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídeo (SAPI);
- zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*) BioParticles®, Alexa Fluor®594 conjugate
- EDTA 3mM (Sigma®,USA);

Preparação dos reagentes e das soluções

- a) Solução corante May-Grünwald (Merck®)-Giemsa (corante de Rosenfeld);
Giemsa em pó.....	0,97 g
May-Grünwald em pó.....	0,53 g
Metanol PA (Merck®) q.s.p.	1000 mL

b) Reagente Natt & Herrick

NaCl.....	3,88 g
Na ₂ SO ₄	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,91 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
Formalina (37%).....	7,5 mL
Metil Violeta 2B.....	0,10 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

c) Reagente de cor para hemoglobina (Labtest®)

Reagente de cor do kit Labtest®	10 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

d) *Phosphate-buffered saline* (PBS)

• Solução estoque 10x (concentrada):

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Merk®).....	42,96 g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O (Nuclear®).....	3,6 g
NaCl (Labsynth®).....	82 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

• Solução de uso 1x (diluída):

Solução PBS 10x (concentrada).....	100 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

e) Solução salina (NaCl 0,2%)

NaCl.....	2 g
H ₂ O destilada.....	1000 mL

f) Solução salina (NaCl 1,6%)

NaCl.....	16 g
H ₂ O destilada.....	1000 mL

g) Iodeto de propídeo (PI) (Sigma®) solução estoque 10^{-2} M

Iodeto de propídeo..... 6,684 g

PBS 1x..... 10 mL

h) Meio de cultura RPMI 1640 Gibco®:

NaHCO₃ 24 mM..... 2 g

Glutamina 2mM.....292 mg

Antibiótico..... 1 mL

Hepes (opcional) 20 mM.....5,2 g

i) Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences®);

• Densidade 1,055 g/mL (preparação de 20 mL):

Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences®)..... 18,5050 mL

H₂O MilliQ..... 1,4950 mL

• Densidade 1,070 g/mL (preparação de 20 mL):

Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences®)..... 18,7700 mL

H₂O MilliQ..... 1,2300 mL

j) Azul de Tripan 0,4% (Sigma®)

Azul de Tripan..... 4 g

H₂O destilada.....96 mL

k) Miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem®)

Solução estoque de PMA (100 ng/100 µL).....1 µL

PBS 1x.....999 µL

Obs.: Mantida congelada a -20° C e protegida da luz.

l) DCFH (Molecular Probes®) solução estoque 25 mM

DCFH-DA.....28,35 mg

Etanol PA..... 2 mL

Obs.: Mantida congelada a -20° C e protegida da luz.

Na hora do uso:

Solução estoque.....50 µL

PBS 1x.....4,1 mL

Obs.: Mantida protegida da luz e refrigerada.

m) *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídeo (SAPI)

Protocolo de conjugação da bactéria *Staphylococcus aureus* com iodeto de propídeo (SAPI) proposto por HASUI et al. (1989):

- ❖ Cultivar bactérias viáveis em ágar sangue ou TSA por 48h;
- ❖ Colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis em fluxo laminar;
- ❖ Ressuspender em NaCl 0,85% e centrifugar por 10 minutos a 2500 RPM;
- ❖ “Matar” as bactérias a 60° C por 30 minutos;
- ❖ Lavar 3 vezes com NaCl 0,85% e após cada lavada centrifugar por 10 minutos a 2500 RPM;
- ❖ Ajustar a concentração das bactérias de modo que sua leitura no espectrofotômetro a uma Ab de 620 nm tenha um valor entre 2,4 a 2,7. Estes valores, nesta Ab, são aqueles em que as bactérias em suspensão apresentam uma turbidez que corresponde ao nº 8 da escala de Mc Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações;
- ❖ Preparar uma solução de PI a 5%;
- ❖ Centrifugar nas mesmas condições;
- ❖ Desprezar o sobrenadante;
- ❖ Adicionar 25 µL da solução de PI a 5%;
- ❖ Incubar à temperatura ambiente por 30 minutos no escuro;
- ❖ Lavar a bactéria marcada mais 3 vezes com NaCl 0,85%;
- ❖ Centrifugar novamente 3 vezes por 10 minutos a 2500 RPM;
- ❖ Ressuspender a bactéria em 5 mL de PBS glicosado (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺);
- ❖ Aliquotar em eppendorfs de 2 mL;
- ❖ Proteger da luz;
- ❖ Congelar a -80° C;

❖ Descongelar imediatamente antes do uso.

n) Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*) BioParticles[®], Alexa Fluor[®]594 conjugate:

Zymosan BioParticles[®], Alexa Fluor[®]594 conjugate..... 2 mg

PBS 1x estéril.....2 mL

Obs.: Tanto a solução preparada quanto o reagente em pó foram mantidos em temperatura de -20° C e protegidos da luz. A solução preparada foi acondicionada em *ependorfs* contendo alíquotas de 20 µL cada.

o) EDTA 3mM (Sigma[®],USA)

EDTA..... 0,56g

PBS 1x.....500 mL

Obs.: Mantido protegido da luz e sob refrigeração.